

אוניברסיטת תל-אביב
הפקולטה למדעים מדויקים
ע"ש ריימונד ובברלי סאקלר

אופיו של החומר האורגני המומס שמקורו במי קולחים

ובמי-הנקז מקרקע שהושקתה במי קולחים,

וקשירתו לנחושת

חיבור זה הוגש כחלק מהדרישות לקבלת התואר

"מוסמך אוניברסיטה" – M.Sc. באוניברסיטת תל-אביב

בית הספר לכימיה

על ידי

רויטל חיט

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של

ד"ר פנחס פיין ופרופ' אורי מינגלגרין מהמכון לקרקע, מים ומדעי הסביבה-מינהל המחקר

החקלאי, מכון וולקני

ופרופ' שמואל כרמלי מביה"ס לכימיה באוניברסיטת תל-אביב

ברצוני להודות לדר' פנחס פיין, פרופ' אורי מינגלגרין ופרופ' שמואל כרמלי על הנחייתם,
תמיכתם ועזרתם המקצועית.

תודה מיוחדת לדר' מיכאל בוריסובר על ההזרחה, הסבלנות והתמיכה.

תודה לחברי המכון לקרקע, מים ומדעי הסביבה במכון וולקני ובמיוחד לאנה בריוזקין על עזרתה
בניסויים.

תודה ליוכבד רחמים מביה"ס לכימיה באוניברסיטת תל-אביב על עזרתה בניסויים.

ולבסוף, תודה למשפחתי, לחברותיי, לנסטיה ולג'יי היקרים על תמיכתם מכל הלב ועזרתם בזמנים
הקשים.

תוכן עניינים:

2	רשימת איורים.....	
2	רשימת טבלאות.....	
3	רשימת קיצורים וסימנים.....	
4	תקציר.....	1
	רקע תיאורטי.....	2
8	2.1 הקדמה.....	
11	2.2 אפיון החא"מ.....	
18	2.3 אפיון החא"מ במי קולחים.....	
19	2.4 קשירת מיקרו-מזהמים אורגנים ואי-אורגנים לחא"מ.....	
20	2.5 שיטות לקביעת מדדי הקומפלקסציה בין מתכות לבין החא"מ.....	
25	2.6 אפיון האינטראקציות בין חא"מ למתכות.....	
29	2.7 מטרת העבודה.....	
	חומרים ושיטות.....	3
30	3.1 כללי.....	
30	3.2 חומרים.....	
31	3.3 שיטות.....	
	תוצאות ודיון.....	4
39	4.1 אפיון בסיסי של דוגמאות החא"מ לפני ההפרדה למקטעי גודל.....	
41	4.2 הפרדת החא"מ למקטעי גודל.....	
44	4.3 הומויניזציה של דוגמאות חא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa.....	
	4.4 אנליזת פרוטונים ¹ H-NMR של דוגמאות חא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa	
45	ובמקטע הגודל <1 kDa חא"מ <200 Da.....	
	4.5 אנליזת FTIR של דוגמאות חא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa	
48	ובמקטע הגודל <1 kDa חא"מ <200 Da.....	
	4.6 אפיון פלואורסצנטי תלת מימדי, (EEM), של דוגמאות חא"מ	
51	במקטע הגדול מ- 1kDa, ובמקטע הגודל <1kDa חא"מ <200Da.....	
54	4.7 אפיון האינטראקציות בין חא"מ לנחושת.....	
65	4.8 איורים.....	
89	5 סיכום ומסקנות.....	5
93	6 רשימת מקורות.....	6
104	7 נספחים.....	7

רשימת איורים

- איור 3.1: הפרדת החא"מ למקטעי גודל
- איור 3.2: עקומות טיטרציה ועקום כיוול
- איור 4.1: אנליזת $^1\text{H-NMR}$
- איור 4.2: אנליזת FTIR
- איור 4.3: השוואת ספקטרה FTIR
- איור 4.4: מפות פלואורסצנטיות של דוגמאות החא"מ
- איור 4.5: מיקום הפיקים הפלואורסצנטים בחא"מ (זוגות אורכי גל לעירור ופליטה)
- איור 4.6: השוואת המפות הפלואורסצנטיות, לפני ואחרי הוספת נחושת ($pCu=3.5$)
- איור 4.7: איזותרמות קשירה של חא"מ לנחושת
- איור 4.8: מקדם החלוקה, K_d , כתלות בריכוז הנחושת הקשורה לחא"מ
- איור 4.9: השוואת איזותרמות הקשירה של החא"מ, בשני מקטעי הגודל ולאחר הומוניזציה
- איור 4.10: מיקום הפיקים הפלואורסצנטים (זוגות אורכי גל לעירור ופליטה), עבור דוגמאות חא"מ
- איור 4.11: עוצמת הפלואורסצנטיה המנורמלת לריכוז הפא"מ, בדוגמאות חא"מ ללא תוספת נחושת
- איור 4.12: דיכוי בעוצמת הפלואורסצנטיה של דוגמת חא"מ בתוספת ריכוזי נחושת עולים
- איור 4.13: עוצמת הפלואורסצנטיה היחסית, כתלות בריכוז הנחושת הקשורה

רשימת טבלאות

- טבלה 4.1: אפיון בסיסי של חא"מ, ($<0.45 \mu\text{m}$), במי הקולחים ובמי-הנקז
- טבלה 4.2: התפלגות החומר האורגני בין מקטעי הגודל השונים
- טבלה 4.3: ערכים בסיסיים ממוצעים וסטיות תקן של דוגמאות החא"מ לאחר הפרדה על ממברנה של 1 kDa
- טבלה 4.4: ערכים בסיסיים ממוצעים וסטיות תקן של דוגמאות חא"מ לאחר הפרדה על ממברנה של 200 Da
- טבלה 4.5: ריכוזי מתכות ממוצעים וסטיות תקן של דוגמאות החא"מ לאחר הפרדה על ממברנה של 1 kDa
- טבלה 4.6: ריכוזי מתכות ממוצעים וסטיות תקן של דוגמאות חא"מ לאחר הפרדה על ממברנה של 200 Da
- טבלה 4.7: אפיון בסיסי של דוגמאות חא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa, לפני ואחרי הומוניזציה
- טבלה 4.8: נתוני האינטגרציה עבור אנליזת $^1\text{H-NMR}$
- טבלה 4.9: אפיון הפיקים המתקבלים מאנליזת FTIR
- טבלה 4.10: מיקום הפיקים הפלואורסצנטים בדוגמאות חא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa
- טבלה 4.11: מיקום הפיקים הפלואורסצנטים בדוגמאות חא"מ במקטע הגודל $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$
- טבלה 4.12: אורכי גל לעירור ופליטה עבור חא"מ ללא נחושת

רשימת קיצורים וסימנים

חא"מ- חומר אורגני מומס

פא"מ- פחמן אורגני מומס (DOC- Dissolved Organic Carbon)

Dalton -Da (דלתון- יחידת משקל מולרי ביחידות של גרם/מול)

Total Organic Carbon -TOC

Dissolved Inorganic Carbon -DIC (פחמן אי-אורגני מומס)

Electric Conductivity -EC, מוליכות חשמלית (ביחידות של mS/cm)

Optical Density -OD, צפיפות אופטית

Specific Ultra Violet Absorption -SUVA, צפיפות אופטית ספציפית

Nuclear Magnetic Resonance -NMR

Furier Transfer Infra Red -FTIR

Excitation Emission Matrix -EEM

Ion Selective Electrode -ISE

Ionic Strength Adjuster -ISA

Fluorescence Quenching -FQ

Inner Filter Effect -IFE

F/F₀ - עוצמת הפלואורסצנטיה היחסית

1. תקציר:

השקיה במי קולחים הינה שיטה רווחת בעולם ובעיקר במדינות שבהן מלאי המים השפירים הנו מוגבל. שפכים עירוניים מטופלים בשיטות המבוססות על פעילות מיקרוביאלית שבסופן מתקבלים מי קולחים "שניוניים", היכולים לשמש להשקיה של גידולים בהתאם למגבלות תברואתיות, התלויות בסוג הטיפול במים, ובמידת האפשרות להעברה של מחלות למגדל ו/או לצרכן של התוצרת החקלאית.

מי קולחים "שלישוניים", המתאימים להשקיית כל גידול ללא מגבלה תברואית, מתקבלים לאחר "סינון בחול עמוק" (כגון החדרה של מי הקולחים השניוניים לאקופר ושהייתם שם למשך מספר חודשים, לדוגמה בשפד"ן). השקיה במי קולחים מעשירה את הקרקע בחומר אורגני כללי ובחומר אורגני מומס (חא"מ) אשר יכול להשפיע על תכונות הקרקע ולהניע מיקרו-מזהמים כגון מתכות כבדות בחתך הקרקע ואל מי התהום.

מטרת המחקר הייתה לבחון את ההשפעה של השקיה במי קולחים שניוניים (להלן מי קולחים) לעומת השקיה במי קולחים שלישוניים (להלן מים שפירים) על החא"מ בקרקע ועל קשירתו לנחושת.

הפקת החא"מ נעשתה לאחר השקיה של עצי איקליפטוס במי קולחים או במים שפירים. העצים נשתלו במכלים בנפח 200 ליטר וההשקיה הייתה בכמות מים קבועה, שהייתה פחותה מכמות המים שהעצים יכולים היו לאדות (קרי, השקיה גירעונית). לאחר כ-5 חודשי השקיה בקיץ, הקרקע במיכלים נשטפה במים שפירים, ומי-הנקז נאספו. החא"מ הופק משני סוגי מי-הנקז (להלן "נקז קולחים" ו"נקז שפירים"), ע"י סינון של מי-הנקז ב-cut off של $0.45 \mu\text{m}$. בנוסף, הופק חא"מ גם ממי הקולחים עצמם.

החא"מ הופרד למקטעי גודל (חא"מ $1 \text{ kDa} <$, $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$, חא"מ $> 200 \text{ Da}$) באמצעות ממברנות בטכניקה של tangential flow. דוגמאות נבחרות של החא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa נשטפו בתמיסת נתרן כלורי באמצעות stirred cell כאמצעי להחליף יסודות קשורים לחא"מ בנתרן (הומיוניזציה), ולגרום להפרדה מרבית של מרכיבי החא"מ במקטע הזה.

חא"מ במקטעי הגודל $1 \text{ kDa} <$, ו- $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$ אופיין מבחינה ספקטרלית באמצעות $^1\text{H-NMR}$, FTIR, מיפוי פלואורסצנטי תלת מימדי (EEM) וספקטרום פליטה פלואורסצנטי.

קשירת הנחושת לחא"מ (במקטע הגדול מ- 1 kDa לפני הומיוניזציה ואחריה, ובמקטע הגודל

1 kDa < חא"מ < 200 Da) נמדדה באמצעות אלקטרודה ספציפית לנחושת (Cu-ISE), בטיטרציה עם נחושת חנקתית. השינוי בספקטרום הפליטה הפלואורסצנטי לאחר קשירת הנחושת שימש לאפיון של אתרי הקשירה של החא"מ למתכת זו.

נמצא כי במשטר של השקיה גירעונית ריכוז הפא"מ בתמיסת הקרקע היה גבוה ב-1-2 סדרי גודל מאשר במי הקולחים, אולם לא היה שוני משמעותי בריכוז בין השקיה במי קולחים לבין השקיה במים שפירים. ריכוז השיירים הארומטים בחא"מ ($0.45 \mu\text{m} >$) של מי הקולחים עצמם היה נמוך בהשוואה לחא"מ של שני סוגי מי-הנקז.

אנליזת $^1\text{H-NMR}$ של מקטע החא"מ הגדול מ-1 kDa הראתה כי החא"מ של מי הקולחים היה יותר אליפטי ופחות ארומטי מחא"מ של שני סוגי מי-הנקז. בחא"מ בשני סוגי מי-הנקז היה ריכוז גבוה יותר של מימנים ארומטים וריכוז נמוך יותר של מימנים אליפטים, בהשוואה לריכוזיהם בחא"מ ממי הקולחים. כמו כן, החא"מ ממי הקולחים הכיל יותר מימנים אליפטים בעמדה α לקבוצות מושכות אלקטרונים (קשר כפול, קרבוניל, קרבוקסיל וטבעת ארומטית), ויותר מימנים אליפטים על פחמן הקשור לחמצן (אתר, אסטר, וכוהל) בהשוואה לחא"מ ממי-הנקז. גם אנליזת FTIR של החא"מ במקטע גודל זה מעידה כי החא"מ בשני סוגי מי-הנקז יותר ארומטי מהחא"מ במי הקולחים, אך תוצאה זאת אינה חד משמעית, שכן בליעה ב-FTIR של חומרים ארומטים, יכולה להיות גם של קבוצות קרבוקסיליות, קטונים ואלדהידים שאולי הם הנמצאים בריכוז גבוה יותר בחא"מ של מי-הנקז. אנליזת FTIR של חא"מ במקטע הגודל 1 kDa < חא"מ < 200 Da לא הראתה הבדלים בין שלושת סוגי החא"מ. האנליזה הראתה נוכחות גדולה יותר של קבוצות כוהליות, פנוליות, אסטרויות, אתריות ופוליסוכרים בהשוואה לחא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa.

במפות הפלואורסצנטיות של החא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa ובמקטע הגודל 1 kDa < חא"מ < 200 Da זוהו שני פיקים בולטים המאפיינים חומרים הומיים (חומרים דמויי חומצות פולביות/הומיות). הפיקים הנ"ל נמצאו במפות באורכי גל של עירור/פליטה באזור 436-451 nm/248-278 nm (פיק A), ובאזור 431-447 nm/324-334 nm (פיק B). מיקום הפיקים הנ"ל היה שונה בין סוגי החא"מ ובין מקטעי הגודל.

בשני מקטעי הגודל של החא"מ ממי הקולחים היה פיק ברור נוסף באורכי גל של עירור/פליטה באזור

309-350 nm/275-280 nm (פיק C) המאפיין את חומצת האמינו טריפטופאן ומייצג חומרים דמויי חלבונים,

וכן היה פיק נוסף, פחות ברור ("כתף"), המאפיין כנראה את חומצת האמינו טירוזין, ומייצג חומרים דמויי

חלבונים ארומטיים. פיקים אלה לא זוהו בחא"מ ממי-הנקז בשני מקטעי הגודל.

לפיכך, נראה שמרכיבים חלבוניים אלה של מי הקולחים עוברים פירוק בזמן השהות בקרקע.

במקטע הגדול מ-1 kDa החא"מ ממי הקולחים קשר פחות נחושת בהשוואה לחא"מ משני סוגי מי-הנקז. חא"מ

מנקז שפירים קשר יותר נחושת מחא"מ מנקז קולחים והסיבה לכך היא ככל הנראה הרכב החא"מ מנקז שפירים

שכלל ריכוז גבוה יותר של טבעות ארומטיות מצומדות ו/או קבוצות פונקציונליות (כגון קרבוקסיל, פנול וניטרן)

הקשורות למבנים ארומטיים. קבוצות פונקציונליות אלו הקשורות לטבעות ארומטיות ידועות כבעלות אפיניות

גבוהה למתכות ובכללן נחושת.

הומוניזציה בנתרן של כל דוגמאות החא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa הקטינה את קשירת הנחושת בהשוואה

לדוגמאות החא"מ שלא עברו את התהליך. ההומוניזציה שינתה ככל הנראה את המבנה המרחבי של החא"מ, כך

שפחות קבוצות פונקציונליות יכלו לקשור נחושת. קשירת נחושת ע"י חא"מ הומוני ממי קולחים נשארה נמוכה

בהשוואה לקשירה ע"י החא"מ משני סוגי מי-הנקז.

ספקטרום הפליטה הפלואורסצנטי של דוגמאות החא"מ, הראה כי הפליטה הספציפית (ליחידת פחמן אורגני)

הייתה בסדר הבא: נקז קולחים < מי קולחים < נקז שפירים. ייתכן שהפליטה הספציפית הנמוכה של חא"מ מנקז

שפירים נובעת מריכוז גבוה של קבוצות קרבוקסיליות (קבוצות מושכות אלקטרונים) המורידות את עוצמת

הפלואורסצנטיה.

תוספת נחושת לחא"מ גרמה לירידה בעוצמת הפלואורסצנטיה שלו. נחושת הנקשרת לאתרים בחא"מ הקרובים

לסביבה פלואורסצנטית (לדוגמה קבוצה קרבוקסילית הקשורה לטבעת ארומטית) גורמת לירידה בעוצמת

הפלואורסצנטיה של אתרים אלו. הקומפלקס הנוצר בולע אור ומיד חוזר למצב היסוד שלו ללא פליטה

פלואורסצנטית.

קשירת נחושת לחא"מ ממי הקולחים לוותה בירידה מתונה בעוצמת הפלואורסצנטיה היחסית (עוצמת

הפלואורסצנטיה בנוכחות נחושת המחולקת לעוצמת הפלואורסצנטיה ללא נחושת), בעוד שקשירת נחושת לחא"מ

משני סוגי מי-הנקז לוותה בירידה תלולה ויותר משמעותית בעצמת הפלואורסצנטיה היחסית. מכיוון שחא"מ ממי

הקולחים הוא יותר אליפטי, ניתן להניח שקבוצות קושרות נחושת אינן מצויות בסמוך למרכזים פלואורסצנטיים

(שהינם בעיקר טבעות ארומטיות), ולכן קשירת הנחושת משפיעה אך במעט על עוצמת הפלואורסצנטיה של

החא"מ במי הקולחים. חא"מ משני סוגי מי-הנקז הוא יותר ארומטי ולכן ניתן להניח שיותר קבוצות הקושרות נחושת מצויות בסמוך למרכזים פלואורסצנטיים, כך שקשירת הנחושת משפיעה רבות על עוצמת הפלואורסצנטיה של חא"מ זה.

לסיכום, במהלך גידול העצים וההשקיה הגירעונית (ללא שטיפה) נצבר חומר אורגני כללי ומומס בקרקע (שלפני השתילה הייתה חול דיונה נקי ללא חומר אורגני). אופי החא"מ שהצטבר בקרקע במהלך ההשקיה בקולחים השניוניים, היה דומה בעיקרו לזה של החא"מ שהצטבר בקרקע במהלך ההשקיה במים שפירים, ושונה למדי מהחא"מ של מי הקולחים עצמם.

כמות הנחושת היכולה להיקשר לחא"מ מקרקע שהושקתה במי קולחים הייתה דומה (או אף מעט נמוכה, כפי שנמצא במקטע הגדול מ-1 kDa) לזו היכולה להיקשר לחא"מ בקרקע שהושקתה במים שפירים. ניתן להניח שתהליכי פירוק מיקרוביאליים המתרחשים בקרקע בזמן השהות של החומר האורגני, הן זה המגיע משורשי הצמח והן זה המגיע עם מי ההשקיה, היו הגורם העיקרי שהשפיע על אופיו של החא"מ.

2. רקע תיאורי:

2.1 הקדמה:

השקיה במי קולחים מהווה פתרון פרו אקטיבי לבעיית החיסרון במים שפירים באזורים צחיחים וצחיחים למחצה ברחבי העולם (Feigin et al., 1991). הטיפול בשפכים הכרחי ונועד בראש ובראשונה למנוע התפרצות מחלות בקרב האוכלוסייה וזיהום של מאגרי מים עיליים ומי תהום, וכך גם נחסכת צריכה יקרה של מים שפירים שכמותם מוגבלת (Asano, 2002). השפכים המטופלים משמשים להשקיה, המוגבלת במספר "חסמים", בהתאם לדרגת הטיפול בהם, (ועדת הלפרין, 2002), ויכולים להיות עשירים בחומר אורגני וביסודות הזנה החיוניים לצמח. לדוגמא, Chakrabarti (1995) מצא כי גידולי אורז שהושקו בשפכים עירוניים ללא טיפול או בשפכים המהולים במים שפירים, נתנו תפוקה גבוהה יותר מאותם הגידולים שהושקו במים שפירים בלבד. Chakrabarti (1995) טען כי בתחילת המחקר תפוקת הגידולים הייתה גבוהה יותר כאשר הוספו לשפכים חומרי דישון אך במשך הזמן לא היה צורך בתוספת דשנים עקב הצטברות של יסודות חיוניים ובעיקר חנקן בקרקע המושקית. השפכים העירוניים, שכמותם הולכת וגדלה (עקב גידול האוכלוסייה וצרכיה) יכולים לשמש מקור מים קבוע ויציב להשקיה בחקלאות. בעבר, הטיפול בשפכים עירוניים נעשה בעיקר בתהליך אקסטנסיבי הכולל בריכות חמצון. הטיפול ארך זמן רב ומידת הסילוק של חומר אורגני ויסודות ההזנה מהמים המטופלים הייתה נמוכה יחסית. כיום הטיפול בשפכים עירוניים נעשה בעיקר בתהליכים מכאניים-ביולוגיים אינטנסיביים המבוססים על פעילות מיקרוביאלית אווירנית. השפכים מטופלים במיכלי אוורור ביולוגיים, כשבסוף התהליך מתקבלים מי קולחים שניוניים (פאזה נוזלית) ובוצה (פאזה מוצקה). מי הקולחים מופרדים מהבוצה בתהליך שיקוע פסיקלי. הבוצה מסולקת להמשך טיפול ומי הקולחים נאגרים בבריכות או מוחדרים לקרקע חולית להמשך טיפול (הלפרין ואהרוני, 2003; Huibers and Van Lier, 2005). השפכים המטופלים, מכילים חומרים אורגנים ואי-אורגנים, שיכולים להוות מקור זיהום (תכולת המזהמים תלויה בסוג השפכים, סוג הטיפול בשפכים ובאיכותו). לנוכחות חומר אורגני ובכלל חומר אורגני מומס (חא"מ) יכולה להיות השפעה ניכרת על תהליכים כימיים, ביולוגיים ופיסיקליים בקרקע המושקית במים אלה. החא"מ מצוי באופן טבעי בקרקע, ומעצם הגדרתו כמומס, הוא נחשב לנייד ופעיל יותר מחומר אורגני מוצק הנמצא בקרקע. הוא יכול להשפיע על התהוות קרקעות (Dawson et al., 1978), בליית מינרלים (Raulund-) (Rasmussen et al., 1998), ותנועת מזהמים (Temminghoff et al., 1997; Marschner, 1999).

בסביבה מימית, חמצון החא"מ יכול להקטין את ריכוז החמצן המומס ולהשפיע על תהליכים כימיים וביולוגיים. החא"מ בקרקע נוצר בעיקר מפירוק מיקרוביאלי (ביודגרדציה) של החומר האורגני שהצטבר משאריות צמחים, משורשים וממסה מיקרוביאלית. מרבית החא"מ נוצר משאריות צמחים בשכבה העליונה של הקרקע (שכבת ה-litter) ובשכבה האורגנית הנמצאת מתחתיה (Kalbitz et al., 2000). הפרשות שורשים יכולות לגרום לעלייה בריכוז החא"מ, ובעקבותיה לעלייה בפעילות המיקרוביאלית. תוספת מסה ביולוגית כגון משק חי (חוות סוסים, מחלבות וכדומה), או שימוש בבוצה, יעלו את ריכוז החא"מ בקרקע.

ריכוז החא"מ תלוי גם בשימושי הקרקע ובתוספות הכרוכות בשימושים אילו (כגון דשנים המוספים לקרקע חקלאית), (Chantigny, 2003). לרוב, ריכוז החא"מ נמצא בקרקעות בסדר הבא: קרקעות יער < קרקעות מרעה < קרקעות חקלאיות. ההסבר לתופעה עשוי להיות קשור לפעילות פטריות, (fungi), המצויות בקרקעות יער, יותר מאשר בקרקעות חקלאיות. תוספת ליים, $(Ca(OH)_2)$, נמצאה לרוב כגורם המעלה את ריכוז החא"מ בקרקע, כאשר הסיבות לכך יכולות להיות העלאת המסיסות של החומר האורגני בקרקע (עקב עלייה ב-pH), הגברת הפעילות המיקרוביאלית, או החלפת החא"מ הספוח לחלקיקי הקרקע באניונים אחרים. מצד שני, צריכת החא"מ ע"י מיקרואורגניזם ופלוקולציה (היווצרות צברים) או ספיחה של החא"מ, יכולים לגרום לירידה בריכוזו. תוספת דשנים אי-אורגנים המכילים חנקן גורמת לעליית ה-pH, ולכן יכולה להגביר את המסיסות של החומר האורגני בקרקע, וע"י כך לגרום לעלייה בריכוז החא"מ. מצד שני, העלייה בריכוז החא"מ, יכולה להיות מבוקרת ע"י פירוק מיקרוביאלי, שיגרום לירידה בריכוזו.

החא"מ בקרקע יכול לשמש כסובסטרט למיקרואורגניזם, ולהתפרק באופן מלא או חלקי, הוא יכול לשקוע כחומר אורגני מוצק ו/או להיספח לשטח הפנים של מינרלים. למיקרואורגניזם כגון פטריות וחיידקים, תפקיד חשוב ביצירת החא"מ ובפירוקו. לדוגמא, באינקובציה בטמפרטורת החדר, שנמשכה 90 ימים, נמדדה דרגת הפירוק המיקרוביאלי של החא"מ ממקורות שונים (גבעולי תירס, קרקעות יער, כבול וקרקע חקלאית) ע"י ריכוז הפחמן הדו-חמצני שנפלט. 61-93% של החא"מ מגבעולי תירס, ומשכבת ה-litter והשכבה האורגנית של קרקעות יער, 17-32% של החא"מ מקרקעות חקלאיות, 4-9% של החא"מ מכבול ומשכבת הרקבובית (Oa) בקרקע של היער, עברו פירוק מיקרוביאלי (Kalbitz et al., 2003a). לאחר שלב הפירוק המיקרוביאלי, לא אחת נמצאה העשרה של החא"מ עצמו ושל החומר האורגני בקרקע בכלל, במרכיבים ארומטיים ואלקילים, (Baldock et al., 1992;) (Boissier and Fontvieille, 1993; Huang et al., 1999; Parlanti et al., 2000; Pinney et al., 2000).

מרכיבים הידרופיליים, כגון חומצות אמיניות ופחמימות, נמצאו קלים יותר לפירוק מיקרוביאלי, (Volk et al., 2001; Amon et al., 1997).

משטר הרטיבות, משפיע על ריכוז החא"מ וחלחולו בעומק הקרקע (Jardine et al., 1990; Easthouse et al., 1992). לדוגמה, בהרטבה של קרקעות יבשות נמצאה עלייה בריכוז החא"מ עקב זירוז הפעילות המיקרוביאלית (McDowell and Wood, 1984; Zabowski and Ugolini, 1990; Lundquist et al., 1999; Marschner and Kalbitz, 2003). מחקרי שדה הראו שריכוז החא"מ ותנועתו יורדים משמעותית עם עלייה בעומק הקרקע (Michalzik and Matzner, 1999). ריכוזים נמוכים של חא"מ בעומק הקרקע מיוחסים לפירוק מיקרוביאלי בשכבות הקרקע העליונות, כמו גם לספיחה של החא"מ על מרכיבי הקרקע המוצקים כגון מינרלים, חרסיות וחומר אורגני. אוקסידים והידרוקסידים של ברזל ואלומיניום, המצויים במקטע המינרלי, יכולים לספוח אליהם חא"מ, כאשר הספיחה מוגבלת במספר האתרים הסופחים ובחלקה הגדול אינה הפיכה (Gu et al., 1994). ריכוז הפרוטונים (pH) בקרקע, יכול להשפיע על ריכוז החא"מ. במרבית המחקרים שנערכו בתנאי מעבדה, נמצא שעלייה ב-pH, גרמה לעלייה בריכוז החא"מ (Jozefaciuk et al., 1996; You et al., 1999). לעומת זאת, בניסויי שדה לא נמצאה השפעה ברורה של ה-pH על ריכוז החא"מ (Liechty et al., 1995; Chapman et al., 1999; Michalzik and Matzner, 1999).

חוזק יוני של תמיסת הקרקע, יכול גם הוא להשפיע על ריכוז החא"מ. התמוססות של החומר האורגני בקרקע, יכולה להיות מעוכבת בחוזק יוני גבוה, עקב פלוקולציה של החומר האורגני (Tipping and Hurley, 1988) אך מצד שני, תחרות בין החא"מ לאניונים אחרים, עלולה לשחרר חא"מ מאתרים סופחים ולכן להגדיל את ריכוזו בקרקע. השפעת החוזק היוני, קשורה בהכרח ל-pH בקרקע, כפי שדווח ע"י Wiklander (1975); Fotovat and Naidu (1998); Kaiser and Kaupenjohann (1998).

החא"מ בקרקע עלול לזרוז תנועת מזהמים אורגנים ואי אורגנים. תוספת של חא"מ ע"י שימוש בבוצה או השקיה במי קולחים, עשויה להגביר את תנועת המזהמים בקרקע ולגרום לזיהומה ולזיהום מי התהום (Han and Thompson, 1986; Graber et al., 1995; Gooddy et al., 1995; Mingelgrin and Bigger, 1999; Vulkan et al., 2002).

2.2 אפיון החא"מ:

2.2.1 הגדרה:

חא"מ מצוי במערכות מים טבעיות כגון אגמים נהרות ומי תהום, כמו גם בקרקעות, במי קולחים, בקומפוסט ובבוצה. אפיון החא"מ מהמקורות המגוונים, נעשה בשיטות דומות והמידע המתקבל הינו כמותי, כמו גם איכותי, ומאפשר השוואה בין סוגי החא"מ השונים. הגדרה מעשית ורווחת של החא"מ היא החומר האורגני המומס בתמיסה מימית ועובר ממבראנה בגודל נקבובים של $0.45 \mu\text{m}$ (Bolan et al., 2004; Zsolnay, 2003).

2.2.2 קביעת ריכוז החא"מ:

השיטות לקביעת ריכוז החא"מ במערכות קרקע ומים מחולקות לשלוש קבוצות: ספקטרופוטומטריה, חמצון רטוב ושריפה יבשה (Bolan et al., 2004). בשימוש בספקטרופוטומטריה, נבדקת בליעת אור ע"י החא"מ, תוך שימוש בספקטרופוטומטר באורך גל של 250 nm. בליעת האור תלויה בהרכבו של החא"מ, ה-pH של הדוגמה, ובנוכחות חומרים אי-אורגנים כגון אוקסידים של ברזל, המסוגלים לבלוע אור באורך גל זה. חומרים אורגנים שונים הנמצאים בחא"מ הם בעלי קבועי בליעה שונים, ולכן כמויות יחסיות שונות של חומרים אילו בחא"מ, יכולות לגרום לשוני בבליעת האור ללא קשר לריכוז החא"מ (Moore, 1987).

חמצון רטוב של החא"מ, נעשה ע"י שימוש במחמצן חזק וחיסום מתאים (לדוגמה דיכרומאט; חמצן מוליקולרי). ריכוז החא"מ מחושב בהתאם לכמות המחמצן שנצרכה או בהתאם לכמות הפחמן הדו חמצני שנפלטת בחמצון. Meili (1992) מצא שכמות החא"מ שעוברת חמצון בשיטה זו, משתנה בהתאם למקור החא"מ כתוצאה מהשוני בכמות הפחמן האורגני המומס (פא"מ).

שריפה יבשה היא למעשה חמצון יבש בטמפרטורה גבוהה, בנוכחות חמצן. כמות הפחמן הדו חמצני שנפלטת בשריפה, מחושבת לרוב ע"י גלאי אינפרא אדום, או גלאי מוליכות תרמית (TCD). שיטה זו היא המדויקת ביותר, עם שגיאה של 1-2% (Chen and Wangersky, 1993).

2.2.3 הפרדת החא"מ למקטעים:

הפרדת החא"מ למקטעים נעשית עפ"י תכונות ספיחה לשרפים בעלי תכונות שונות, ו/או עפ"י גודל מוליקולרי. ההפרדה למקטעים עפ"י תכונות ספיחה, מתבצעת בעזרת שרפים (resins) בעלי תכונות כימיות שונות כגון שרף הידרופובי, שרף מחליף אניונים ושרף מחליף קטיונים. Leenheer (1981) ביצע הפרדה של חא"מ ממקורות מים

טבעיים וממי קולחים ל-6 מקטעים: בסיסים, חומצות וניטרליים הידרופוביים, ובסיסים חומצות וניטרליים הידרופיליים. החא"מ הועבר ראשית דרך שרף הידרופובי א-יוני. התסנין שלא עוכב על השרף, נאסף. ע"י שטיפת הקולונה בכיוון ההפוך, באמצעות חומצה כלורית (0.1 N), התקבל מקטע הבסיסים ההידרופוביים. התסנין הוחמץ ל-pH 2 והועבר שוב דרך השרף, יחד עם חומצה כלורית (0.01 N). מקטע החומצות ההידרופוביות, שנספח לשרף, הוסר ממנו באמצעות סודיום הידרוקסיד (0.1 N), ע"י שטיפת הקולונה בכיוון ההפוך. מקטע הניטרלים ההידרופוביים, שנספח גם הוא לשרף, הוסר ממנו ע"י ייבוש השרף ומיצוי בשיטת סוקסלט (Smith, 1994) עם מתאנול יבש. התסנין שלא נספח לשרף, הכיל בשלב זה את שלושת המקטעים ההידרופיליים. העברת התסנין דרך שרף מחליף קטיונים, גרמה לספיחה של מקטע הבסיסים ההידרופיליים. מקטע זה הוסר מהשרף ע"י שטיפה באמוניום הידרוקסיד (1 N). התסנין שלא נספח לשרף, הועבר דרך שרף מחליף אניונים. מקטע החומצות ההידרופיליות, בנוסף לאניונים אי-אורגניים שנספחו לשרף, הוסרו ממנו ע"י שטיפת הקולונה בכיוון ההפוך באמצעות אמוניום הידרוקסיד (3 N). האניונים האי-אורגניים הופרדו ממקטע החומצות ההידרופיליות, ע"י נידוף בואקום והחמצה ל-pH 1, ולאחר מכן העברה נוספת של התמיסה דרך השרף, יחד עם חומצה כלורית (0.1 N). התסנין שעבר דרך השרף מחליף האניונים, הכיל את מקטע הניטרליים ההידרופיליים. השיטה הוכחה כיעילה עם 81% השבה (recovery) של החא"מ בסוף התהליך.

Imai וחבריו (2001) השתמשו בשיטה זו, והפרידו חא"מ ממקורות שונים, ל-5 מקטעים, (במקרה זה לא הופרדו הבסיסים ההידרופוביים מהבסיסים ההידרופיליים, מכיוון שעפ"י הממצאים הקודמים של החוקרים, הם הסיקו שחא"מ ממקורות מימיים מכיל כמות זניחה של בסיסים הידרופוביים): חומצות הומיות (הידרופוביות), ניטרליים הידרופוביים, חומצות הידרופיליות, בסיסים, וניטרליים הידרופיליים. היחס בין המקטעים, השתנה בין מקורות החא"מ המגוונים. בחא"מ שהופק ממי אגם, משדות אורז ומשפכים לפני ואחרי טיפול, המקטע העיקרי היה זה של החומצות ההידרופיליות, ולעומת זאת בחא"מ שהופק מקרקעות וממי נהר, המקטע העיקרי היה זה של החומצות ההידרופוביות.

Ma וחבריו (2001) הפרידו חא"מ ממי אגמים ונהרות, וממי קולחים שהתקבלו לאחר טיפול במתקן טיהור, ל-3 מקטעים: מקטע החומצות ההומיות (HA), מקטע הידרופילי (HyI), ומקטע החומצות הפולביות (FA). החמצת החא"מ ל-pH 1, גרמה לשקיעת מקטע החומצות ההומיות. המשקע הופרד מהתמיסה, והתמיסה שנותרה הובאה ל-pH 2, והועברה דרך שרף הידרופובי. בשלב זה הופרד המקטע ההידרופילי, שלא נספח לשרף, ממקטע החומצות הפולביות שנספח לשרף. המקטע ההידרופילי, הועבר דרך שרף מחליף קטיונים, ומקטע החומצות

הפולביות הוסר מהשרף ע"י החמצה ל-pH 2, ולאחר מכן, הועבר גם הוא דרך שרף מחליף קטיונים. מרבית החא"מ ממי האגמים והנהרות, נמצא במקטע החומצות הפולביות, ושארית החא"מ התחלקה באופן דומה בין המקטע ההידרופילי למקטע החומצות ההומיות. לעומת זאת, חא"מ ממי קולחים נמצא ברובו במקטע ההידרופילי, (כ-60%) ומקטע החומצות ההומיות נמצא זניח.

הפרדת החא"מ למקטעים עפ"י גודל מוליקולרי, מבוצעת באולטראפילטריציה עם ממברנות סלקטיביות, או ע"י שימוש בכרומטוגרפית ג'ל.

בשימוש באולטראפילטריציה, כל ממבראנה מאופיינת בגודל חרירים מסוים, (Molecular Weight Cut Off-), כן שמתקבל תרכיז של החא"מ שלא עבר את הממבראנה (חא"מ < MWCO), ותסנין שעבר דרך הממבראנה (חא"מ > MWCO).

Marschner and Bredow (2002) ביצעו הפרדה של חא"מ מקרקע חולית (ריכוז פחמן אורגני 6.4%), לפני עיקור ואחריו, עם ממבראנות בגודל חרירים של 10 kDa, ו-1 kDa. מקטע הגודל הקטן (< 1 kDa), היווה כ-20% מכלל החא"מ, ושני מקטעי הגודל האחרים היו בעלי תרומה דומה. הבליעה ב-UV (280 nm) המהווה מדד לריכוז השיירים הארומטים, הייתה הגבוהה ביותר עבור חא"מ במקטע הגודל < 10 kDa, כאשר דוגמאות חא"מ ללא עיקור הראו בליעה גבוהה יותר מאילו שעברו עיקור. Rosenstock וחבריו (2005) ביצעו הפרדה של חא"מ ממי האוקיינוס האטלנטי, על ממבראנה בגודל חרירים של 3 kDa, ובנוסף הפרידו מכל מקטע גודל את המקטע ההומי (הידרופובי), מהמקטע הלא הומי (הידרופילי). הם מצאו שהמקטע ההידרופילי הקטן מ-3 kDa, היה המועדף לפירוק ע"י בקטריות.

בכרומטוגרפית ג'ל, נעשה שימוש בעמודה המכילה ג'ל המורכב מחלקיקים קטנים בעלי גודל נקבוביות מוגדר (פאזה נחה). החומר שאותו רוצים להפריד, מומס בתמיסה (פאזה נעה), ומועבר דרך העמודה. מולקולות קטנות יכולות להיכנס לתוך הנקבוביות ולכן מעוכבות בעמודה, בעוד שמולקולות גדולות יותר אינן מעוכבות ולכן יוצאות מהעמודה בזמן קצר יותר. החומר הנבדק מופרד בתוך העמודה למקטעי גודל שאותם מאפיינים לאחר מכן בשיטות ספקטרוסקופיות כגון בליעת אור בתחום UV או פלואורסצנטיה. Lin וחבריו (1995) השתמשו בשיטה להפרדת חומצות פולביות מנהר ומאגר מים. נמצא שחא"מ מנהר הכיל מולקולות בגודל 100-4000 דלתון, בעוד שהחא"מ ממאגר המים הכיל מולקולות בגודל 100-8000 דלתון.

מורכבותו הרבה של החא"מ גורמת לקושי באפיונו. תכונות ייחודיות כגון קשירת מזוהמים או ספיחה לחלקיקי הקרקע, יכולות להשתנות בין החומרים השונים המרכיבים את החא"מ ולכן הפרדה למקטעים, מאפשרת אפיון מדויק ונקודתי יותר של החא"מ.

2.2.4 תכונות ספקטרוסקופיות של החא"מ:

2.2.4.1 אנליזת NMR:

ספקטרוסקופיית NMR, נחשבת לשיטה חשובה לזיהוי מרכיבי החא"מ. אע"פ שהספקטרום המתקבל מאופיין בפיקים רחבים וקשים לפענוח, הוא עדיין מספק כמה "טביעות אצבעות" חשובות של קבוצות פונקציונאליות בחא"מ. ניתן להבחין במבנים ארומטיים או אליפטיים ובכאלה המכילים חמצן ולהבדיל בין חא"מ ממקורות שונים. Gigliotti וחבריו (2002) מצאו שחא"מ מהקרקע עשיר בחומרים ארומטיים יותר מחא"מ משפכים שנמצא יותר אליפטי. Lu וחבריו (2005) השתמשו בחא"מ ממי תהום, כעוקב טבעי (tracer), לזיהוי מקור הניטראט במים. תוך שימוש ב- $^1\text{H-NMR}$, הם מצאו הבדלים בין חא"מ ממי תהום שזוהמו בפסולת של מחלבה (בע"ח), לבין חא"מ ממי תהום שזוהמו בדשנים (קרקע חקלאית). מי התהום מהמקור הראשון (מחלבה), הראו פיקים עיקריים בהיסט של 3.2-3.6 ppm, בעוד שמי התהום מתחת לקרקע חקלאית הראו פיקים עיקריים בהיסט בשדה נמוך יותר (4-4.3 ppm).

Ma וחבריו (2001) בדקו חא"מ ממקורות מים טבעיים ומשפכים לאחר טיפול. הם ביצעו הפרדה של החא"מ ל-3 מקטעים: חומצות הומיות (HA), חומצות פולביות (FA) ומקטע הידרופילי (HyI). המקטע ההידרופילי בכל דוגמאות החא"מ, נמצא עשיר בחומרים אליפטיים פשוטים יחסית, ועני בחומרים ארומטיים. בחא"מ ממתקן הטיהור, המקטע ההידרופילי הראה פיקים חדים וברורים יותר כלומר מבנה פשוט יחסית של החא"מ ביחס לחא"מ מהדוגמאות האחרות. Barber וחבריו (2001) אפיינו חא"מ מקרקעות חוליות שהוחדרו אליהן שפכים לאחר שעברו טיפול ברמות שונות (כאמור, החדרת השפכים המטופלים לקרקע מאפשרת טיהור נוסף שלהם). לאחר החדרת השפכים המטופלים לקרקע, נצפתה ירידה בריכוז של חומרים אורגנים כגון אלקילבנזנים בחא"מ. החא"מ שהתקבל מקרקעות לאחר החדרת קולחים, אופיין ע"י $^{13}\text{C-NMR}$, כיותר ארומטי ויותר מחומצן. מחקרים נוספים אפיינו את הקשר בין ביודגרדציה להרכב החא"מ, והראו שחומרים ארומטיים מתפרקים לאט יותר בקרקע, ונמצאים בעיקר במקטע ההידרופובי של החא"מ, (Kalbitz et al., 2003a, 2003b; Kaiser et al., 2001).

2.2.4.2 אנליזת FTIR:

המידע המתקבל מספקטרום ה-FTIR, בדומה לאנליזת $^1\text{H-NMR}$, הינו "טביעות אצבע" של קבוצות פונקציונאליות המצויות בחא"מ. מיקום הפיקים המתקבלים באנליזה זו, יכול לעיתים לאפיין יותר מסוג אחד של קבוצות פונקציונאליות, ולכן ניתוח הספקטרום עלול להיות פחות מדויק. בניגוד לאנליזת $^1\text{H-NMR}$, ניתוח הספקטרום במקרה זה הינו איכותי בלבד.

בהשוואה בין קרקע חולית שטופלה בקומפוסט מאשפה עירונית, (MSW), לאותה הקרקע ללא טיפול בקומפוסט, Kaschl וחבריו (2002a) מצאו שחא"מ משתי הקרקעות הכיל פיקים המאפיינים קשר H-C בחומרים אליפטיים ובפוליסוכרים, (1360 cm^{-1} ו- $1100-1000\text{ cm}^{-1}$ בהתאמה), אך בקרקע שטופלה בקומפוסט נמצאו פיקים בעוצמות גבוהות יותר שמאפיינים קשר C=O של קרבוניל/קטון או קשר C=C ארומטי ($1650-1600\text{ cm}^{-1}$), מיתוח סימטרי של קבוצת COO^- ו-C-H אליפטי ($1420-1380\text{ cm}^{-1}$), ופיק נוסף המאפיין CH_2 אליפטי ו/או C-O אליפטי של כהל. בקרקע אורגנית שנבדקה לאחר טיפול בקומפוסט או בלעדיו, ההבדלים בספקטרום היו קטנים יותר. Ilani וחבריה (2005) מצאו שבמקטע החומצות ההידרופוביות של חא"מ ממי קולחים ומקומפוסט, הפיק הדומיננטי היה שייך לקרבוניל של חומצות קרבוקסליות ($1716-1720\text{ cm}^{-1}$, 1652 cm^{-1}). לעומת זאת במקטע של הניטרליים ההידרופובים לא נמצא פיק זה והפיקים הדומיננטיים היו שייכים לקבוצות אליפטיות וארומטיות, ($2960-2850\text{ cm}^{-1}$, 1660 cm^{-1} , 1440 cm^{-1}). לאחר הפרדת גודל של הדוגמאות בממבראנה בגודל 1000 דלתון, נמצאה עלייה בעצמת הפיקים השייכים לפוליסוכרים ($1000-1100\text{ cm}^{-1}$) ופחמנים ארומטיים (1620 cm^{-1}), בהשוואה לפיקים המייצגים קרבוקסיל C=O וקשר C-H רווי.

2.2.4.3 תכונות פלואורסצנטיות של החא"מ:

החא"מ הוא בעל תכונות אופייניות, הכוללות בליעה חזקה בתחום ה-UV ופליטה פלואורסצנטית. ספקטרוסקופיה פלואורסצנטית אינה שיטה הרסנית ונחשבת לשיטה מהירה, שאינה דורשת כמויות גדולות של דוגמה. הפלואורסצנטיה של החומר נובעת מהרכבו הכימי, מנוכחות קבוצות ארומטיות, קשרים כפולים מצומדים ואלקטרונים לא מצומדים בצורונים שונים. אנליזה זו, מספקת סוגים שונים של מידע הכוללים ספקטרום פליטה (Emission Spectra), שמודד את התפלגות אנרגית הפליטה, עבור עירור באורך גל קבוע, ספקטרום עירור (Excitation Spectra), המודד את עצמת הפליטה באורך גל מסוים, כתלות באורך גל העירור, ספקטרום מסונכרן (Synchronous Scan), המספק נתוני בליעה עבור עירור באורכי גל שונים, כאשר ההפרש בין האורך

גל לעירור, לבין אורך הגל הנמדד לפליטה, נשאר קבוע, ומפת עירור ופליטה תלת ממדית (Excitation-Emission Matrix-EEM).

Kalbitz וחבריו (2003a, 2003b) אפיינו את החא"מ מקרקעות שונות לפני ואחרי אינקובציה (90 ימים בטמפרטורת החדר). בליעה ספציפית ב-280 nm אפיינה את הארומטיות של החא"מ, ועלתה במהלך האינקובציה. תוך התבססות על ההנחה שכאשר קבוצות פלואורסצנטיות בחא"מ הופכות לפחות רוויות (יחס פחמן/מימן גבוה), ספקטרום הפליטה נוטה לאורכי גל ארוכים יותר, (עפ"י Zsolnay וחבריו, 1999), הם חישבו את אינדקס ההומיפיקציה, (HIX_{em}) המוגדר כיחס השטח מתחת לספקטרה באזור 435-480 nm, לבין השטח מתחת לספקטרה באזור 300-345 nm, ע"י מדידת ספקטרום הפליטה (עירור ב-280 nm). אינדקס ההומיפיקציה נמצא בקורלציה חיובית עם אחוז החא"מ שעבר פירוק ביולוגי במהלך האינקובציה.

McKnight וחבריו (2001) הבדילו בין חומצות הומיות ממקורות שונים. לשם כך, הם השתמשו באינדקס פלואורסצנטיה, המחושב ע"י היחס בין עצמת הפליטה ב-450 nm לזו שב-500 nm, תוך עירור ב-370 nm. חומצות הומיות מנחלים ונהרות (שבמימיהם הייתה תרומה של חומר אורגני מקרקעות), הראו אינדקס פלואורסצנטיה נמוך יותר, לעומת חומצות הומיות מאגמים, (שבמימיהם הייתה תרומה של חומר אורגני שמקורו בפעילות מיקרוביאלית). חומצות הומיות מאגמים הראו פיקים של פליטה באורכי גל נמוכים יותר, מחומצות הומיות מנחלים ונהרות. Reynolds וחבריו (2002) הציעו את השימוש בספקטרוסקופיה פלואורסצנטית, כשיטת מעקב אחר איכותם של שפכים בזמן הטיפול בהם. הם מדדו את ספקטרום הפליטה (עירור ב-280 nm), של דוגמאות חא"מ משפכים עירוניים ותעשייתיים, לפני ואחרי טיפול. ספקטרום הפליטה של השפכים לפני הטיפול, הראה פיקים ב-350 nm וב-440 nm, ובספקטרום הפליטה של השפכים לאחר טיפול, נצפתה ירידה בעצמת הפיק הראשון, בעוד שעוצמת הפיק השני לא השתנתה. מכך הם הסיקו שהפיקים מייצגים חא"מ שעובר פירוק ביולוגי, וחא"מ העמיד בפני פירוק ביולוגי בהתאמה. החוקרים מצאו גם קורלציה חיובית בין צריכת החמצן הביולוגית (BOD), (המייצגת את כמות החמצן הנצרכת כאשר חומר אורגני מפורק ע"י מיקרואורגניזם), צריכת החמצן הכימית (COD), (המייצגת את כמות החמצן הנדרשת לחמצון החומרים בשפכים), וריכוז הפחמן האורגני (TOC), לבין עוצמת הפלואורסצנטיה הכללית וזו שב-350 nm.

Cilenti וחבריו (2005) מצאו ירידה משמעותית בעוצמת הפלואורסצנטיה (ע"י מדידת ספקטרום פליטה, בליעה וספקטרום מסונכרן), עבור דוגמאות חא"מ, (מקטע הידרופובי ומקטע הידרופילי), מקרקעות שהיו נתונות לתנאי המלחה, לעומת קרקע שלא הייתה נתונה לתנאים אלה. רק במדידת הספקטרום המסונכרן

$(\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 18 \text{ nm})$, הם מצאו גם הבדלים בין המקטע ההידרופובי למקטע ההידרופילי בקרקעות אלה. המקטע ההידרופילי, הראה פיק חזק באורך גל 344 nm, ואילו המקטע ההידרופובי הראה שני פיקים באורכי גל ארוכים יותר 386 nm, 447 nm.

Chen, W. וחבריו (2003) אפיינו חא"מ מדוגמאות של שפכים עירוניים מטופלים ומדוגמאות מים שפירים. הם בנו מפה פלואורסצנטית תלת ממדית, (עירור באורכי גל 280-550 nm, ופליטה באורכי גל 200-400 nm), וחילקו אותה ל-5 אזורים המאופיינים באורכי גל לעירור ופליטה שונים (תוך התבססות על מחקרים קודמים). אזורים 1,2 אפיינו חלבונים ארומטיים פשוטים (פליטה באורכי גל נמוכים מ-350 nm, ועירור באורכי גל נמוכים מ-250 nm), אזור 3 אפיינו חומרים דמויי חומצות פולביות (פליטה באורכי גל גבוהים מ-350 nm, ועירור באורכי גל נמוכים מ-250 nm), אזור 4 אפיינו חומרים דמויי תוצרי פירוק מיקרוביאליים כגון טריפטופן (פליטה באורכי גל נמוכים מ-380 nm, ועירור באורכי גל 250~280 nm), והאזור ה-5 אפיינו חומרים דמויי חומצות הומיות (פליטה באורכי גל גבוהים מ-380 nm, ועירור באורכי גל גבוהים מ-280 nm).

ע"י אנליזה מתמטית של המפה הפלואורסצנטית, שכללה חישוב הנפח של האזורים השונים, הם העריכו בצורה כמותית את דרגת הפלוריסנציה בדוגמאות השונות, והשוו בין האזורים השונים במפה. בדוגמאות חא"מ משפכים מטופלים, נמצא שהנפח הכולל של האזורים, היה גבוה בהרבה מזה של חא"מ מדוגמאות מי שתייה. בדוגמאות חא"מ משפכים מטופלים, לעומת דוגמאות חא"מ ממי שתייה, נמצאה עלייה בנפח באזורים 1,2, המאפיינים חומרים דמויי חלבונים ארומטיים, כתוצאה מפירוק מיקרוביאלי, המתרחש בזמן הטיפול בשפכים.

Saadi וחבריו (2006) אפיינו מי קולחים, שהופקו משפכים עירוניים, לפני ואחרי אינקובציה (4-2 חודשים בטמפרטורה של 25°C). מפת הפלואורסצנטיה שהופקה לפני שלב האינקובציה, הראתה שלושה פיקים מרכזיים, בדומה ל-Chen, W. וחבריו (2003). שני הפיקים שנצפו בפליטה באורכי גל 430-437 nm, ובעירור באורכי גל 330-339 nm ו-249-281 nm, אפיינו חומרים דמויי חומצות הומיות/פולביות. הפיק השלישי נצפה בפליטה באורכי גל 346-359 nm, ועירור באורך גל 281 nm, יוחס לחומרים דמויי חלבונים. במשך זמן האינקובציה, נצפתה עלייה בעוצמת הפיקים. החוקרים סברו שהפירוק הביולוגי שהתרחש, היה של חומרים שאינם פלואורסצנטים, ותוצריו היו חומרים פלואורסצנטים, העמידים בפני פירוק.

2.3 אפיון החא"מ במי קולחים:

בעבודות מוקדמות שבהם נבדקו מי קולחים שניוניים (Rebhun and Manka, 1971; Manka et al., 1974) מצאו החוקרים כי החא"מ במי הקולחים מכיל בעיקר חומרים הומיים (40-50%) הכוללים חומצות הומיות, פולביות וחומצות Hymathomelanic, וכ-50% מכלל החומרים ההומיים היו חומצות פולביות. שארית החא"מ כללה חלבונים (כ-22%), פחמימות (כ-12%), דטרגנטים אניונים (כ-14%), חומרים הממוצים באתר (כ-8%) וחומרים פוליפנוליים-Tannin (כ-2%). מרב החומרים ההומיים היו בעלי משקל מולקולרי של 1000-5000 דלתון. החומצות ההומיות היו במשקל מולקולרי גבוה יותר (10000-50000 דלתון). הקבוצות החומציות בחא"מ היו בעיקר קרבוקסיליות ונמצאו גם קבוצות הידרוקסיליות באחוז קטן יותר.

Namour and Müller (1998) אפיינו את החא"מ ממי קולחים שניוניים לפני ואחרי 21 ימים של פירוק ביולוגי בנוכחות מיקרואורגניזם אירוביים ובטמפרטורה של 20°C. החוקרים הפרידו את החא"מ למקטע הידרופובי ולמקטע הידרופילי שכלל חומצות, בסיסים וחומרים ניטרלים. לפני הפירוק הביולוגי החא"מ כלל: 45-50% מקטע ההידרופובי (חומרים הומיים), 18-27% בסיסים הידרופיליים (חומצות אמיניות, חלבונים וסוכרים אמיניים), 5-13% חומצות הידרופיליות (בעיקר חומצות קרבוקסיליות ומוליקולות קטנות כגון סוכרים פשוטים, אלכוהול ופוליסוכרים) ו-12-27% ניטרלים הידרופיליים. לאחר הפירוק הביולוגי, המקטע ההידרופובי עלה בכ-40% והמקטע ההידרופילי ירד ב-50-80% מהרכב ההתחלתי. החוקרים גרסו כי חומרים הידרופיליים הם המועדפים לפירוק ביולוגי שבסופו נותרים החומרים ההידרופוביים, בעיקרם ארומטים, העמידים בפני פירוק ביולוגי.

Ma וחבריו (2001) הפרידו חא"מ ממי קולחים שניוניים לחומצות הומיות, חומצות פולביות ומקטע הידרופילי. החא"מ ממי קולחים הכיל 55.8% חומרים הידרופיליים, 42.5% חומצות פולביות ו-1.7% חומצות הומיות. אנליזת ¹H-NMR של המקטע ההידרופילי ושל החומצות הפולביות הראתה שהם ברובם אליפטים (91.8% ו-83% בהתאמה).

Ilani וחבריה (2005) אפיינו את החא"מ שהופק ממי קולחים לאחר טיפול אינטנסיבי במיכלי אוורור ביולוגיים, ולאחר טיפול אקסטנסיבי בכריכות חמצון. החא"מ שהתקבל ממי הקולחים לאחר הטיפול האינטנסיבי הכיל 33% מקטע הידרופילי ו-67% מקטע הידרופובי, והחא"מ שהתקבל ממי הקולחים לאחר טיפול אקסטנסיבי הכיל 62% מקטע הידרופילי ו-38% מקטע הידרופובי. מרבית המקטע ההידרופובי, בשני הטיפולים, כלל חומצות (88% במי

הקולחים לאחר טיפול אינטנסיבי ו-76% במי הקולחים לאחר טיפול אקסטנסיבי). מקטע החומצות ההידרופוביות של מי הקולחים שהתקבלו לאחר טיפול אינטנסיבי היו עשירים יותר בקבוצות קרבוקסיליות, לעומת מי הקולחים שהתקבלו לאחר טיפול אקסטנסיבי שהיו עשירים יותר בפוליסוכרים ובמבנים אליפטיים אחרים ובעלי אחוז נמוך יותר של קבוצות קרבוקסיליות. מקטע הניטרליים ההידרופוביים היה דומה בשני סוגי מי הקולחים והכיל בעיקר מבנים אליפטיים וריכוז נמוך של קבוצות פולריות.

2.4 קשירת מיקרו-מזהמים אורגנים ואי-אורגנים לחא"מ:

החא"מ יכול להשפיע על מזהמים שונים בסביבתו, ולגרום להגברת ניידותם. חומרים אורגנים אפולריים, כגון פחמימנים ארומטיים פוליציקלים (PAH's) וחומרי הדברה, יכולים להיספח לקבוצות הידרופוביות של החא"מ בקרקע ובמי התהום. Carter וחבריו (1982) בדקו קשירה של DDT לחומצות הומיות, בשימוש בשקיות דיאליזה, ומסקנתם הייתה שחוזק הקשר הנ"ל תלוי בריכוז החא"מ, בהרכבו, ב-pH, בחוזק יוני ובריכוז הסידן. Chiou וחבריו (1986) הראו שהקשירה של חומרי הדברה שונים לחומצות הומיות ופולביות, הייתה תלויה בגודלן המולקולרי ובפולאריות שלהן. גודל מולקולרי נמוך ופולריות נמוכה יחסית, הגבירו את קשירתם של חומרי הדברה. בניסוי בעמודות קרקע, מצאו Magee וחבריו (1991) עלייה בניידות ה-phenantren כתלות בריכוז החא"מ. Graber וחבריה (1995) מצאו ריכוזים גבוהים של חומרי הדברה בקרקעות שהושקו במי קולחים, בהשוואה לקרקעות דומות שהושקו במים שפירים. מכיוון שמרבית חומרי הדברה נמצאו במי התהום ו/או מתחת לשכבת השורשים (Root Zone), החוקרים הסיקו כי ניידותם של חומרים אלו מתרחשת בנוכחות החא"מ המצוי במי הקולחים ששימשו להשקיה (Graber et al., 2001).

Seol and Lee (2000) בחנו את ההשפעה של תוספת חא"מ לקרקע, עקב השקיה במי קולחים, (משפכים עירוניים או מפסולת של חוות חזירים). החוקרים מצאו שההשקיה במי קולחים, הגבירה את תנועתם של המזהמים האורגנים atrazine ו-prometryn, וטענו שהסיבה לכך היא שהחא"מ קושר את המזהמים ומונע את ספיחתם על חלקיקי הקרקע. Ilani וחבריה (2005) בחנו את האינטראקציות בין חא"מ ממי קולחים שניוניים (מי קולחים שהתקבלו לאחר טיפול אקסטנסיבי ומי קולחים שהתקבלו לאחר טיפול אינטנסיבי כמתואר בסעיף 2.1), לבין מזהמים הידרופוביים (חומרי הדברה (s-triazine) ופחמימנים ארומטיים פוליציקליים (PAH's)). החא"מ הופרד למקטעים עפ"י המתואר ע"י Leenheer (1981) והמקטעים שנבחרו היו מקטע החומצות ההידרופוביות ומקטע הניטרליים ההידרופוביים. מקטע הניטרליים ההידרופוביים הראה את הספיחה החזקה ביותר לכל

המזהמים. מקדמי הספיחה הגבוהים ביותר במקטע זה נמצאו עבור חומרי ההדברה, והנחת החוקרים הייתה שהקשירה תלויה באינטראקציות הידרופוביות ולא בקשרי מימן. מי הקולחים שהתקבלו לאחר טיפול אינטנסיבי, הראו מקדמי ספיחה גבוהים יותר למזהמים מכיוון שהכילו אחוז גבוה יותר של המקטעים ההידרופוביים (חומצות וניטרליים הידרופוביים) מזה של מי הקולחים שהתקבלו לאחר טיפול אקסטנסיבי.

החא"מ יכול לקשור מתכות, ובפרט מתכות מעבר. הדבר גורם לשינוי בזמינות הביולוגית שלהן ולהעלאת מסיסותן וניידותן בחתך הקרקע ולהגברת רעילותן (בניגוד לקשירת המתכות לחומר אורגני מוצק בקרקע, או למינרלים, שמורידה את מסיסותן). קשירת מתכת לחא"מ, תלויה בתכונותיו, גודלו המולקולרי, הפולריות והארומטיות שלו. חא"מ בעל גודל מולקולרי גבוה, גם אם יוכל לקשור אליו כמות גדולה יותר של מתכות, סביר שיספח יותר לחלקיקי הקרקע ויהפוך לפחות נייד (Hoffmann, 1998).

מתכות מעבר בתמיסת הקרקע, יכולות להימצא כחופשיות, (יונים ממוימים), או בקומפלקסים אורגנים או אי-אורגנים. Vulkan וחבוריה (2002) הראו כי מתכות מעבר כגון Ni, Fe, Cu ו-Pb, הן בעלות נטייה חזקה יותר ליצירת קומפלקסים עם חא"מ מבוצת שפכים, בעוד שהנטייה של Cd, הייתה חלשה יותר.

Kalbitz and Wennrich (1998) מצאו שהחא"מ בקרקע המזוהמת בשפכים תעשייתיים שהכילה ריכוז גבוה של מתכות כבדות, זירז את תנועת המתכות בחתך הקרקע. בנוסף לתכונות הקרקע (כגון ריכוז מתכות, חרסיות, אוקסידים וחוזק יוני), תנועתן של Cu, Cr, Hg ו-As הייתה תלויה בריכוז החא"מ בקרקע. לעומת זאת, תנועתן של Zn ו-Cd, הייתה תלויה רק ב-pH של הקרקע ולא בריכוז החא"מ.

עבודה זו תדון בקשירת מתכות (נחושת) ע"י החא"מ והרחבה בנושא זה תינתן בהמשך.

2.5 שיטות לקביעת מדדי קומפלקסציה בין מתכות לבין חא"מ:

2.5.1 Anodic stripping voltammetry

השיטה מבוססת על חיזור יוני המתכת שבתמיסה. אלקטרודה אינרטי (לרוב אלקטרודת כספית או פלטינה), הנמצאת בפוטנציאל שלילי, מחזרת את יוני המתכת הנעים בתמיסה. לאחר זמן מסוים, המתכות המחוזרות שהתאספו על האלקטרודה, עוברות חמצון מחדש. הזרם המתקבל, נמצא ביחס ישר לריכוז יוני המתכת. ההנחה העיקרית בשיטה זו, היא שקצב חיזור יוני המתכת החופשיים, מהיר מאוד, בעוד שקצב פירוק הקומפלקס חא"מ-מתכת, איטי הרבה יותר. בשיטה מתקבל למעשה ריכוז המתכת הנעה בתמיסה (labile), ולכן דרושים חישובים נוספים ע"מ לקבל את ריכוז המתכת החופשית בתמיסה

(Cheng et al., 2005). הבעיה בשיטה היא שייתכן פירוק של הקומפלקס הנוצר בין החא"מ למתכת, כמו גם פירוק של החא"מ עצמו. Wu וחבריו (1997) השתמשו במדידות שנעשו באמצעות אלקטרודת פלטינה, כדי לחשב את הריכוז החופשי של יוני כספית במי נהרות, ומצאו שהקומפלקסיה החזקה בין חא"מ לכספית היא גורם חשוב המשפיע על צורוני הכספית המצויים במים טבעיים. Rozan וחבריו (1999) השתמשו בשיטה זו, (ובשיטות נוספות), ע"מ לבדוק ריכוז יוני נחושת במי נהרות, ומצאו שחא"מ וסולפיד היו גורמי הקומפלקסיה העיקריים לנחושת.

במי ים, מצאו Coale and Bruland (1988) שני סוגי ליגנדים האחראיים לקשירת נחושת. סוג ראשון של ליגנדים הקושרים חזק נחושת (קבוע יציבות הקומפלקס היה 11.5), נמצאו במי הים הרדודים, וריכוזם היה נמוך (~1.8 nM), וירד עם העלייה בעומק, וסוג שני של ליגנדים הקושרים נחושת חלש יותר (קבוע יציבות הקומפלקס היה 8.5), נמצאו במים החופשיים ובריכוז גבוה יותר (8-10 nM), שלא הושפע מהעלייה בעומק מי הים.

2.5.2 ממברנות Donnan:

השיטה מבוססת על שימוש ב"תמיסה תורמת" (Donor solution), המכילה יונים של המתכת הנבדקת, וקומפלקסים אורגניים ואי-אורגניים המכילים את המתכת, ו"תמיסה המקבלת" (Acceptor solution), המכילה מלח של המתכת הנבדקת. האניון בתמיסה המקבלת, צריך להיבחר כך שלא יעבור אינטראקציה עם המתכת הנבדקת (לרוב NO_3^-), והקטיונים הנוספים בתמיסה (מלבד המתכת הנבדקת), צריכים להיות כאלו היוצרים קומפלקסים חלשים עם הליגנדים האורגניים. שתי התמיסות מופרדת באמצעות ממברנה טעונה שלילית (מחליפת קטיונים), עבירה למחצה. כאשר ריכוז המלחים משני צידי הממברנה מגיע לשיווי משקל, ההנחה היא שריכוז היונים החופשיים של המתכת הנבדקת שווה בשני הצדדים, וה"תמיסה התורמת", מכילה גם את יוני הנחושת הקשורים בקומפלקסים אורגניים. ריכוז המתכת החופשית נקבע בתמיסה המקבלת והריכוז הכללי של המתכת נקבע בתמיסה התורמת. ריכוז המתכת הקשורה מחושב ע"י הפחתת ריכוז המתכת החופשייה מהריכוז הכללי.

ההגעה לשיווי משקל, עשויה להתרחש אחרי זמן רב. הפרעות אפשריות בדיוק המדידה, יכולות להיות עקב מעבר של קומפלקסים לא טעונים, או קומפלקסים טעונים חיובית, או היווצרות קומפלקסים של המתכת הנבדקת עם יוני הידרוקסיל או ביקרבונאט.

Temminghoff וחובריו (2000) השתמשו בשיטה זו לבדיקת הקומפלקסציה של חומצות הומיות עם נחושת. הם השתמשו בנפח גדול של "תמיסה מקבלת", ובזרימה רציפה בתמיסה, ע"מ לזרז את ההגעה לש"מ ולאפשר בדיקות אנליטיות (pH ו-ICP) בתמיסה. שיווי המשקל הושג לאחר 48 שעות. בנוכחות EDTA כקומפלקסנט אורגני, רק 0.43% מהנחושת הכללית הייתה במצב חופשי, ובנוכחות חומצות הומיות 0.1-12% מכלל הנחושת הייתה במצב חופשי. Cancès וחובריו (2003) בדקו את התנועה של קדמיום, אבץ, עופרת ונחושת בעומק הקרקע (0-5 ס"מ). הם מצאו שקדמיום ואבץ היו מצויים בעיקר כיונים חופשיים (ממוימים), בעוד שעופרת ונחושת נמצאו בעיקר בקומפלקסים עם ח"מ מהקרקע.

2.5.3 Competitive ligand method

השיטה מבוססת על העובדה שיוני המתכת הנבדקת, המצויים בקומפלקס עם ליגנדים טבעיים בתמיסה (לדוגמה ח"מ), יכולים להיקשר לליגנד מתחרה, שתכונות הקומפלקסציה שלו עם יוני המתכת הנבדקת ידועות היטב. ע"מ להגיע לתוצאות מדויקות, התנאים הבאים חייבים להתקיים:

1. שיווי משקל בין הליגנד המתחרה לליגנדים הטבעיים, 2. ריכוז הקומפלקסים של המתכת עם הליגנד המתחרה, צריך להיות מחושב במדויק, 3. היחס בין יוני המתכת החופשיים לקומפלקסים של הליגנד המתחרה עם המתכת, צריך להיות ידוע, 4. היחס בין יוני המתכת החופשיים לקומפלקסים של הליגנדים הטבעיים עם המתכת, לא משתנה ע"י הוספה של הליגנד המתחרה. שני התנאים האחרונים מבוססים על ההנחות (שאינן בהכרח נכונות) הבאות: 1. תגובות כימיות כגון ספיחה או חמצון, אינן מורידות בצורה משמעותית את ריכוז הליגנד המתחרה בתמיסה, 2. היווצרות קומפלקסים בין שני סוגי הליגנדים, אינה מתרחשת, 3. לא מתרחשת תחרות בין המתכת הנבדקת למתכות אחרות על יצירת קומפלקסים עם הליגנד המתחרה או הטבעי (Xue and Sunda, 1997).
- לאחר הגעה לשיווי משקל, ריכוז הקומפלקסים שנוצרו בין המתכת לליגנד המתחרה נמדד בשיטות שונות, לדוגמה בליעה אטומית, ע"י הפרדה בעזרת ממס (solvent extraction) או אלקטרוכימיה (adsorptive/cathodic stripping voltammetry), (Xue and Sigg, 1993; Lucia et al., 1994; van Leeuwen and Jansen, 2005). בהפרדה בעזרת ממס, מניחים שהקומפלקס הנוצר בין הליגנד המתחרה למתכת, עובר, רובו ככולו, לפאזה אורגנית, תוך הנחה כי ריכוז הקומפלקס עם הליגנד המתחרה בפאזה המימית, הינו אפסי, וכי הליגנדים הטבעיים אינם מתמוססים בפאזה האורגנית. במצב זה, הפאזה המימית מכילה ליגנדים טבעיים, קומפלקסים של המתכת עם ליגנדים טבעיים, יוני מתכת חופשיים וליגנד מתחרה חופשי, ואילו הפאזה האורגנית מכילה

קומפלקסים של המתכת עם הליגנד המתחרה. Smith וחבריו (2004), בדקו את הקשירה של יוני כסף לליגנדים טבעיים מנהר שאליו מוזרמים משפכים עירוניים לאחר טיפול. הליגנד המתחרה שנבחר, היה DEDC, (Diethyldithiocarbamate). החוקרים הפרידו את הפאזה האורגנית מהפאזה המימית, תוך שימוש במס א-פולארי, DCE (1,2 dichloroethane). ריכוז יוני הכסף הקשורים לליגנד המתחרה התקבל תוך שימוש בתכונות בליעה אטומית, וחישוב ריכוז יוני הכסף החופשיים, בפאזה המימית, נעשה ע"י שימוש באלקטרודת כסף ספציפית, וכך ע"י מאזן מסה, ניתן היה לחשב את ריכוז יוני הכסף הקשורים לליגנדים הטבעיים. השיטה יכולה לתת תוצאות טובות עבור ליגנד טבעי בודד, הנמצא בריכוז נמוך בתמיסה ויוצר קומפלקסים חזקים עם המתכת הנבדקת, כך שיש סיכוי גבוה להיווצרות קומפלקסים בין הליגנד הטבעי למתכת. בריכוזי מתכת גבוהים, כמו גם כאשר התמיסה מכילה מגוון רב של ליגנדים טבעיים, (לדוגמא בחא"מ), גם ליגנדים חלשים יכולות לקחת חלק בקשירת המתכת ולכן שימוש בשיטה עלול להיות בעייתי, (Miller, 1997).

2.5.4 דיכוי פלואורסצנטי (Fluorescence Quenching-FQ):

החא"מ כפלואורופור, עובר דיכוי בעצמת הפלואורסצנטיה שלו עקב נוכחות יוני מתכות פאראמגנטיות כגון Hg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , ועקב נוכחות פחמימנים פוליארומטים (PAH's), (Monteil-Rivera and Dumonceau, ;Lu and Jaffe, 2001 ;Herbert et al., 1993 ;Cabaniss, 1992) (2002).

הדיכוי בפלואורסצנטיה עקב נוכחות מתכות פאראמגנטיות, נחשב לדיכוי סטטי המתרחש מכיוון שהקומפלקס הנוצר בין החא"מ למתכת, אינו פלואורסצנטי. כך בריכוזים ידועים של המתכת והחא"מ, ניתן לראות את השינוי החל בעצמת הפלואורסצנטיה של החא"מ. חישוב קיבול הקומפלקסציה וקבוע יציבות הקומפלקס, נעשה ע"י החוקרים תוך שימוש במודלים מתמטיים ובהנחה של היווצרות קומפלקס 1:1 בין אתר קושר בפלואורופור לבין המתכת (Lakowicz, 1983; Ryan and Weber, 1982a, 1982b; Esteves da Silva et al., 1998). החא"מ מכיל בתוכו קבוצות פונקציונאליות רבות, וכל קבוצה מאופיינת בתכונות פלוריסנציות שונות ובאפיניות שונה למתכות. המתכת יכולה להיקשר לכמה קבוצות בחא"מ בו זמנית וליצור כלאטים, כך שהיווצרות קומפלקס 1:1, אינה תמיד הנחה נכונה. לכן שימוש בשיטה זו לבדה, ע"מ לקבוע אינטראקציות של החא"מ עם המתכת הספציפית, יכולה לעיתים להיות לא מספקת.

2.5.5 אלקטרודת יון ספציפית (Ion Selective Electrode-ISE):

אלקטרודה יון-ספציפית מודדת את הפוטנציאל החשמלי הנוצר כתוצאה מנוכחות היון הספציפי בתמיסה. הפוטנציאל מחושב כנגד אלקטרודת ייחוס בעלת פוטנציאל קבוע. הפרש הפוטנציאלים בין שתי האלקטרודות, יהיה תלוי באקטיביות היון הספציפי בתמיסה, וכאשר מקדם האקטיביות קבוע, האקטיביות תהיה ביחס ישר לריכוז היון הספציפי בתמיסה. כיול האלקטרודה נעשה ע"י שימוש בתמיסות סטנדרט, או ע"י טיטרציה של היון הנבדק עם תמיסה ידועה ובניית עקום כיול עבור פוטנציאל האלקטרודה בתמיסה ידועה, כתלות בריכוז היון המוסף (בהתאם למשוואת נרנסט). הטיטרציה המבוצעת בנוכחות האלקטרודה הספציפית יכולה להיעשות ע"י טיטור התמיסה שאותה בודקים עם תמיסת היון הנבדק (Lu and Allen, 2002) או להיפך, ע"י טיטור של תמיסת היון הנבדק עם התמיסה שאותה בודקים (Stevenson and Chen, 1991). מעקום הכיול ניתן לחלץ את ריכוז היון הספציפי, לפי נתוני פוטנציאל האלקטרודה בתמיסה הנבדקת. בשימוש באלקטרודה יון-ספציפית יש לשמור על חוזק יוני קבוע (בתמיסת הכיול ובתמיסה הנבדקת), טמפרטורה קבועה ו-pH קבוע. נוכחות יונים אחרים בתמיסה, מלבד היון הספציפי, יכולה להוות בעיה מכיוון שהאלקטרודה עלולה להגיב גם אליהם. אלקטרודות יון ספציפיות, קיימות עבור יוני מתכת כגון Ca^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} . בריכוזים נמוכים של היון הנבדק, יש קושי, מפני שהאלקטרודה אינה מגיבה בזמן סביר לנוכחות היונים החופשיים בתמיסה, ובגלל עצם הקושי לייצר שינויי ריכוז קטנים כאלו בתמיסה הנבדקת. לדוגמא, אלקטרודת נחושת ספציפית יכולה למדוד יוני נחושת חופשיים ב- pCu^{2+} מינימאלי 7.7. Sauvé (1995) וחבריו הציעו פתרון לכיול אלקטרודת הנחושת בריכוזים נמוכים מאילו, ע"י שימוש בתמיסת קומפלקס של נחושת ושחרור הדרגתי של הנחושת מהקומפלקס ע"י טיטור התמיסה עם חומצה והחלפת הנחושת בפרוטון.

Temminghoff וחבריו (1997) מצאו שקשירת נחושת ע"י חא"מ בקרקעות חוליות הייתה תלויה ב-pH. 30% מהנחושת הייתה בקומפלקס עם החא"מ ב-pH 3.9, בעוד שב-pH 6.6, יותר מ-99% מהנחושת נמצאה בקומפלקס עם החא"מ. Cao וחבריו (2004) השוו בין שימוש באלקטרודת נחושת ספציפית לבין שיטת anodic stripping voltammetry, ובהנו את הקומפלקסציה של ליגנדים טבעיים (חומצות הומיות, חומצות פולביות, ופחמן אורגני שמוצו מהקרקע וחא"מ שמוצה ממי נחל) עם נחושת. החוקרים מצאו שהתוצאות הטובות ביותר התקבלו תוך שימוש באלקטרודת הנחושת, בריכוזי נחושת חופשית הגבוהים מ- $\text{pCu}=7$. קבועי הקומפלקסציה שהתקבלו, $\log k$, היו הנמוכים ביותר עבור דוגמאות החא"מ (3.4-4.1), והגבוהים ביותר עבור חומצות פולביות (5.3-10). קבועי הקומפלקסציה עלו עם עלייה ב-pH וירידה בחוזק היוני של התמיסה.

2.6 אפיון האינטראקציות בין הא"מ למתכות:

2.6.1 מודלים מתמטיים לאפיון האינטראקציות בין הא"מ למתכות:

ע"מ לאפיין את האינטראקציות בין הא"מ למתכות, יש צורך בדיעת ריכוז יוני המתכת החופשיים בתמיסה ואילו הקשורים לחא"מ. בניית איזותרמת קשירה, הינה השלב הראשון באפיון האינטראקציות. איזותרמת הקשירה מציגה את ריכוז המתכת הקשורה, כתלות בריכוז המתכת החופשית בתמיסה. מקדם החלוקה (K_d -distribution coefficient), המתקבל מתוך איזותרמת הקשירה המנורמלת לריכוז החא"מ, מציין את היחס בין המתכת הקשורה, למתכת החופשית.

השימוש במודלים מאפשר כימות פרמטרים שונים כגון קיבול הקומפלקסציה וחוזק הקומפלקסציה. המודל הפשוט ביותר הוא מודל לנגמיר, שמתייחס לקשר 1:1 בין אתר בחומר הקושר לבין החומר הנקשר ויצירת שכבת קשירה יחידה. השימוש במודל זה לאפיון הקומפלקסציה בין חא"מ למתכות, יושם ע"י מספר חוקרים, לדוגמא Dudal וחובריו (2005), אך מכיוון שהחא"מ הטרוגני ומורכב מאוד, קשירת מתכות ככדות אליו גם היא מורכבת ואינה דומה בכל המקרים. קבוצות פונקציונאליות רבות ושונות בחא"מ, הן בעלות אפניות שונה למתכות, ולכן חוזק הקשר עם מתכות יהיה שונה. כך גם מתכות שונות, הן בעלות אפניות שונה לאתרי הקשירה בחא"מ ומובן שהריכוז היחסי של המתכות השונות בקרקע, גם הוא יכול להשפיע על קשירתן. מתכות שונות יכולות להתחרות על אתרי הקשירה ובנוסף יכולה להיות תחרות גם עם פרוטונים ולכן הקשירה תלויה משמעותית ב-pH. מהסיבות הנ"ל, חוקרים רבים הציעו מודלים מורכבים יותר, המחולקים באופן כללי לשני סוגים:

1. Discrete Ligand models: מודלים אילו מתייחסים למספר אתרים מוגבל הקושר את המתכת או הפרוטון,

כאשר אתרים שונים הם בעלי תכונות קשירה שונות. בין המודלים הנ"ל, ניתן למצוא את מודל NICA-Donnan (Kinniburgh et al., 1999; Oste et al., 2002), מודלים IV, V, VI, (Tipping and Hurley, 1992; 1998; Tipping).

2. Continuous distribution models: אילו הם מודלים סטטיסטיים המתייחסים להתפלגות האתרים הקושרים.

בין המודלים הנ"ל, ניתן למצוא את מודל התפלגות האפניות,

(Affinity distribution model), (de Wit et al., 1993b),

ואת מודל ההתפלגות הנורמאלית (Normal distribution model), (Perdue et al., 1987).

בעבודה הנוכחית לא נעשה שימוש במודלים. ניסיון להתאמת התוצאות למודלים פשוטים נכשל ושימוש במודלים מורכבים יותר, דרש עבודה בתנאי pH, EC שונים. להלן נראה כי מטרת העבודה הייתה אפיון החא"מ במי קולחים ובקרקע לאחר השקיה במי קולחים ולא התאמת מודלים.

2.6.2 אינטראקציות בין חא"מ למתכות כבדות:

מחקרים רבים בדקו את הקשר בין חא"מ למתכות כבדות. המסקנה הברורה הייתה שחא"מ קושר מתכות כבדות ובכך הוא משנה את זמינותן הביולוגית ומגביר את ניידותן בקרקע ובמי התהום. יש להבדיל בין חא"מ ממקורות טבעיים (חא"מ בקרקע או במערכות מים) לבין חא"מ ממקור חיצוני (לדוגמא, זבלים ומי קולחים).

2.6.2.1 חא"מ ממקורות טבעיים:

Stevenson (1994) טען שקבוצות פונקציונאליות בחומצות הומיות ופולביות, המכילות חמצן (-OH, -COOH), חנקן (-NH₂) וגופרית (-SH), הן הגורמות לאפיניות החזקה של חומצות אלה ליוני מתכת. חומצות הידרופוביות בחא"מ (חומצות הומיות ופולביות), המכילות קבוצות פנוליות וקרבוקסיליות המחוברות לטבעות ארומטיות, גורמות לנטייה חזקה של החא"מ ליצירת קומפלקסים יציבים עם יוני מתכות פוליוולנטים (Schnitzer and Khan, 1978) כתוצאה מהאל-איתור של האלקטרונים וייצוב המטען השלילי המתקבל באניון של החומצה לאחר איבוד הפרוטון. Linnik (2003) בדק דוגמאות חא"מ ממי נהר ומצא שחומרים הומיים ובעיקר חומצות פולביות, היו האחראיים העיקריים לקומפלקסציה של מתכות כבדות. 45-80% מהמתכות נקשרו ע"י החומרים הנ"ל, כאשר הקומפלקסים שנוצרו היו בעיקר עם חא"מ בעל משקל מולקולרי קטן (< 5 kDa). חא"מ שמקורו היה בקרקעות הסמוכות לנהרות, הכיל ליגנדים חזקים הקושרים נחושת והיה גורם חשוב בניוד מתכת זו לעבר האוקיינוס (Shank et al., 2004).

ניוד מתכות כבדות בקרקע ע"י החא"מ, גבר כתוצאה מתנאים אנארוביים (Caille et al., 2003). בתנאים אלה, חומצות אורגניות בעלות משקל מולקולרי נמוך היו נפוצות בחא"מ, והן שהיו אחראיות לקומפלקסציה החזקה של מתכות כבדות, (Qin et al., 2004; Van Hees et al., 2000). בקרקע חקלאית, Dudal וחבריו (2005) בדקו את הקשירה של חא"מ מעומקים שונים ל-Cu, Fe, Mn. בשימוש בשיטת הדיכוי הפלואורסצנטי, הם מצאו שהמתכות יצרו קומפלקסים עם החא"מ והאפיניות לחא"מ הייתה לפי סדר Cu>Fe>Mn. למרות שריכוז החא"מ ירד עם העלייה בעומק הקרקע, האפיניות של החא"מ

למתכות נשארה קבועה ומכך החוקרים הסיקו שרק חלק קטן מהחא"מ (שנע בעומק הקרקע), הוא שאחראי לקשירת המתכות.

בהפרדת חא"מ מקרקע למקטע הידרופילי ומקטע הידרופובי, Guggenberger וחובריו (1994) מצאו שהחומצות ההידרופיליות הן האחראיות העיקריות בקומפלקסציה של Cu ו-Cr (Lu and Allen, 2002) בדקו דוגמאות חא"מ במים מנהרות ומאגמים, וטענו שהקומפלקסציה של נחושת מתרחשת באתרים פנוליים בחא"מ, והקומפלקסציה של סידן ומגנזיום מתרחשת באתרים קרבווקסילים, ומשום כך נצפתה תחרות נמוכה בין נחושת לבין סידן ומגנזיום.

2.6.2.2 חא"מ ממקורות חיצוניים:

עלייה בריכוז החא"מ בקרקע, יכולה לנבוע מהוספת חומר אורגני מוצק כגון קומפוסט או בוצה, או מתוספת של חומר אורגני מומס או קולואידלי משפכים או כתוצאה מהשקיה במי קולחים. בוצה מכילה ריכוז גבוה של חומר אורגני מוצק (שבחלקו מתפרק לחא"מ), ובנוסף מכילה גם ריכוזים משמעותיים של מתכות כבדות.

במחקרים שבדקו את השפעת השימוש בבוצה כתוסף לקרקע (במעבדה ובשדה) נמצא שתוספת בוצה מגבירה את הניידות של מתכות כבדות (Ni, Cu, Zn, Cd, Pb) בחתך הקרקע, עקב יצירת קומפלקסים מסיסים עם החא"מ (Plaza et al., 2006; Ashworth et al., 2004; Kaschl et al., 2002a,b) הייתה גבוהה יותר לעומת קרקעות חרסיתיות הן בגלל תנועת מים נמרצת יותר, אך גם בגלל מיעוט חרסיות וחומר אורגני מוצק, הקושרים את המתכות ומעכבים אותן בשכבה העליונה של הקרקע. Darmody וחובריו (1983) בדקו את הניידות של Ca, Cu, K, Mg, P ו-Zn בקרקע (silt loam), 3 שנים לאחר שטופלה בבוצה (כמויות הבוצה הוספו היו: 0, 1500 או 3000 ק"ג למטר מרובע של הקרקע). כל המתכות למעט אשלגן היו ניידות בקרקע בעומק של 150 ס"מ. תוספת 3000 ק"ג למטר מרובע של בוצה, גרמו לעלייה בריכוז הסידן בקרקע עד לעומק של 50 ס"מ ועלייה בריכוז Cu, Mg, P ו-Zn בקרקע עד לעומק של 75 ס"מ. הריכוז הגבוה ביותר של נחושת נמצא באופק B של הקרקע (השכבה שמצויה מתחת לשכבת הקרקע העליונה ומכילה חומר אורגני שמקורו בפירוק של צמחיה ובע"ח ובמקרה זה גם חומר אורגני שמקורו בבוצה). מחקרים נוספים הראו שחא"מ מבוצה הניע נחושת שהייתה תחילה קשורה לחלקיקי הקרקע או שנמצאה בבוצה עצמה (Gerritse et al., 1982; McBride et al., 1997). בניסויי הדגרה (7,3 שנים), של קרקעות ישראליות שטופלו בבוצת שפכים (Oliver; et al, 2005, הס, 2002), נמצא שהתפלגות המתכות (Cu, Ni, Cd, Pb, Zn), בקרקעות לאחר שימוש בבוצה

1-3 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, שיוחסה לפירוק ביולוגי. ריכוז הנחושת החופשית נותר ללא שינוי לאחר הדגרה בת 7 שנים. בניסויי ספיחה של נחושת לקרקע, נמצא שבנוכחות הא"מ שמקורו במתקן לטיהור שפכים, ספיחת הנחושת לקרקע ירדה, כתוצאה מהיווצרות קומפלקסים מסיסים הא"מ-נחושת (Zhou and Wong, 2001).

שפכים עירוניים שלא עברו טיפול יכולים להכיל ריכוזים גבוהים של הא"מ ושל מתכות כבדות. לדוגמה בעיר מקסיקו, השפכים ששימשו להשקיה במשך עד 80 שנים, הכילו 99.3-161.8 מ"ג/ליטר הא"מ, 0.4 מ"ג/ליטר אבץ, 0.25-0.78 מ"ג/ליטר בורון, 0.11 מ"ג/ליטר כרום, 0.15 מ"ג/ליטר נחושת, 0.11 מ"ג/ליטר עופרת, ו-0.005 מ"ג/ליטר קדמיום. בקרקעות חקלאיות שהושקו בשפכים אלה נצפתה עלייה בפעילות המיקרוביאלית ובריכוז הביומסה, ככל הנראה עקב ההוספה של הא"מ בריכוזים גבוהים. הריכוז של Cu, Cd, Pb ו-Zn בקרקעות המושקות עלה בצורה משמעותית, אך עדיין נותר נמוך מהריכוז המקסימאלי המותר עפ"י תקנות האיחוד האירופי. מסיסות המתכות הנ"ל נותרה נמוכה, ככל הנראה עקב ה-pH (7.4-8.1) בקרקעות, שעלה אך במעט לאחר ההשקיה במי השפכים, ועקב ריכוז גבוה של חומר אורגני וחרסיות שגרמו לספיחת המתכות בקרקעות המושקות (Friedel et al., 2000). קומפלקסציה של הא"מ משפכים לא מטופלים עם נחושת נמצאה תלויה ב-pH, עקב תחרות בין יוני הנחושת לפרוטונים.

ב-pH גבוה הקומפלקסציה הייתה גבוהה יותר (Kunz and Jardim, 2000).

מי קולחים עירוניים מטיפול מתקדם מכילים אמנם הא"מ (שריכוזו תלוי באופי הטיפול בשפכים), אך לרוב ריכוזי המתכות הכבדות בהם נמוכים מאוד (Sheikh et al., 1987), ולכן עיקר הסכנה של ניידות מתכות לעומק חתך הקרקע היא מהשפעת החא"מ ממי הקולחים על מתכות המצויות בקרקע.

בניסוי ליזימטרים הדומה לניסוי הנוכחי, Fine וחבריו (2002) בחנו את ההיפותזה הרווחת שהארכת משך השהייה של המים ומוכליהם בחתך הקרקע תאפשר פירוק מיקרוביאלי מוגבר של החא"מ והקטנת דליפתו מהקרקע. בניסוי בוצעה השקיה במי קולחים (מבריכות חמצון, באיכות נמוכה מזו של המחקר הנוכחי) או במים שפירים. הליזימטרים מולאו בקרקע חולית או בשתי קרקעות חרסיות ובחלקם ניטעו עצי אקליפטוס. משך השהייה של מי ההשקיה בקרקע היה בין שעות ל-6 חודשים, כל זאת תחת השקיה יומית. נמצא שהארכת משך השהייה בחתך הקרקע, הקטינה את סך כל כמות החא"מ שדלפה מחתך הקרקע אך הגדילה מאוד את ריכוז החא"מ בתמיסת הקרקע ובמי הנקז וגם את המליחות הכללית.

בניסוי ליזימטרים דומה, Fine וחובריו (2005) מצאו 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.

2.7 מטרת העבודה:

מטרת העבודה הייתה לאפיין את השפעת ההשקיה במי קולחים על אופיו של החא"מ בקרקע ופוטנציאל הקשירה שלו לנחושת.

לשם כך נבחנו הנושאים הבאים:

1. אופיין החא"מ ממי הקולחים
2. אופיין החא"מ במי נקז של ליזימטרים שהושקו במי קולחים או במים שפירים
3. אופיינו האינטראקציות בין החא"מ ממי קולחים ומשני סוגי מי הנקז, לנחושת

3. חומרים ושיטות:

3.1 פללי:

הניסוי נערך באתר השפד"ן. לזימטרים בנפח 200 ליטר, הושקו במי קולחים שניוניים (להלן מי קולחים), או במי קולחים שלישוניים (להלן מים שפירים). (Fine et al., 2002). הליזימטרים הועמדו בפברואר 2002 ונשתלו בהם גדמים של עצי איקליפטוס בני 7 שנים. ההשקיה הייתה גירעונית (ללא שטיפה) החל בחודשים יוני-יולי 2003, עד שטיפה של חתך הקרקע בראשית נובמבר 2003. חתך הקרקע בליזימטרים נשטף ב-50 ליטר של מים שפירים, שהם כ-2-3 מים אצורים (בקיבול שדה).

הדוגמאות שנלקחו לאנליזה מעבדתית היו משלושה סוגים:

1. מי קולחים (נלקחו ארבע דגימות במהלך השנה)

2. נקזים מליזימטרים שהושקו במי הקולחים (להלן נקז קולחים)

3. נקזים מליזימטרים שהושקו במים השפירים (להלן נקז שפירים)

לדוגמאות הוסף סודיום אזיד בריכוז סופי של 0.02%, למזעור הפעילות המיקרוביאלית.

הדוגמאות נשמרו בקירור, ב-4 °C, עד להמשך האנליזה.

3.2 חומרים:

כל החומרים שבהם נעשה שימוש, היו מדרגת ניקיון אנליטית.

NaOH, H₂SO₄, H(NO₃), HCl, Na₄EDTA, Cu(NO₃)₂, NaCl היו מתוצרת Merck.

התמיסות והמיהולים השונים הוכנו 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 בריכוז 5%.

לאחר מכן נשטפו במים חסרי יונים, במים מזוקקים פעמיים, יובשו והוכנו לשימוש.

3.3 שיטות:

3.3.1 אפיון בסיסי של הדוגמאות:

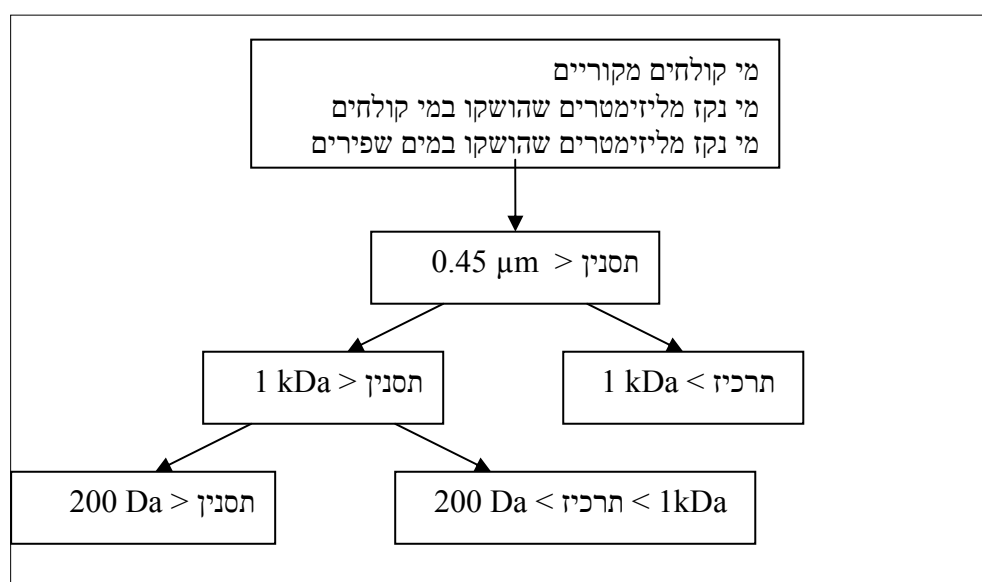
בכל הדוגמאות משלבי הטיפול וההפרדה השונים (שיפורטו בהמשך), נמדדו ערכי pH, מוליכות חשמלית המספקת מדד לחוזק יוני (mS/cm), וצפיפות אופטית באורך גל של 256 nm. pH נמדד באמצעות אלקטרודת pH מתוצרת Orion, בפוטנציומטר מתוצרת חברת Denver Instrument, model 50. באפרים מתוצרת Merck (pH4, pH7, pH9), שימשו לכיול האלקטרודה. הכיול נעשה בתחילת כל יום עבודה. המוליכות החשמלית נבדק באמצעות אלקטרודת מוליכות ומד מוליכות מתוצרת חברת Cyberscan, מודל CON 510. הצפיפות האופטית נבדקה בספקטרופוטומטר UV-VIS מתוצרת Uvikon, מודל 933. מהצפיפות 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., 1994; Chin et al., 1990). חישוב הבליעה הספציפית נעשה ע"י חלוקת הצפיפות האופטית שהתקבלה ב-256 nm, בריכוז הפא"מ, והבליעה הספציפית התקבלה 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. הטמפרטורה שבה בוצעה המדידה הייתה 930 °C בסביבת חמצן. תכולת המתכות נבדקה במכשיר ICP-AES, spectro flame modula E. הדוגמאות עם תכולת פחמן גבוהה עברו עיכול מוקדם בחומצה חנקתית מרוכזת ונבדקו כנגד סטנדרטים ותמיסות Blank דומים. לדוגמאות עם תכולת פחמן נמוכה הוספה חומצה חנקתית מרוכזת, לריכוז סופי של 1%. כיול המכשיר בוצע ע"י בדיקת תמיסות סטנדרט המכילות את היונים הנבדקים. הסטנדרטים היו תוצרת Merck ובדרגת ניקיון ל-ICP.

3.3.2 הפקת החא"מ והפרדתו למקטעי גודל:

מי הקולחים המקוריים, נקז הקולחים ונקז השפירים, סוננו בפילטר פוליפרופילן (Gelman Science, Ann) Arbor, MI), ב-cut off של $0.45 \mu\text{m}$. הסינון בוצע בלחץ של 1.36 אטמוספרות. התסנין המתקבל $<0.45 \mu\text{m}$ מכיל את החומר האורגני המומס (חא"מ). בהמשך הופרד החא"מ למקטעי גודל, באמצעות ננו-פילטריה דרך ממברנות סלקטיביות. ההפרדה הראשונה נעשתה על ממבראנה תוצרת Pall Filtron ב-cut off של 1kDa ובלחץ של 1.36 אטמוספרות. לפני הפרדת הגודל, הדוגמאות הוחמצו עד ל-pH 5 באמצעות חומצה חנקתית מרוכזת.

בסיום הפרדת הגודל, כאשר נפח התרכיז הוא כ-700 מ"ל, נבדק החוזק היוני שלו ונקבעים מספר המיהולים הדרושים (תוך שימוש במים מזוקקים פעמיים) ע"מ להגיע למוליכות חשמלית של 2 mS/cm. הפרדה נוספת של התסנין הקטן מ-1kDa, בוצעה דרך ממבראנה מתוצרת Koch (flat sheet, MPF-34 8.5 X) Koch Membrane Systems, Wilmington, MA, USA) ב-cut off של 200Da ובאמצעות Steered cell בנפח שלושה ליטרים (שיוצר עפ"י הזמנה ע"י חברת A.A 1982.LDS) ובלחץ של 2.46 אטמוספרות. כ-500 מ"ל של התסנין הקטן מ-1kDa רוכזו על ממברנה של 200Da ונשטפו עם מים מזוקקים פעמיים, עד לקבלת 500 מ"ל תרכיז ($1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$) עם חוזק יוני של $\sim 1 \text{ mS/cm}$.

ההפרדה של מקטעי הגודל השונים מוצגת באיור 3.1.



איור 3.1: הפרדת החא"מ למקטעי גודל

3.3.3 הומיוניזציה של החא"מ:

תהליך ההומיוניזציה בוצע לחא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa, עבור דוגמאות מי קולחים, נקז קולחים ונקז שפירים. תהליך ההומיוניזציה בוצע במטרה להחליף את היונים המצויים במדיום המכיל את תרכיז החא"מ, בנתרן ובכלוריד. במדידות ספקטרוסקופיות שבוצעו באמצעות $^1\text{H-NMR}$, ההומיוניזציה הייתה הכרחית כדי להקטין את השפעת היונים הפאראמגנטיים הגורמים להרחבת הפיקים (Gélinas et al., 2001). התהליך התבצע בתוך stirred cell בנפח 400 מ"ל, תוצרת micon, עם ממבראנה ב-cut off של 200 Da, ובלחץ עבודה של 2.46 אטמוספרות, לפי השלבים הבאים:

1. ל-120 מ"ל דוגמת חא"מ $0.45 \mu\text{m}$ <חא"מ <1 kDa, הוספו 30 מ"ל תמיסת NaCl, 2.5 M. התקבל נפח

סופי של 150 מ"ל 0.5 M NaCl

2. ערבוב במשך שעה

3. מיהול לנפח של 300 מ"ל

4. ערבוב במשך שעה

5. דחיקה בלחץ לעיל עד לנפח של 120 מ"ל, ואיסוף תסנין מס' 1

6. הוספת 50 מ"ל 0.5 M NaCl

7. ערבוב במשך שעה

8. מיהול לנפח של 300 מ"ל

9. ערבוב במשך שעה

10. דחיקה בלחץ לעיל עד לנפח של 120 מ"ל ואיסוף תסנין מס' 2

11. הבאת ה-pH ל-10 עם NaOH

12. ערבוב במשך שעה

13. מיהול לנפח של 300 מ"ל

14. ערבוב במשך שעה

15. דחיקה בלחץ לעיל עד לנפח של 120 מ"ל ואיסוף תסנין מס' 3

16. הבאת ה-pH ל-3.8 עם HCl

17. ערבוב במשך שעה

18. מיהול לנפח של 300 מ"ל

19. ערבוב במשך שעה

20. דחיקה בלחץ לעיל 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 ההומויוני עם

מוליכות חשמלית של $\sim 1 \text{ mS/cm}$

22. איסוף תסנין מס' 5 (נפח התסנין תלוי במהולים לקבלת מוליכות חשמלית של $\sim 1 \text{ mS/cm}$)

23. איסוף התרכיז ההומו-יוני (120 מ"ל)

בדוגמה TL-1 הדחיקה בשלב 10 בוצעה לנפח קטן יותר מ-120 מ"ל ולכן בוצעה חזרה נוספת על שלב זה והתקבלו תסנינים 2.1 ו-2.2. תסנינים 5-9 בוצעו ע"מ להוריד את המוליכות החשמלית וכולם היו בנפח של 180 מ"ל.

בדוגמה EL-1, התרכיז שהתקבל לאחר הדחיקה השלישית (שלב 15) נדחק עד ל-50 מ"ל ונאסף תסנין מספר 4. לאחר מכן בוצעו מהולים של התרכיז ל-150 מ"ל ודחיקות עד ל-50 מ"ל ונאספו תסנינים 5-7. בהמשך הורד ה-pH ל-3.8 ולאחר ערבוב, התמיסה נמהלה עד ל-100 מ"ל ונדחקה עד ל-50 מ"ל, לקבלת תסנין 8. התרכיז שהתקבל נמהל שוב ונדחק עד לקבלת המוליכות היונית המתאימה.

בדוגמה EL-3 בוצעו שתי דחיקות לקבלת המוליכות החשמלית המתאימה (תסנינים 5 ו-6).

3.3.4 ייבוש דוגמאות חא"מ:

דוגמאות חא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa, לאחר הומויוניזציה, ודוגמאות חא"מ במקטע הגדול $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$, הוקפאו ויובשו בלאופיליזר (ייבוש בהקפאה). החומר היבש נשמר בדסיקטור ושימש לאנליזות הבאות (3.3.5-3.3.6).

3.3.5 ספקטרוסקופיית $^1\text{H-NMR}$ של דוגמאות חא"מ:

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

3.3.6 ספקטרוסקופיית FTIR של דוגמאות חא"מ:

אנליזה FTIR בוצעה במכשיר מתוצרת Bruker Vector 2.2. כ-2 מ"ג מהחומר היבש נכתשו עם כ-100 מ"ג KBr (שאינו בולע בתחום ה-IR), לקבלת אבקה דקה ואחידה. האבקה נדחסה בלחץ לדיסקה דקה וזו הועברה לאנליזה בספקטרומטר.

3.3.7 מיפוי ספקטרופלוואורומטרי תלת מימדי של דוגמאות החא"מ:

הדוגמאות שלהן בוצע המיפוי היו חא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa, וחא"מ במקטע הגדול <math>1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}</math>, במי קולחים, נקז קולחים ונקז שפירים. הדוגמאות מופו ללא נחושת, ועם ריכוז מרבי של נחושת (pCu=3.5). בעזרת הספקטרופלוואורומטר הופקו מפות תלת ממדיות של עירור ופליטה (EEM-) (Excitation Emission Matrix), בטמפרטורה של $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, ברוחב חלון (slit) של 0.5 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 נעשה באורכי הגל 210-590 nm, כל 4 nm והפליטה נעשתה באורכי הגל 220-590 nm, כל 2 nm.

3.3.8 טיטרציה של דוגמאות חא"מ עם נחושת:

מטרת השלב הנוכחי הייתה לאפיין את הקשירה של נחושת, כמתכת מודל, לחא"מ. האפיון בוצע לדוגמאות חא"מ של מי קולחים, נקז שפירים ונקז קולחים, במקטע הגדול מ-1 kDa, כפי שהוא ולאחר הומיוניזציה שלו ובמקטע הגדול <math>1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}</math>. בכל דוגמת חא"מ בוצעו שתי טיטרציות (חזרות).

הטיטרציה בוצעה באמצעות אלקטרודה ספציפית לנחושת (Orion 94-29) בהשוואה לאלקטרודת ייחוס (אלקטרודת קלומל Orion 90-02), תוך כדי מדידה ורישום של ה-pH והטמפרטורה. טיפול באלקטרודות (לפני תחילת העבודה) בוצע כלהלן: אלקטרודת ה-pH נשטפה במים מזוקקים פעמיים ויובשה וה-pH כויל באמצעות בופרים (pH 4, pH 7); מד הטמפרטורה גם הוא נשטף במים מזוקקים פעמיים ויובש; אלקטרודת הנחושת נשטפה במים מזוקקים פעמיים, לפני השטח שלה נוקז בעדינות ע"י שפשוף בדף אלומיניום אוקסיד, תוצרת Orion, במשך 30 שניות; אלקטרודת הקלומל נוקתה ע"י החלפת התמיסה החיצונית (10% w/v KNO₃) והתמיסה הפנימית (בופר AgCl) ולאחר מכן היא נשטפה ויובשה. טיטרציה לכיול אלקטרודת הנחושת, בוצעה בתחום ריכוזי הנחושת pCu7-pCu2. 50 מ"ל מים מזוקקים פעמיים, הובאו למוליכות חשמלית של $\approx 1 \text{ mS cm}^{-1}$ (בשימוש בתמיסת חוזק יוני ISA של Na(NO₃)₂ מתוצרת Orion), וה-pH הורד ל-4.6-4.8 עם חומצה חנקתית מהולה.

התמיסה סוחררה בעדינות על פלטה מגנטית, והאלקטרודות הוטבלו בה. יציבות בפוטנציאל האלקטרודה הוגדרה כשינוי שאינו עולה על 0.3 mV במשך 3 דקות. לאחר התייצבות הקריאה, החלה הוספה של כמויות מדודות של

תמיסת נחושת חנקתית. הטיטרציה הסתיימה כאשר פוטנציאל אלקטרודת הנחושת לאחר שתי הוספות של טיטרנט, לא עלה על 0.3 mV בכל הוספה. משוואת עקום הכיול, התקבלה מגרף של פוטנציאל האלקטרודה (mV), כתלות ב-pCu. תגובת האלקטרודה לנחושת בטיטרצית הכיול, תאמה את משוואת נרנסט עבור יון זו ערכי, והייתה $\sim 28 \text{ mV}$ ליחידת pCu.

הטיטרציה של דוגמאות החא"מ נערכה בדומה לטיטרצית הכיול.

הכנת דוגמת החא"מ לטיטרציה, כללה את השלבים הבאים:

1. מיהול הדוגמה עד לריכוז של 20 מ"ג לליטר פחמן אורגני.

2. הורדת ה-pH ל-3.8 באמצעות חומצה חנקתית בריכוז 1 M , לסילוק הקרבונטים

3. העלאת ה-pH ל-4.6-4.8 עם תמיסת 1 M NaOH

4. התאמת המוליכות החשמלית ל- $\approx 1 \text{ mS cm}^{-1}$, עם תמיסת ISA

השינוי בנפח התמיסה במהלך הטיטרציה היה זניח (פחות מ-4%).

בין כל כיול לטיטרציה ובסיום יום העבודה, האלקטרודות הוצאו מהתמיסה ונוקו.

אלקטרודת ה-pH נשטפה במים מזוקקים פעמיים, יובשה ונשמרה בתמיסת השימור. גשש הטמפרטורה נשטף

במים מזוקקים פעמיים ויובש. אלקטרודת הנחושת ואלקטרודת הייחוס נשטפו במים מזוקקים פעמיים, יובשו,

והוכנסו לתמיסת $0.025 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ למשך 5 דקות, נשטפו ויובשו שוב והוכנסו לתמיסת $0.1 \text{ M Na}_4\text{EDTA}$

ל-5 דקות נוספות. לבסוף בוצעה שטיפה נוספת במים מזוקקים פעמיים, אלקטרודת הנחושת יובשה ונאטמה

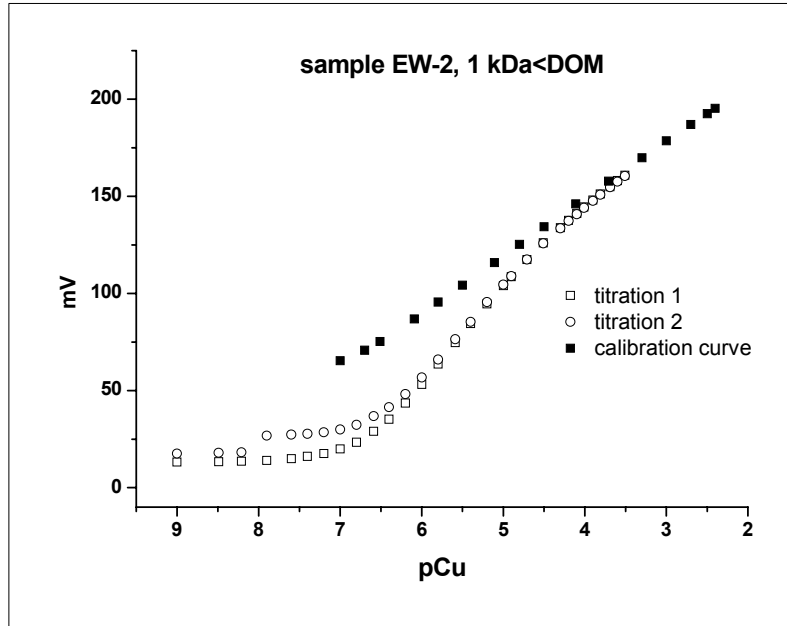
באמצעות מכסה ואלקטרודת הייחוס נסגרה ונשמרה במים מזוקקים פעמיים.

פוטנציאל אלקטרודת הנחושת תורגם לריכוז הנחושת החופשית בתמיסה, עפ"י משוואת עקום הכיול.

ריכוז הנחושת הקשורה חושב כהפרש בין ריכוז הנחושת הכללי שהוסף במהלך הטיטרציה, לבין ריכוז הנחושת

החופשית (Stevenson and Chen, 1991). דוגמה לעקום טיטרציה (שתי חזרות) ועקום כיול, מוצגת באיור

3.2, עבור חא"מ מי קולחים (EW-2) במקטע הגדול מ- 1 kDa .



איור 3.2: עקומות טיטרציה ועקום כיוול

מהנתונים שהתקבלו, נבנו איזותרמות קשירה של הנחושת לחא"מ (ממוצע ריכוז הנחושת הקשורה ליחידת פא"מ, הכולל סטיות תקן, כפונקציה של ממוצע ריכוז הנחושת החופשי).

3.3.9 אפיון משולב של האינטראקציות בין חא"מ לנחושת:

הדוגמאות שעבורן בוצע האפיון המשולב היו חא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa, וחא"מ במקטע הגדול $1 \text{ kDa} > \text{m} > 200 \text{ Da}$.

עבור כל דוגמה, הוכנה תמיסת חא"מ בריכוז $\approx 20 \text{ mg L}^{-1}$ (התמיסה הוכנה עפ"י השלבים המצוינים בסעיף 3.3.8) ובנוסף תמיסת חא"מ כנ"ל הוכנו בתוספת של ריכוזים עולים של נחושת (3.5-5.5 pCu). כל בדיקה נערכה בשתי חזרות.

התמיסות נבדקו ראשית באמצעות אלקטרודת הנחושת (כמתואר בסעיף 3.3.8) ואופיינו ריכוזי הנחושת החופשית והקשורה. לאחר מכן נבדק ספקטרום הפלואורסצנטיה של התמיסות בספקטרופלורומטר, כמתואר בסעיף 3.3.7. עבור כל תמיסת חא"מ ללא נחושת, הופק ספקטרום הפליטה (עירור ב-280 nm), ונמצא אורך הגל שבו פליטת האנרגיה מכסימלית (λ_{em}). באורך גל זה הופק ספקטרום העירור ונמצאו אורכי הגל לעירור מכסימלי (λ_{1ex} , λ_{2ex}). תמיסת החא"מ ללא נחושת, והתמיסות המכילות נחושת עוררו באורכי גל אלו. דוגמת חא"מ ללא נחושת נמהלה פי 2 ובבדיקה השפעת ריכוז החא"מ על מיקום שיאי הבליעה והפליטה.

התייחסות לעוצמות הפיקים הפלואורסצנטיים, והשוואת אופי קשירת הנחושת של דוגמאות חא"מ שונות, מתאפשרים לאחר ביטול השפעת הבליעה החלקית החוזרת של הקרינה הנפלטת ע"י החא"מ (ה- IFE-Inner Filter Effect). לשם כך נמדדה הצפיפות האופטית של כל התמיסות באורכי הגל של העירור והפליטה, והתיקון בוצע בהתאם לשיטה של Gauthier וחבריו (1986).

4. תוצאות ודיון:

4.1 אפיון בסיסי של דוגמאות החא"מ לפני ההפרדה למקטעי גודל:

מי-הנקז לאחר השקיה במי קולחים או במים שפירים התקבלו לאחר משטר של השקיה גירעונית, ללא שטיפה. הקרקעות בליזימטרים נשטפו פעם אחת, בסוף העונה (לאחר כ-5 חודשים של השקיה גירעונית). החומר האורגני הצטבר בקרקע במהלך העונה ועבר פירוק מתמשך בקרקע בתנאים המעודדים פירוק: טמפרטורה גבוהה, לחות קרקע קבועה סביב קיבול שדה, וחללי קרקע חופשיים מלאים באוויר. בנוסף, היו הפרשות שורש וחלקי שורשים מתים שתרמו לחא"מ במהלך העונה. כך למעשה, הא"מ במי-הנקז מתקבל מהמקורות השונים של החומר האורגני בתמיסת הקרקע ובמי השטיפה.

החא"מ של מי הקולחים ודוגמאות מי-הנקז (מהשקיה במים שפירים או במי קולחים), התקבל לאחר סינון הדוגמאות דרך פילטר $0.45 \mu\text{m}$. בכל אחת מהדוגמאות נבדקו המדדים הבאים: פחמן אורגני כללי שנבדק בדוגמאות המקוריות לפני סינון דרך פילטר $0.45 \mu\text{m}$ (TOC), פא"מ (DOC), פחמן אי-אורגני מומס (DIC), pH, מוליכות חשמלית (EC), צפיפות אופטית (OD) ב- 256 nm ובליעה ספציפית (SUVA) באורך גל זה, ותכולת מתכות. כל המדדים, למעט TOC, נמדדו בדוגמאות שעברו סינון דרך פילטר $0.45 \mu\text{m}$. התוצאות העיקריות, מרוכזות בטבלה 4.1 (ריכוז המתכות, למעט נחושת, מופיע בנספח 1).

טבלה 4.1: אפיון בסיסי של חא"מ, ($<0.45 \mu\text{m}$), במי הקולחים ובמי-הנקז

Cu $\mu\text{g/L}$	SUVA $\text{L (mg}^{-1} \text{ m}^{-1})$	OD ₂₅₆	EC mS/cm	pH	DIC mg/L	DOC mg/L	TOC mg/L	סימול הדוגמה*
4	0.71	0.20	2.4	8.2	58	28	29	EW1
8	0.73	0.19	2.1	8.5	48	26	27	EW2
6	1.06	0.18	2.1	8.4	71	17	19	EW3
6	0.71	0.20	1.8	7.9	35	28	31	EW4
29	1.77	2.89	20.7	7.9	89	163	237	TL1
14	2.05	3.63	16.5	8.2	117	177	190	TL2
11	2.02	4.70	21.2	8.3	125	233	234	TL3
12	1.99	5.93	24.4	8.4	224	298	316	TL4
4	1.37	3.67	12.6	8.1	249	268	292	EL1
54	1.72	5.49	49.8	8.3	270	319	321	EL2
20	1.71	3.77	24.0	8.2	169	220	249	EL3
12	1.65	2.66	17.4	8.1	112	161	206	EL4

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

ה-pH של כל דוגמאות החא"מ היה דומה: 8.2 ± 0.3 . ריכוזי פחמן אורגני ואי-אורגני מומס (DIC, DOC) היו גבוהים יותר בשני סוגי מי-הנקז מאשר במי הקולחים. במי הקולחים היה יותר פחמן אי-אורגני מומס מפא"מ. במי-הנקז, ריכוז

הפא"מ היה גבוה מריכוז הפחמן האי-אורגני המומס. ריכוז הפא"מ בנקז קולחים היה דומה לזה שבנקז שפירים, ככל הנראה עקב פירוק מיקרוביאלי של מי הקולחים שהוספו לקרקע. מהצפיפות האופטית, שנבדקה ב-256 nm, חושבה הבליעה הספציפית (SUVA), ביחידות של ליטר/מ"ג*מטר. הבליעה הספציפית הייתה: נקז שפירים < נקז קולחים < מי קולחים, (1.77-2.05, 1.37-1.72, 0.71-1.06 ליטר/מ"ג*מטר, בהתאמה). ערכי ה-SUVA הנמוכים בחא"מ ממי הקולחים מעידים על ריכוז נמוך של שיירים ארומטיים בהשוואה לחא"מ בשני סוגי מי-הנקז.

Zumstein and Buffle (1989) מצאו שחא"מ שמקורו בקרקע הוא יותר ארומטי מחא"מ שמקורו בדוגמאות ממי נהר. Saadi וחבריו (2006) בדקו חא"מ בדוגמאות של שפכים מטופלים (ביציאה ממתקן טיהור שפכים בעיר חיפה ובמאגר מי הקולחים "קישון" שבעמק יזרעאל), ומצאו ערכי SUVA ב-254 nm במי הקולחים שהיו דומים לערכים בטבלה 4.1 (1.18, 1.07 ליטר/מ"ג*מטר, בהתאמה). לאחר אינקובציה שנמשכה 2-4 חודשים, בטמפרטורת החדר, הם מצאו עלייה בערכי הבליעה הספציפית, וייחסו אותה לפירוק מיקרוביאלי סלקטיבי של מרכיבים בחא"מ שהם בעלי בליעה נמוכה בתחום ה-UV.

החא"מ בשני סוגי מי-הנקז היה בעל ערכי SUVA גבוהים יותר, האופייניים לחא"מ בקרקע. חא"מ בקרקעות הנו בעל אופי יותר ארומטי מכיוון שהוא עובר פירוק מיקרוביאלי, שבמהלכו עולה הריכוז היחסי של השיירים הארומטיים, העמידים יותר לפירוק, ואשר מאופיינים בבליעה חזקה בתחום ה-UV (Fiedler and Kalbitz, 2003; Guo and Chorover, 2003). Imai וחבריו (2002) מצאו כי הבליעה ספציפית (ב-260 nm) של חא"מ במי קולחים עירוניים הייתה גבוהה מהבליעה של החא"מ בשפכים הלא מטופלים (1.7 לעומת 0.7 ליטר/מ"ג*מטר, בהתאמה), והחא"מ במי הקולחים היה בעל בליעה ספציפית נמוכה בהרבה מזו של חא"מ מקרקע יער (0.7 לעומת 2.1 ליטר/מ"ג*מטר, בהתאמה).

חא"מ במי-הנקז מהשקיה במים שפירים היה בעל ערכי SUVA גבוהים יותר מאשר חא"מ במי-הנקז מהשקיה במי קולחים (טבלה 4.1). השקיה במי קולחים מוסיפה לקרקע חא"מ שברובו מכיל שיירים אליפטים שאינם בולעים ב-UV ולכן גורמים לערכי SUVA נמוכים יותר, בהשוואה לחא"מ המתקבל לאחר השקיה במים שפירים.

מכיוון שהשקיה במי קולחים יכולה להגביר את הפעילות המיקרוביאלית בקרקע (Ramirez-;Meli et al., 2002), ניתן להניח שריכוז החומרים הארומטיים בחא"מ מנקז קולחים יעלה עם הזמן וכתוצאה מכך יעלו גם ערכי ה-SUVA, ויהיו דומים יותר לערכי ה-SUVA של חא"מ מנקז שפירים.

ריכוז הנחושת במי הקולחים היה הנמוך ביותר (6 מיקרו גרם לליטר בממוצע). ריכוז הנחושת הממוצע במי-הנקז מהשקיה במים שפירים היה 17 מיקרו גרם לליטר. ריכוז הנחושת הממוצע במי-הנקז מהשקיה במי קולחים היה 22 מיקרו גרם לליטר. מבחינה סטטיסטית לא היה הבדל בריכוז הנחושת בין שני סוגי מי-הנקז (Anova: single factor).

4.2 הפרדת החא"מ למקטעי גודל:

דוגמאות חא"מ הופרדו למקטעי גודל להלן: חא"מ $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$, $1 \text{ kDa} > \text{חא"מ} > 200 \text{ Da}$, חא"מ $> 200 \text{ Da}$. בכל אחד מהמקטעים נבדקו המדדים הבאים: תכולת פא"מ (בדוגמאות לא נמצא פחמן אי-אורגני מסיס), מוליכות חשמלית (EC), pH, צפיפות אופטית באורך גל 256 nm וערכי SUVA באורך גל זה, ותכולת מתכות. התפלגות החומר האורגני בין מקטעי הגודל השונים מוצגת בטבלה 4.2. כ-93%, וכ-89% מכלל החומר האורגני היה קטן מ- $0.45 \mu\text{m}$ במי הקולחים ובשני סוגי מי-הנקז, בהתאמה. כ-60% מהחא"מ במי הקולחים היה קטן מ- 1 kDa . במי-הנקז, כ-46% וכ-40% מהחא"מ היה קטן מ- 1 kDa בהשקיה במים שפירים ובהשקיה במי קולחים, בהתאמה. נראה שהחומר האורגני במי הקולחים הוא יותר קטן מולקולרית מהחומר האורגני בשני סוגי מי-הנקז ערכים ממוצעים וסטיות תקן מופיעים בטבלאות 4.3-4.6 וכלל התוצאות מופיעות בנספח 2. חשוב לציין כי דוגמאות החא"מ לפני הסינון על ממבראנה של 1 kDa , עברו החמצה עד ל-pH 5 כמתואר בפרק חומרים ושיטות, והתרכיז שהתקבל לאחר הסינון (חא"מ $< 1 \text{ kDa}$) נשטף עד למוליכות חשמלית של 1 mS/cm . משום כך, ערכי ה-pH שהתקבלו עבור התרכיזים הנ"ל היו נמוכים מאילו שבדוגמאות המקוריות. ערכי המוליכות החשמלית של התרכיזים שהתקבלו לאחר סינון זה (חא"מ $> 1 \text{ kDa}$) בדוגמאות חא"מ ממי-הנקז, היו גבוהים בסדר גודל מאילו של התרכיזים (חא"מ $< 1 \text{ kDa}$) וזאת מכיוון שאלה למעשה ערכי המוליכות החשמלית של דוגמאות החא"מ המקוריות לאחר החמצה שגרמה לעלייה נוספת של ערכים אלו.

טבלה 4.2: התפלגות החומר האורגני בין מקטעי הגודל השונים

מקטעי הגודל	מי קולחים	נקז שפירים	נקז קולחים
כלל החומר האורגני (%)	100	100	100
(< 0.45 μm) (%)	93	89	89
(< 1 kDa) (%)	60	46	40

טבלה 4.3: ערכים בסיסיים ממוצעים וסטיות תקן של דוגמאות חא"מ לאחר הפרדה על ממברנה של 1 kDa

תרכיז- חא"מ < 1 kDa ; תסנין- חא"מ > 1 kDa

SUVA ₂₅₆ L (mg ⁻¹ m ⁻¹)	OD ₂₅₆	pH	EC mS/cm	DOC mg/L	סוג הדוגמה	שם הדוגמה*
1.08±0.42	0.84±0.48	5.6±0.9	1.8±0.3	79±30	תרכיז	EW
2.36±1.23	0.30±0.21	5.0±0.8	2.0±0.1	13±5	תסנין	
2.91±1.02	21.33±16.01	6.1±0.8	2.2±0.2	717±356	תרכיז	TL
2.59±0.29	2.48±0.24	5.5±1.1	30±6.6	97±20	תסנין	
3.16±0.24	21.08±2.97	6.2±0.5	2.3±0.3	669±92	תרכיז	EL
2.60±0.15	2.50±0.63	5.3±0.6	29.6±15.1	96±22	תסנין	

* EW- מי קולחים, דוגמאות 1-4; TL- נקז שפירים, דוגמאות 1-4; EL- נקז קולחים, דוגמאות 1-4

טבלה 4.4: ערכים בסיסיים ממוצעים וסטיות תקן של דוגמאות חא"מ לאחר הפרדה על ממברנה של 200 Da

תרכיז- < 1 kDa חא"מ < 200 Da, תסנין- חא"מ > 200 Da

SUVA ₂₅₆ L (mg ⁻¹ m ⁻¹)	OD ₂₅₆	pH	EC mS/cm	DOC mg/L	סוג הדוגמה	שם הדוגמה*
1.30±0.08	0.28±0.09	5.8±0.6	1.2±0.1	21±6	תרכיז	EW
3.79±3.13	0.03±0.00	6.1±0.4	0.7±0.2	1±1	תסנין	
2.28±0.93	1.42±0.34	6.1±0.4	2.0±1.0	71±31	תרכיז	TL
3.19±1.87	0.09±0.05	6.4±0.2	2.2±0.7	3±1	תסנין	
2.41±0.32	1.04±0.62	6.2±1.2	1.4±0.7	42±20	תרכיז	EL
3.33±0.00	0.07±0.05	6.2±1.1	2.1±0.8	2±1	תסנין	

* EW- מי קולחים, דוגמאות 2, 4; TL- נקז שפירים, דוגמאות 1-4; EL- נקז קולחים, דוגמאות 1, 3

טבלה 4.5: ריכוזי מתכות ממוצעים וסטיות תקן של דוגמאות החא"מ לאחר הפרדה על ממברנה של 1 kDa

תרכיז - חא"מ < 1 kDa ; תסנין - חא"מ > 1 kDa

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*
75±17 61±2	24±1 26±1	30±5 24±4	731±701 68±23	194±133 93±39	651±110 567±35	49±10 12±3	9±6 4±0	45±27 23±8	29±11 6±1	47±18 7±0	<IDL <IDL	53±24 47±12	תרכיז תסנין	EW
99±32 524±171	58±25 440±99	52±22 568±151	3144±5201 331±105	296±223 331±258	802±248 4209±1027	350±324 341±86	260±350 20±8	97±98 149±132	104±65 22±3	12±3 7±2	37±19 19±8	37±22 236±118	תרכיז תסנין	TL
49±19 146±68	51±22 360±308	49±27 398±308	1908±1732 482±270	232±111 230±134	738±203 2996±1599	288±155 271±252	25±22 38±11	165±270 367±591	69±48 18±14	22±11 7±2	30±17 20±11	60±32 185±114	תרכיז תסנין	EL

* EW - מי קולחים, דוגמאות 1-4; TL - נקז שפירים, דוגמאות 1-4; EL - נקז קולחים, דוגמאות 1-4
IDL-Instrumental detection limits

טבלה 4.6: ריכוזי מתכות ממוצעים וסטיות תקן של דוגמאות החא"מ לאחר הפרדה על ממברנה של 200 Da

תרכיז - חא"מ < 1 kDa ; תסנין - חא"מ > 200 Da

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*
70±4 16±7	32±1 5±2	5±2 10±0	55±22 6±3	156±9 27±8	648±46 139±55	23±10 8±0	6±0 <IDL	29±10 7±3	13±0 5±0	7±0 5±0	5±0 5±0	55±0 13±8	תרכיז תסנין	EW
68±79 26±14	198±135 23±10	5±5 44±12	727±768 27±1	241±115 24±5	1628±1202 214±116	315±191 14±3	23±20 4±0	93±119 12±8	8±4 <IDL	13±5 <IDL	11±10 <IDL	75±41 15±10	תרכיז תסנין	TL
37±30 12±2	79±36 23±8	11±8 32±31	390±513 57±68	159±35 47±39	593±372 189±27	177±78 25±0	13±0 <IDL	419±0 77±0	13±0 <IDL	14±0 5±0	5±1 <IDL	44±35 16±5	תרכיז תסנין	EL

* EW - מי קולחים, דוגמאות 2, 4; TL - נקז שפירים, דוגמאות 1-4; EL - נקז קולחים, דוגמאות 1, 3
IDL-Instrumental detection limits

4.3 הומיוניזציה של דוגמאות חא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa:

הומיוניזציה בוצעה לחא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa. מטרת התהליך הייתה להחליף מתכות הקשורות לחא"מ בנתרן, ולגרום לפריסה מרבית של מרכיבי החא"מ. הנפח ההתחלתי של התמיסה היה שווה לנפחה בסוף התהליך (120 מ"ל), למעט דוגמה אחת (EL-1) שבה הנפח ההתחלתי היה 120 מ"ל והנפח הסופי היה 50 מ"ל. החמצת התמיסה ל-pH 3.8 (שלב 16 בתהליך ההומיוניזציה, מופיע בפרק חומרים ושיטות בסעיף 3.3.3), בוצעה ע"מ לסלק קרבונאטים. אמנם ריכוז הנתרן היה גבוה כשלושה סדרי גודל מריכוז הפרוטונים, אך מכיוון שפרוטונים נקשרים חזק יותר לחא"מ, ייתכן ששלב זה גרם להחלפת חלק מהנתרן בפרוטונים.

דוגמאות חא"מ לפני ואחרי הומיוניזציה אפיינו עפ"י אותם הפרמטרים המופיעים בסעיף 4.2. תוצאות נבחרות מוצגות בטבלה 4.7.

יתר התוצאות מוצגות בנספח 3. הטבלה הראשונה בנספח 3 מציגה את הערכים הבאים של התסנינים שהתקבלו בשלבי התהליך השונים: ריכוז הפא"מ (מ"ג לליטר), מוליכות חשמלית (mS/cm), pH וצפיפות אופטית ב-256 nm. הטבלה השנייה בנספח 3 מציגה את ריכוזי המתכות (למעט המתכות המופיעות בטבלה 4.7) לפני ואחרי תהליך ההומיוניזציה.

טבלה 4.7: אפיון בסיסי של דוגמאות חא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa, לפני ואחרי הומיוניזציה

K mg/L	Ca mg/L	Mg mg/L	Fe µg/L	Cu µg/L	SUVA L (mg ⁻¹ m ⁻¹)	OD ₂₅₆	pH	איבוד %	DOC mg/L	סימול הדוגמה*
35	87	25	1501	32	1.07	0.96	6.1		89	EW2-BH
3	11	5	346	23	0.54	0.34	5.2	29	63	EW2-AH
25	56	24	130	17	1.41	0.54	5.9		38	EW4-BH
nd	nd	nd	nd	nd	1.24	0.46	5.5	3	37	EW4-AH
53	56	42	331	39	2.63	10.6	5.4		404	TL1-BH
<IDL	<IDL	<IDL	392	62	3.07	10.2	4.5	18	332	TL1-AH
29	97	44	507	74	3.53	16.1	5.8		456	TL3-BH
1	32	16	387	84	3.76	15.9	5.0	7	423	TL3-AH
35	65	58	4320	26	2.87	22.2	6.9		775	EL1-BH
6	21	12	4025	29	3.79	21.4	4.5	27	564	EL1-AH
81	54	67	439	116	3.46	24.4	5.5		705	EL3-BH
1	15	16	192	104	3.60	22.0	4.7	13	611	EL3-AH

*EW- מי קולחים; TL- נקז שפירים; EL- נקז קולחים; BH- לפני הומיוניזציה; AH- אחרי הומיוניזציה
IDL-Instrumental detection limits ;nd-not detected

ריכוז הפא"מ ירד בתהליך ב-29% (טבלה 4.7). מכיוון שההומיוניזציה בוצעה על ממבראנה בגודל נקבובים של 200 Da, סביר להניח כי רוב הפא"מ שאבד בתהליך היה קטן מ-200 Da. ערכי SUVA באורך גל של 256 nm בחא"מ ממי

הקולחים ירדו עקב ההומיוניזציה, ועלו בשני סוגי מי-הנקז. השינוי בערכי ה-SUVA עשוי להיות קשור לאיבוד חלק מהחא"מ בתהליך, וככל הנראה החא"מ שאבד בדוגמאות ממי הקולחים מכיל יותר שיירים ארומטיים, בעוד שחא"מ שאבד ממי-הנקז מכיל חומרים שאינם בולעים בתחום ה-UV (חומרים יותר אליפטיים). המתכות שסולקו בתהליך, היו בעיקר מתכות מאקרו (Ca, Mg, K) שקשירתן לחא"מ היא ככל הנראה אינה ספציפית, בעוד שמתכות מעבר הושפעו רק בחלק מהמקרים מהתהליך. בדוגמה TL-1 לאחר ההומיוניזציה, ריכוז הנחושת עלה (מ-39 ל-62 מיקרו גרם לליטר) וכך גם ריכוז הברזל (מ-331 ל-392 מיקרו גרם לליטר). ייתכן שהסיבה לכך כרוכה בדחיקה הנוספת של התרכיז שהתקבל לאחר שלב 10 בתהליך ההומיוניזציה (פרק חומרים ושיטות בסעיף 3.3.3).

ניסויים נוספים לסילוק מתכות מהחא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa בוצעו ע"י (התוצאות אינן מוצגות):

1. שימוש בשרף פולימרי (Chelex-100) בעל קבוצות קרבוקסיליות.

התוצאות הראו ירידה נמוכה יחסית בריכוז המתכות (לדוגמה: 30% מהברזל, ו-50% מהנחושת), ובנוסף לכך הייתה ירידה של כ-40% בריכוז הפא"מ.

2. שימוש ב- LaCl_3 לסילוק המתכות, בהנחה שהלנתן יקשר לחא"מ ויגרום לסילוק המתכות לתמיסה המימית. גם שיטה זו לא הייתה יעילה והמתכות נותרו קשורות לחא"מ.

ככל הנראה, מתכות מעבר הקשורות לחא"מ כמעט ואינן ניתנות לסילוק וזאת עקב היווצרות קומפלקסים חזקים שקשה לפרקם.

4.4 אנליזת פרוטונים $^1\text{H-NMR}$ של דוגמאות חא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa ובמקטע הגדול

1 kDa < חא"מ < 200 Da:

אנליזת $^1\text{H-NMR}$ נעשתה ע"מ לקבל מידע על הקבוצות המכילות מימנים ועשויות לקשור נחושת.

הספקטרה שהתקבלו היו קשים לפענוח עקב אופיו ההטרוגני של החא"מ, וסביבות כימיות שונות שבהן מופיעים

מימנים (איור 4.1). ניתוח הספקטרום בוצע ע"י חלוקתו ל-4 אזורים המאפיינים קבוצות שונות של מימנים

(Peuravuori and Pihlaja, 1998).

אזור 0.5-2 ppm מיוחס למימנים אליפטיים (מימנים אליפטיים כוללים אך ורק מימנים על פחמן הקשור בקשר יחיד

לפחמן השכן), אזור 2-3 ppm מיוחס למימנים אליפטיים הנמצאים בעמדה α לקבוצות מושכות אלקטרונים כגון קשר

כפול, קרבוניל, קרבוקסיל וטבעת ארומטית. אזור 3-4.6 ppm מיוחס למימנים אליפטים על פחמן הקשור לחמצן כגון פחמן אתרי, אסטרי או כוהלי. אזור 6.2-9 ppm מיוחס למימנים על טבעות ארומטיות וקבוצות אלדהידיות. הפיק המתקבל באזור 4.6 ppm, מאפיין את המימנים של המים (מימנים שעברו חילוף חלקי עם דאוטריום). מימנים וינילים (מימנים על פחמן הקשור בקשר כפול לפחמן שכן) לא אופיינו מכיוון שאזור הבליעה עבורם הוא 5-6.5 ppm (Gigliotti et al., 1997), ולכן אזור זה כלל לרוב את הפיק המשמעותי שהתקבל מהמימנים של המים. אינטגרציה של האזורים השונים בספקטרום מאפשרת השוואה בין ריכוזי המימנים בכל קבוצה, כאשר השטח של אזור המימנים הארומטים מוגדר כ-1, והשטחים ביתר האזורים נורמלו לפיו. ערכי האינטגרציה של השטחים (חסרי יחידות) והיחסים בין שטחי האזורים השונים מוצגים בטבלה 4.8.

טבלה 4.8: נתוני האינטגרציה עבור אנליזת $^1\text{H-NMR}$

מקטע גודל	סימול הדוגמה*	מימנים אליפטים 0.5-2 ppm	מימנים אליפטים ליד קב' מושכות אלק' 2-3 ppm	מימנים אליפטים ליד חמצן 3-4.6 ppm	מימנים ארומטים 6.2-9 ppm	ארומטי/אליפטי	ארומטי/מימנים אליפטים ליד קב' מושכות אלק'	ארומטי/מימנים אליפטים ליד חמצן
חא"מ < 1kDa	EW2	4.8	2.1	4.9	1	0.2	0.5	0.2
	EW4	3.2	1.5	4.3	1	0.3	0.7	0.2
	TL1	1.9	0.8	3.3	1	0.5	1.3	0.3
	TL3	1.6	0.8	1.6	1	0.6	1.3	0.6
	EL1	1.7	0.9	2.7	1	0.6	1.1	0.4
EL3	1.3	0.8	1.8	1	0.8	1.3	0.6	
חא"מ < 1kDa < 200Da	EW2	3.4	1.4	1.6	1	0.3	0.7	0.6
	EW4	2.4	2.5	3.1	1	0.4	0.4	0.3
	TL1	2.9	0.8	1.2	1	0.3	1.3	0.8
	TL2	5.2	1.9	0.8	1	0.2	0.5	1.3
	TL3	10.6	4.9	2.4	1	0.1	0.2	0.4
	TL4	4.6	3.4	3.2	1	0.2	0.3	0.3
EL1	2.2	0.9	0.6	1	0.5	1.1	1.7	
EL3	8.0	4.3	4.0	1	0.1	0.2	0.3	

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

חא"מ מהמקטע הגדול מ-1kDa במי הקולחים היה שונה מהחא"מ בשני סוגי מי-הנקז (איור 4.1 א'; טבלה 4.8). חא"מ ממי הקולחים היה יותר אליפטי והיה בו ריכוז גבוה יותר של מימנים אליפטים ליד קבוצות מושכות אלקטרוניים ומימנים אליפטים על פחמנים הקשורים לחמצן וריכוז נמוך יותר של מימנים ארומטים, יחסית לחא"מ משני סוגי מי-הנקז.

מגמה דומה נמצאה ע"י Gigliotti וחבריו (1997) שהשוו בין חא"מ שמוצה מקומפוסט משפכים עירוניים לבין חא"מ שמוצה מקרקע שטופלה בקומפוסט הנ"ל במשך 6 שנים (הטיפול נערך כל שנה במשך 6 שנים והקרקע המטופלת נבדקה 4 חודשים לאחר הטיפול האחרון).

החא"מ בקומפוסט היה יותר אליפטי, היה בו ריכוז גדול יותר של מימנים אליפטיים ליד קבוצות מושכות אלקטרוניים, והוא הכיל פחות מימנים ארומטיים.

Ma וחבריו (2001) הפרידו חא"מ ממי קולחים שניוניים למקטע הידרופילי, חומצות פולביות וחומצות הומיות (שכללו רק 1.7% מכלל החא"מ). רוב החא"מ נמצא במקטע ההידרופילי (55.8%) שהכיל 91.8% מימנים אליפטיים (0-4 ppm) ו-8.2% מימנים ארומטיים (6-8.6 ppm). מקטע החומצות הפולביות הכיל 83% מימנים אליפטיים ו-17% מימנים ארומטיים. החא"מ מנקז קולחים והחא"מ מנקז שפירים היו דומים, ושונים מהחא"מ במי הקולחים. החא"מ במי-הנקז היה יותר ארומטי, הוא הכיל יחסית פחות מימנים אליפטיים ליד קבוצות מושכות אלקטרוניים ופחות מימנים אליפטיים על פחמנים הקשורים לחמצן. Gigliotti וחבריו (1997) מצאו כי בחא"מ שמוצה מקרקע שטופלה בקומפוסט (במשך 6 שנים) עלה ריכוז המימנים על פחמנים נושאי חמצן, בהשוואה לחא"מ שמוצה מהקרקע ללא קומפוסט.

בחא"מ ממקטע הגודל $1\text{kDa} < \text{חא"מ} < 200\text{Da}$ לא נמצאו למעשה הבדלים משמעותיים בין מי הקולחים לבין שני סוגי מי-הנקז, או בין נקז קולחים לנקז שפירים (איור 4.1 ב'; טבלה 4.8).

בהשוואה בין שני מקטעי הגודל של אותן הדוגמאות, במקטע הגודל הקטן ($1\text{kDa} < \text{חא"מ} < 200\text{Da}$) של חא"מ במי הקולחים היה ריכוז מימנים אליפטיים נמוך יותר מאשר במקטע הגודל מ- 1kDa . לעומת זאת, במקטע הגודל הקטן של חא"מ בשני סוגי מי-הנקז היה ריכוז מימנים אליפטיים גבוה יותר מאשר במקטע הגודל מ- 1kDa .

הדמיון של החא"מ משני סוגי מי-הנקז במקטע הגודל מ- 1kDa יכול לתמוך בהשערה שתהליכים מיקרוביאליים ותהליכים אחרים כגון פעילות אינזימטית ותהליכים אביוטיים אחרים המתרחשים בקרקע, הם המשפיעים על הרכב החא"מ, ללא קשר למקורו. אישור נוסף לכך הוא השוני הבולט בין החא"מ המצוי במי הקולחים לבין החא"מ המופיע במי-הנקז בהשקיה במי הקולחים.

4.5 אנליזת FTIR של דוגמאות חא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa ובמקטע הגדול

<1 kDa חא"מ <200 Da:

הספקטרה של דוגמאות החא"מ השונות, מרוכזים באיור 4.2. נתוני הפיקים העיקריים שנמצאו ואפיונם מופיעים בטבלה 4.9. בכל דוגמאות החא"מ ובשני מקטעי הגודל נמצא פיק רחב באזור $3400-3300\text{ cm}^{-1}$ (A), המאפיין מימן הקשור לחמצן או לחנקן, וניתן להניח שבפיק זה ישנה גם תרומה מסוימת של מימן השייך למים שלא סולקו עד תום בייבוש. משום כך לא נערכה השוואה של פיק זה בין דוגמאות החא"מ השונות.

ניתוח הספקטרה היה איכותי בלבד ולא בוצעה אינטגרציה של שטחי הפיקים השונים.

איור 4.3 מציג את הספקטרה של הדוגמאות השונות בצורה הנוחה להשוואה ביניהם.

טבלה 4.9: אפיון הפיקים המתקבלים מאנליזת FTIR

(לפי Silverstein et al., 1991; Solomon and Fryhle, 2004)

מיקום הבליעה cm^{-1}	סימון איזור הבליעה	אפיון הבליעה
פיק רחב 3400-3300	A	מיתוח של O-H (כהל, פנול, מים או קב' קרבוקסילית), ו/או מיתוח N-H באמין
2940-2850	B	מיתוח של קשר C-H צמוד לקשר יחיד (C-C-H) ו/או לקשר כפול (C=C-H)
1650-1620	C	מיתוח C=C באלקן או בטבעות ארומטיות, ו/או מיתוח O=C בקבוצה קרבוקסילית, קטון או אלדהיד
1400-1380	D	כיפוף קשר C-O-H בקבוצה קרבוקסילית, ו/או כיפוף קשר O-H בכוהל או פנול, ו/או כיפוף של קשר C-H במתיל או מתילן
1150-1090	E	מיתוח C-O בכוהל, פנול, אסטר, אתר (בפוליסוכרים או בפחמימות)

4.5.1 דוגמאות חא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa:

הספקטרה של דוגמאות החא"מ במקטע גדול זה, מוצגים באיור 4.2 א', ו- 4.3 א'. בחא"מ ממי הקולחים ניתן לראות תרומה דומה של הבליעות באזורים C ו-E, בעוד שאזור הבליעה D היה קטן יחסית. בחא"מ משני סוגי מי-הנקז, הבליעה באזור C בעלת תרומה רבה יותר מבליעה באזורים D ו-E. הבליעה באזור C עשויה להיות תמיכה נוספת בתוצאות שהתקבלו עד כה מנתוני ה-SUVA ונתוני אנליזת ה- $^1\text{H-NMR}$, לכך שחא"מ משני סוגי מי-הנקז, הוא יותר ארומטי מחא"מ ממי קולחים, אך בנוסף לכך זוהי גם עשויה להיות עדות לכך שבחא"מ של מי-הנקז ישנו ריכוז גבוה יותר של קבוצות קרבוקסיליות, קטונים או אלדהידים. תרומתם של אזורי הבליעה B ו-D בחא"מ משני סוגי מי-הנקז, הייתה רבה יותר מתרומתם בחא"מ ממי קולחים. אזור הבליעה B מאפיין מבנים אליפטים (באלקנים או באולפינים), ולכן ניתן לומר שבנוסף לכך שחא"מ משני סוגי

מי-הנקז מכיל יותר מבנים ארומטים, הוא עשוי להכיל גם יותר מבנים אליפטים מאשר חא"מ ממי הקולחים. אזור הבליעה D עשוי לציין מצד אחד שחא"מ משני סוגי מי-הנקז הוא יותר אליפטי מחא"מ ממי הקולחים, ו/או מצד שני זוהי עשויה להיות הוכחה לכך שחא"מ משני סוגי מי-הנקז מכיל יותר קבוצות קרבוקסיליות, כהלים או פנולים מחא"מ ממי הקולחים. סביר להניח שחא"מ משני סוגי מי-הנקז מכיל יותר קבוצות קרבוקסיליות, כהלים או פנולים, ואינו יותר אליפטי מחא"מ ממי הקולחים, שכן קשירת הנחושת לחא"מ ממי הקולחים הייתה נמוכה מקשירתה לחא"מ ממי-הנקז (סעיף 4.7) וככל הנראה הסיבה לכך הייתה ריכוז גבוה יותר של קבוצות קושרות נחושת (קרבוקסיל, כוהל ופנול) בחא"מ ממי-הנקז.

4.5.2 דוגמאות חא"מ במקטע הגודל $1\text{kDa} < \text{חא"מ} < 200\text{ Da}$:

הספקטרה של דוגמאות החא"מ במקטע גודל זה, מוצגים באיור 4.2 ב', ו- 4.3 ב'. במקטע גודל זה, נמצאו אזורי בליעה הדומים לאלו שנמצאו במקטע הגודל הקודם (סעיף 4.5.1), אך תרומתם היחסית הייתה שונה. במקטע גודל זה נמצאה תרומה עיקרית של הבליעה באזור E בכל סוגי החא"מ, כלומר החא"מ במקטע גודל זה מכיל ריכוז גבוה של קבוצות כהליות, פנוליות, אסטרויות ואתריות (פוליסוכרים ו/או פחמימות). בחא"מ ממי הקולחים ישנה תרומה רבה יותר של בליעה באזור D, בעוד שבשני סוגי מי-הנקז תרומתה של הבליעה באזור D קטנה יותר. מכך ניתן לומר שחא"מ ממי קולחים הוא יותר אליפטי ו/או מכיל ריכוז יחסי גבוה יותר של קבוצות קרבוקסיליות, כהלים ופנולים מאשר חא"מ משני סוגי מי-הנקז. בהשוואה בין שני מקטעי הגודל, בדוגמאות חא"מ במקטע הגודל $1\text{kDa} < \text{חא"מ} < 200\text{ Da}$ נצפתה ירידה בעוצמת הבליעה באזור B המאפיין מבנים אליפטים. הירידה בעוצמת הבליעה באזור זה, הייתה משמעותית יותר בדוגמאות חא"מ משני סוגי מי-הנקז, ופחות משמעותית בדוגמאות חא"מ ממי קולחים. מכיוון שבנוסף לכך נצפתה ירידה בעוצמת הבליעה באזור D (המאפיין גם מבנים אליפטים) של חא"מ במי-הנקז במקטע הגודל

$1\text{kDa} < \text{חא"מ} < 200\text{ Da}$ ביחס למקטע הגודל מ- 1 kDa , ניתן לקבוע כי זוהי הוכחה נוספת לכך שחא"מ במי-הנקז במקטע הגודל $1\text{kDa} < \text{חא"מ} < 200\text{ Da}$ הוא פחות אליפטי מחא"מ הגדול מ- 1 kDa . בליעה באזור D עלתה בדוגמאות חא"מ ממי הקולחים במקטע הגודל $1\text{kDa} < \text{חא"מ} < 200\text{ Da}$ לעומת אותן הדוגמאות במקטע הגודל מ- 1 kDa . מכך ניתן לומר שחא"מ במי הקולחים במקטע הגודל הקטן הוא יותר אליפטי, ו/או מכיל יותר קבוצות קרבוקסיליות, כהלים ופנולים. תרומתה של הבליעה באזור C הייתה באופן כללי דומה בחא"מ בשני מקטעי הגודל ולכן היה קשה להצביע על עלייה בארומטיות בדוגמאות חא"מ במקטע הגודל הקטן.

תרומת הבליעה באזור E בשלושת סוגי החא"מ הייתה גבוהה יותר במקטע הגודל $1\text{kDa} < \text{חא"מ} < 200\text{ Da}$, בהשוואה למקטע הגדול מ- 1 kDa . מכך ניתן לומר שחא"מ במקטע הגודל הקטן מכיל יותר קבוצות כוהליות, פנוליות, אסטריות ואתריות מחא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa .

מכיוון שכימות אזורי הבליעה אינו נעשה ע"י חישוב מדויק, ייתכנו טעויות בהערכת התרומה היחסית של כל אזור, אך באופן כללי ניתן לומר שהספקטרה שהתקבלו דומים למדווח בספרות עבור חא"מ מהקרקה ומשפכים שונים.

Khalaf (2003) השווה את ספקטרה הבליעה במקטעי גודל שונים של חומצות הומיות שהופקו מקרקע חומצית (Orthic Luvisol). מקטע הגודל $1-3\text{ kDa}$ של החומצות ההומיות היה בעל עוצמת פיק נמוכה באזור $2920-2850\text{ cm}^{-1}$ (המציין מיתוח של קשר C-H במתיל, מתילן או מתין) בהשוואה לחומצות ההומיות עצמן (לפני או אחרי סינון בפילטר $0.2\text{ }\mu\text{m}$), וכמו כן הייתה עלייה בעוצמת הפיק באזור $1400-1380\text{ cm}^{-1}$ (שציין מיתוח של קשר C-O בקבוצת R-COO^-). בשילוב אנליזת NMR (^{13}C , ^{19}F) ו-UV-VIS, Khalaf (2003) העריך שהמרכיב בעל המשקל המוליקולרי הקטן של החומצות ההומיות היה בעל תכולה נמוכה יחסית של חומרים האליפטים, ובעל פולריות גבוהה יותר ותכולה יחסית גבוהה יותר של חומרים ארומטים.

Duarte וחבריו (2003) אפיינו מקטעי גודל שונים ($>50\text{ kDa}$, $10-50\text{ kDa}$, $8-10\text{ kDa}$, $5-8\text{ kDa}$, $<5\text{ kDa}$), ובנוסף מקטעי הגודל $>1\text{ kDa}$, $<1\text{ kDa}$ של חומצות פולביות של חא"מ שהופק מפסולת נוזלית המתקבלת ממפעל לעיבוד עץ (עיבוד העץ ליצירת נייר או סיבי עץ לשימושים אחרים). החוקרים מצאו כי ירידה בגודל המולקולרי של החא"מ (המקטע הקטן מ- 5 kDa בהשוואה לחומצות הומיות שלא עברו הפרדת גודל, וכן המקטע הקטן מ- 1 kDa בהשוואה למקטע הגדול מ- 1 kDa) הייתה מלווה בעלייה בעוצמת הפיקים באזור 1518 cm^{-1} ובאזור 1114 cm^{-1} . הפיק הראשון מציין מיתוח של קשר $\text{C}=\text{C}$ ארומטי (בדומה לאזור C בטבלה 4.9 שנמצא בתדירות גבוהה יותר), והפיק השני מציין מיתוח של קשר C-O (בדומה לאזור E בטבלה 4.9). מסקנת החוקרים הייתה שחא"מ קטן מולקולרית מכיל ריכוז יחסי גבוה יותר של חומרים ארומטים, וכמו כן הוא יותר מחומצן מחא"מ גדול מולקולרית.

Chefetz וחבריו (1998) ו-Hsu וחבריו (1999) הראו שחא"מ שמוצה מקומפוסט לאחר תקופות הבשלה שונות (קומפוסט שעובר ייצוב מיקרוביאלי אירובי), נעשה פחות אליפטי ויותר ארומטי והוא הכיל פחות פוליסוכרים, (ירידה בעוצמת הבליעה באזורים המסומנים בטבלה 4.9 באותיות E, B). Pullicino (2002) הדגיש שחא"מ בקומפוסט דומה

בתכונותיו הספקטרליות לחא"מ מקרקע מכיוון שבשני המקרים החומר האורגני עובר ייצוב מיקרוביאלי שבסופו נותרים החומרים העמידים יותר לפירוק (בעיקר חומרים ארומטיים).

4.6 אפיון פלואורסצנטי תלת מימדי, (EEM), של דוגמאות חא"מ במקטע הגדול מ-1kDa, ובמקטע הגדול

1kDa < חא"מ < 200Da:

המפות הפלואורסצנטיות מאפשרות השוואה נוספת של שלושת סוגי החא"מ: חא"מ ממי הקולחים ומשני סוגי מי-הנקז. דוגמאות החא"מ היו בריכוז 20 מ"ג פא"מ לליטר, pH 4.6-4.8, ו-EC ≈ 1 mS/cm. ניתוח המפה נעשה עפ"י Coble, 1996; Baker and Genty, 1999; Chen, W. et al., 2003; Her et al., 2003; Baker and Spencer, 2004. תופעת הפלואורסצנטיה מאופיינת בפליטת אור באורך גל ארוך יותר מאורך הגל הנקלט בחומר ויוצר את העירור, זאת מכיוון שהאנרגיה הנפלטת לאחר העירור, נמוכה מאנרגיית העירור עצמה. משום כך, כפי שיוצג בהמשך, במפות מופיע קו אלכסוני המאפיין באורכי גל שווים לעירור ופליטה, והפיקים הפלואורסצנטיים מופיעים מימין לקו זה כאשר אורך הגל לפליטה גבוה מאורך גל העירור. משמאל לקו האלכסוני הופיע פיק נוסף שמקורו ככל הנראה בפיזור אור או בשגיאה ניסויית של המערכת, ולא בתכונות הפלואורסצנטיות של החומר. בשלב זה, לא הייתה התייחסות לעוצמת הפיקים מכיוון שלא בוצע תיקון של IFE (המתואר בסעיף 3.3.9 בפרק "חומרים ושיטות").

4.6.1 חא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa:

באיור 4.4 א', מופיעות המפות הפלואורסצנטיות של דוגמאות החא"מ השונות (מי קולחים, נקז שפירים ונקז קולחים) במקטע גודל זה. בכל דוגמאות החא"מ נראו שני פיקים מרכזיים שסומנו באותיות A ו-B (איור 4.5 א'). עפ"י Coble, 1996; Wu et al., 2001; Baker and Genty, 1999; Leenheer and Croué 2003, פיקים אלו מייצגים חומרים הומיים (חומרים דמויי חומצות פולביות/הומיות), בחא"מ ממי קולחים נמצאו פיקים שלא נראו בחא"מ משני סוגי מי-הנקז. פיק C שמייצג את חומצת האמינו טריפטופאן, מאפיין חומרים דמויי חלבונים שמקורם בפירוק ביולוגי. בנוסף נראה פיק נוסף פחות ברור ("כתף") שמוקם בעירור באזור 250 nm ובפליטה באזור 360 nm, ומייצג את חומצת האמינו טירוזין, מאפיין "חלבונים" ארומטיים. Mayer וחבריו

(1999) בנו מפות פלואורסצנטיות עבור טריפטופאן וטירוזין ממקורות שונים (תמיסות טהורות, חלבונים, ודוגמאות מים משפך נהר בארה"ב), וזיהו פיקים באורכי גל דומים לאורכי הגל שזוהו בעבודה זו.

שני הפיקים הנ"ל זוהו בשפכים עירוניים בדרגות שונות (Westerhoff et al., 2001; Chen, 2002; Chen, W. et al., 2003). Saadi וחבריו (2006) בדקו דוגמאות הא"מ שהופקו משפכים עירוניים מטופלים (מי הקולחים שהתקבלו היו דומים באיכותם למי הקולחים שבהם נעשה שימוש בעבודה זו). החוקרים זיהו שלושה פיקים פלואורסצנטים הדומים במיקומם לפיקים המתוארים בעבודה זו (פיקים A, B, ו-C).

איור 4.5 א' מראה את מיקום הפיקים הפלואורסצנטים עבור דוגמאות הא"מ במקטע הגודל הנדון. פיקים A, B ו-C מרוכזים באזורים דומים במפה הפלואורסצנטית בכל סוגי המים, כאשר פיק C מופיע רק בדוגמאות הא"מ ממי הקולחים. טבלה 4.10 מציינת את מיקום הפיקים הפלואורסצנטים עבור דוגמאות החא"מ השונות.

טבלה 4.10: מיקום הפיקים הפלואורסצנטים בדוגמאות הא"מ במקטע הגודל מ-1 kDa

Excitation/emission nm	סימון הפיק	שם הדוגמה	excitation/emission nm	סימון הפיק	שם הדוגמה	excitation/emission nm	סימון הפיק	שם הדוגמה
275/440 329/440	A B	EL-2	261/449 330/447	A B	TL-1	275/438 333/437 277/338	A B C	EW-1
278/439 331/440	A B	EL-3	273/441 331/443	A B	TL-2	276/437 330/435 280/342	A B C	EW-2
277/439 333/440	A B	EL-4	260/448 333/445	A B	TL-3	276/436 331/436 279/350	A B C	EW-3
			260/451 331/446	A B	TL-4	274/437 333/435 279/347	A B C	EW-4

בפיקים A ו-B, מיקום אורך גל הפליטה יורד בסדר הבא: נקז שפירים < נקז קולחים < מי קולחים. פליטה באורכי גל ארוכים יותר עשויה להצביע על מספר רב יותר של טבעות ארומטיות מצומדות, ו/או עלייה במספר הקבוצות הפונקציונליות (כגון קרבוקסיל, פנול וניטרו) הקשורות למבנים ארומטיים. מבנים אלה גורמים לעלייה באל-איתור (דלוקאליזציה) של אלקטרוני π במערכת וכתוצאה מכך גורמים להקטנת הפרש האנרגיה בין המצב המעורר למצב היסוד ולאורכי גל ארוכים יותר (Senesi, 1990; Ferrari and Mingazzini, 1995; Komada et al., 2002). זוהי עשויה להיות ראייה נוספת לכך שחא"מ ממי קולחים הוא פחות ארומטי מחא"מ משני סוגי מי-הנקז. חא"מ בשני סוגי מי-הנקז הוא יותר ארומטי וככל הנראה

החא"מ במי-הנקז מהשקיה במים שפירים הוא בעל מבנה ארומטי יותר מצומד ו/או הוא מכיל ריכוז גבוה יותר של קבוצות פונקציונליות.

איור 4.6 א' מציג מפות פלואורסצנטיות של החא"מ בנוכחות נחושת בריכוז המרבי שנבדק (3.5 pCu). ניתן לראות כי הנחושת גורמת לירידה בעוצמת הפיקים, אך אינה משנה את מיקומם במפה. הירידה בעוצמת הפיקים הפלואורסצנטים בנוכחות נחושת נובעת מהיווצרות קומפלקס נחושת-חא"מ שאינו פלואורסצנטי (הרחבה בנושא זה מצויה בסעיף 4.7.2).

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

איור 4.4 ב' מציג מפות פלואורסצנטיות של דוגמאות החא"מ השונות במקטע גודל זה. בכל דוגמאות החא"מ מופיעים שני הפיקים המרכזיים (A ו-B) שנמצאו גם במקטע הגדול מ-1 kDa, ובדוגמאות חא"מ ממי הקולחים מופיעים גם במקרה זה שני פיקים נוספים: פיק C ו"כתף" נוספת עם עירור באזור 220 nm ופליטה באזור 310 nm. איור 4.5 ב' מציג את מיקום הפיקים הפלואורסצנטים A, B ו-C, וטבלה 4.11 מציינת את מיקומם בדוגמאות החא"מ השונות.

טבלה 4.11: מיקום הפיקים הפלואורסצנטים בדוגמאות חא"מ במקטע הגודל $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$

Excitation/emission nm	סימון הפיק	שם הדוגמה	excitation/emission nm	סימון הפיק	שם הדוגמה	excitation/emission nm	סימון הפיק	שם הדוגמה
259/444	A	EL-1	255/441	A	TL-2	248/447	A	EW-2
328/440	B		324/440	B		329/431	B	
						275/309	C	
259/442	A	EL-3	261/443	A	TL-4	250/447	A	EW-4
326/437	B		329/439	B		334/431	B	
259/444						277/311	C	

בחא"מ ממי הקולחים, פיק A נגרם ע"י עירור באורכי גל קצרים יותר מאשר בחא"מ משני סוגי מי-הנקז, ופיק B פלט באורכי גל קצרים יותר מאשר בחא"מ משני סוגי מי-הנקז. הסטייה לאורכי גל קצרים יותר של עירור, מצביעה כנראה על שוני בהרכב הכימי של החומרים הפלואורסצנטים (Coble, 1996), בעוד שהסטייה לאורכי גל קצרים יותר בפליטה, מצביעה כנראה על כך שבמי הקולחים, החא"מ מכיל פחות טבעות ארומטיות מצומדות ו/או קבוצות פונקציונליות כגון קרבווקסיל, פנול וניטרו הקשורות למבנים הארומטיים. במקטע גודל זה, לא נמצאו הבדלים משמעותיים במיקום פיקים A ו-B בין שני סוגי מי-הנקז.

תוספת נחושת לדוגמאות החא"מ (pCu=3.5) הקטינה את עוצמת הפיקים הפלואורסצנטים, אך לא שינתה את מיקומם (איור 4.6 ב').

בהשוואה בין שני מקטעי הגודל, אורכי הגל לעירור של פיקים A ו-B היו קצרים יותר במקטע הגודל

Coble,) 1 kDa <math><200\text{ Da}</math>. הדבר מצביע על השוני בהרכב הקבוצות הפלואורסצנטיות בין שני מקטעי הגודל (Hall (1996). חוקרים נוספים מצאו שהירידה לאורכי גל קצרים יותר בעירור, הייתה קשורה לירידה בגודל המוליקולרי (and Lee, 1974; Ewald et al., 1988).

המפות הפלואורסצנטיות, הדגישו את ההבדלים בין ח"מ ממי קולחים לבין ח"מ משני סוגי מי-הנקז. פיקים פלואורסצנטים בח"מ ממי הקולחים (המייצגים חומצות אמינו טריפטופאן וטירוזין ומאפיניים חומרים דמויי חלבונים שמקורם בפירוק מיקרוביאלי, ו"חלבונים" ארומטים בהתאמה), שלא זהו בח"מ מנקז קולחים (וכמובן שלא זהו בח"מ מנקז שפירים), מצביעים על השתנות הח"מ שמקורו במי הקולחים, ועל כך שהח"מ ממי הקולחים מושפע מתהליכים מיקרוביאליים ואחרים (כגון תהליכים אינזימטיים וכימיים) המתרחשים בקרקע. השהות של מי הקולחים בקרקע, מאפשרת את פירוקם של חומרים אלה, כך שבנקז מי הקולחים שנאסף לאחר תקופה זו לא ניתן לזהותם. ח"מ מנקז קולחים הראה תכונות פלואורסצנטיות דומות לח"מ מנקז שפירים (למעט הבדלים במיקום הפיקים בח"מ ממקטע הגדול מ- 1 kDa).

4.7 אפיון האינטראקציות בין ח"מ לנחושת:

4.7.1 איזותרמות קשירה בין ח"מ ונחושת:

מהלך הטיטרציה מתואר בסעיף 3.3.8 בפרק חומרים ושיטות. דוגמאות ח"מ בריכוז 20 מ"ג פא"מ לליטר , pH 4.6-4.8, ו- 1 mS/cm EC , ממי קולחים ומשני סוגי מי-הנקז (במקטע הגדול מ- 1 kDa לפני ואחרי הומויוניזציה, ומקטע הגודל $<1\text{ kDa}<math><200\text{ Da}</math>), טוטרו בעזרת תמיסת נחושת בריכוזים עולים (3-9 $\text{pCu}_{\text{total}}$). כיוול האלקטרודה החל מ- $7\text{ pCu}_{\text{total}}$. בשלבי המחקר הראשונים, כיוול האלקטרודה נעשה גם בריכוזי נחושת נמוכים יותר (6.33-12.2 pCu^{2+}) עפ"י השיטה של Sauv e וחובריו (1995). כיוול האלקטרודה בתחום הנמוך בוצע ע"י שימוש בתמיסה המכילה קומפלקסנט (Iminodiacetic acid-IDA), הנמצא בקומפלקס עם יוני הנחושת, וטיטור התמיסה עם חומצה חנקתית. אקטיביות הנחושת בתמיסה נקבעת ע"י ה-pH של התמיסה וקבועי הדיסוציאציה של הקומפלקס עם הנחושת, וחישוב האקטיביות מבוצע תוך שימוש בתוכנה הגאוכימית MINQEL+. ה-pH ההתחלתי של תמיסת הקומפלקס הוא כ-10 וטיטור התמיסה עם חומצה גורמת לירידת ה-pH. עקום הכיוול המתקבל בשיטה זו אמנם ליניארי, אך אנו מצאנו כי ריכוז הפרוטונים הגבוה ב-pH שבו בוצעה הטיטרציה (4.6-4.8) גורם להפרעה$

בקריאות האלקטרודה, ולכן שימוש בתוצאות הכיול בתחום הנמוך אינו נכון. הבדיקות שביצענו כללו שימוש במים בדרגות ניקיון שונות (מים מזוקקים פעמיים ומים בדרגת ניקיון גבוהה המשמשים ל-HPLC) שהובאו למוליכות חשמלית דומה לזו שבה בוצעה הטיטרציה (1 mS/cm). שינוי ב-pH של התמיסה גרם לשינוי משמעותי בקריאת האלקטרודה, כאשר העלאת ה-pH גרמה לירידה בפוטנציאל והורדת ה-pH גרמה לעלייה בפוטנציאל. כמו כן ביצענו טיטרציה של תמיסת חא"מ בדומה למתואר בפרק חומרים ושיטות, אך ב-7 pH. פוטנציאל האלקטרודה לפני הוספת הנחושת היה נמוך בכ-60 mV מזה של אותה תמיסת חא"מ ב-4.6-4.8 pH. מכך הסקנו כי בריכוז פרוטונים הגבוה ביותר משני סדרי גודל מריכוז יוני הנחושת ישנה תחרות חזקה בין יוני הנחושת לפרוטונים, ולכן השפעה משמעותית על קריאות האלקטרודה.

איזותרמת הקשירה בין החא"מ לנחושת, מתוארת ככמות הנחושת הקשורה ליחידת משקל של פא"מ (mol/kg DOC), כתלות בריכוז הנחושת החופשית (mol/L). איזותרמות הקשירה מוצגות באיור 4.7 כאשר כל עקום מתאר את הממוצע של שתי טיטרציות ואת סטיית התקן. באיור 4.8 מוצג מקדם החלוקה, K_d , שהוא היחס במצב שיווי משקל המתקבל לאחר קשירת הנחושת ע"י החא"מ, בין ריכוז הנחושת הקשורה לחא"מ לבין ריכוז הנחושת החופשית בתמיסה (K_d מתקבל ביחידות של ליטר לק"ג פא"מ). מבחינה תרמודינאמית, K_d מתאר את העודף באנרגיה החופשית של גיבס (ΔG), המתקבל בעת המעבר של הנחושת ממצב חופשי בתמיסה, למצב קשור ע"י החא"מ. הגרפים באיור 4.8 מציגים את הממוצע של שתי סדרות ואת סטיית התקן.

איור 4.7 א' מציג את איזותרמות הקשירה של חא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa. הסטיות בין דוגמאות החא"מ באותו סוג מים היו אמנם גבוהות, אך עדיין ניתן לקבוע שהחא"מ במקטע זה במי הקולחים היה בעל קיבולת פחותה לנחושת בהשוואה לשני סוגי מי-הנקז. מקדמי החלוקה (איור 4.8 א') עבור מי הקולחים היו נמוכים מ- 10^6 ליטר/ק"ג פא"מ, בעוד שמקטע חא"מ זה במי-הנקז, היה בעל תחום מקדמי חלוקה גבוה יותר (10^6 - 10^7 ליטר/ק"ג פא"מ). ההבדלים בין שני סוגי מי-הנקז היו קטנים אך ניתן להבחין שחא"מ מנקז שפירים קשר יותר נחושת מאשר חא"מ מנקז קולחים.

גם לאחר הומוניזציה (איור 4.7 ב'), מקטע החא"מ ההומו-יוני הגדול מ-1 kDa במי הקולחים קשר פחות נחושת מאשר חא"מ בשני סוגי מי-הנקז. במקרה זה, ההבדלים בין שני סוגי מי-הנקז לא היו בולטים.

איזותרמות הקשירה עבור החא"מ לאחר הומוניזציה, מראות ירידה לא אופיינית בקשירה בריכוזי נחושת גבוהים מ- pCu 4.5.

הסיבה לירידה בריכוז הנחושת הקשורה בריכוזים גבוהים של נחושת חופשית אינה ברורה. הסברים אפשריים לתופעה יכולים לנבוע מסיבות הבאות:

1. שגיאה בקריאות האלקטרודה. בריכוזים אלה, הבדלים קטנים יחסית בין ריכוז הנחושת הכללי (הריכוז הידוע המוסף בזמן הטיטרציה), לבין ריכוז הנחושת החופשית (הנמדד באמצעות האלקטרודה), עשויים לגרום לשגיאות גדולות בריכוז הנחושת הקשורה (עדות עקיפה לכך הם הערכים הגבוהים של סטיות התקן).

2. ייתכן שמכיוון שבריכוזי נחושת גבוהים קבוצות קושרות בחא"מ רוויות כמעט בנחושת, חלק מהנחושת קשורה בעוצמה רפה, והיא נקראת באופן חלקי ע"י האלקטרודה.

3. החא"מ לאחר ההומוניזציה בנתרן הוא בעל מבנה פתוח. ייתכן שתוספת נחושת לחא"מ הפתוח, גורמת בשלב מסוים (ב- pCu 4.5) לסגירת החא"מ ולתהליך הדומה למעבר פאזה. בעת סגירת החא"מ חלק מיוני הנחושת עלולים להשתחרר לתמיסה והנחושת שנותרת קשורה עשויה ליצור קשרים בידנטטים עם החא"מ, כך שריכוז הנחושת הקשורה לחא"מ יורד בעוד ריכוז הנחושת החופשית בתמיסה עולה.

סגירה דומה קיימת בחרסיות ובביופולימרים כגון חלבונים. בחרסיות המצויות בתמיסה מימית ישנה נקודת פלוקולציה שבה לוחות החרסית נצמדים האחד לשני וגורמים לשינוי במבנה המרחבי. פלוקולציה בחרסיות מושפעת מ-pH, ריכוז אלקטרוליט (חוזק יוני) והרכב הקטיונים הנוכחים (Keren and Sparks, 1995).

קיפול של חלבונים גורם לשינוי במבנה המרחבי שלהם (protein folding), ומושפע מהמס שבו הם נמצאים, מריכוז המלחים ומהטמפרטורה (Dill et al., 1995). קיפול החלבונים נוצר עקב קשרי מימן ואינטראקציות הידרופוביות בין קבוצות בחומצות האמיניות.

בכל מקרה, הבנת התופעה המתקבלת באיזותרמות הקשירה של חא"מ לאחר הומוניזציה בנתרן ונחושת, דורשת ניסויים נוספים ומחקר מעמיק יותר בנושא.

ההומוניזציה גרמה להקטנה של קשירת נחושת ע"י מקטע החא"מ (איור 4.9). ייתכן שסיבה לכך היא איבוד מרכיבים בעלי יכולת גבוהה יחסית לקשירת נחושת בתהליך ההומוניזציה. כ-29%–3 מהפא"מ אבדו בהומוניזציה (טבלה 4.7). הסבר

אפשרי אחר הוא שהייתה התפרדות של מרכיבי החא"מ ליחידות שקשירתן קטנה יותר, כגון הריסה של ליגנדים פולידינטיים והופעת ליגנדים מונודינטיים במקומם.

איזותרמות הקשירה של נחושת עבור חא"מ במקטע הגודל $1\text{kDa} < \text{חא"מ} < 200\text{ Da}$ היו דומות בכל מקורות החא"מ (איור 4.7 ג'). בהשוואה בין דוגמאות חא"מ במקטע גודל זה, לבין דוגמאות חא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa , לא נמצאה מגמה אחידה (איור 4.9).

ההנחה שעליה מבוססות מסקנותינו היא שהנחושת נקשרת אך ורק לחא"מ ולא למרכיבים אחרים כגון אוקסידים של ברזל, אלומיניום או מנגן הידועים ביכולת הקשירה החזקה שלהם למתכות (Lee et al., 2002). נחושת (Cu^{2+}) יוצרת קומפלקסים חזקים עם חא"מ ממקורות שונים (Schnitzer, 1978; Evans, 1989; Stevenson, 1994; Kunz and Christl and Pandey et al., 2000; Jardim, 2000), ועשויה אף להיקשר לחומר אורגני הספוח על האוקסיד. Kretzschmar (2001) מצאו כי ספיחת נחושת להמאטיט (אוקסיד של ברזל) ב-pH נמוך מ-6 ובנוכחות חומצות פולביות עלתה עד 40%, בהשוואה לספיחת הנחושת להמאטיט טהור, עקב היספחות החומצות הפולביות על ההמאטיט והיקשרות הנחושת לחומצות הפולביות. לעומת זאת, ב-pH גבוה מ-6, נוכחות החומצות הפולביות הורידה את ספיחת הנחושת להמאטיט כתוצאה מהיווצרות קומפלקסים בין הנחושת לחומצות הפולביות. ספיחת הנחושת להמאטיט הטהור הייתה נמוכה מ-10% מכלל הנחושת שהייתה מצויה בתמיסה ב-pH נמוך מ-5, והספיחה המרבית הייתה ב-pH ≤ 6 . Karthikeyan and Elliott (1999) הראו גם הם שפחות מ-10% מהנחושת שהייתה בתמיסה נספחה לאוקסידים של ברזל ב-pH 5, וספיחת הנחושת על אוקסידים של אלומיניום באותו pH הייתה אפסית. להערכתנו, ב-pH שבו בוצעה הטיטרציה (4.6-4.8) ובריכוזים הנמוכים של ברזל, אלומיניום ומנגן שהיו בתמיסת החא"מ המטוטרת (ברזל $> 0.2\text{ מ"ג לליטר}$; אלומיניום $> 0.04\text{ מ"ג לליטר}$; מנגן $> 0.01\text{ מ"ג לליטר}$) ניתן להניח שהמרכיב העיקרי שקשר את הנחושת הוא החא"מ. כמו כן, במקטע $1\text{kDa} < \text{חא"מ} < 200\text{ Da}$ הסבירות למצוא אוקסידים של ברזל, אלומיניום או מנגן היא נמוכה ביותר.

חא"מ מכיל קבוצות פונקציונליות כגון קרבוקסיל ($-\text{COOH}$), פנול ($-\text{OH}$), אמין ($-\text{NH}_2$) וטיאול ($-\text{SH}$) היכולות לקשור נחושת ומתכות אחרות (Smith et al., 2002; Stevenson, 1994). קבוצות הקרבוקסיל והפנול הן החשובות ביותר בקשירת מתכות עקב ריכוזן הגבוה יחסית לקבוצות האחרות

;Qin et al., 2004 ;Ma et al., 2001 ;Kinniburgh et al., 1999 ;de Wit et al., 1993a ;Perdue et al., 1984)
Plaza et al., 2006). קבוצות פנוליות וקרבווקסיליות הקשורות לטבעות ארומטיות, גורמות לנטייה גבוהה של החא"מ
ליצור קומפלקסים יציבים עם קטיונים פוליוולנטים ובכללם נחושת (Schnitzer and Khan, 1978). ההסבר לתופעה
קשור לטבעת הארומטית הגורמת לאל-איתור של המטען השלילי המצוי על החמצן וכך מאפשרת לאניון להיות יציב יותר.
לדוגמא: פנול (Ar-OH) יותר חומצי ממתנול (CH₃OH) בכ-6 סדרי גודל (קבוע החומציות (pK_a) של פנול הוא 10 ושל
מתנול הוא 15.5), וחומצה בנזואית יותר חומצית מחומצה אצטית (קבוע החומציות (pK_a) של חומצה בנזואית הוא 4.17
ושל חומצה אצטית הוא 4.74).

אנליזת ה-¹H-NMR של החא"מ הגדול מ-1 kDa הראתה שחא"מ במי קולחים, בהשוואה לחא"מ ממי-הנקז, הוא יותר
אליפטי ומכיל יותר מימנים ליד קבוצות מושכות אלקטרונים (כגון קבוצות קרבווקסיליות) ויותר מימנים ליד פחמן הקשור
לחמצן (כגון כוהל). מימנים כהליים (OH) או קרבווקסילים (COOH) אינם ניתנים לזיהוי בספקטרה ה-¹H-NMR, מכיוון
שאלו מימנים חומציים ולכן עוברים חילוף עם מימנים של המים. חא"מ ממי קולחים במקטע הגדול מ-1 kDa (לפני ואחרי
הומיוניזציה) הראה קשירה נמוכה יותר לנחושת מאשר חא"מ ממי-הנקז. הסבר אפשרי לתופעה הוא ההרכב האורגני של
החא"מ. במי קולחים ישנן קבוצות פנוליות וקרבווקסיליות הקשורות לשרשרות אליפטיות הגורמות לירידה בחומציות של
קבוצות אלה ולכן לנטייה נמוכה יותר לקשירת נחושת. לעומת זאת, אותן קבוצות בחא"מ ממי-הנקז קשורות לטבעות
ארומטיות המגדילות באופן משמעותי את החומציות של החא"מ ולכן גורמות לנטייה גבוהה יותר לקשירת נחושת.
טיטרציה של חא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa הראתה נטייה של מי-נקז מהשקיה במים שפירים לקשירה גבוהה יותר של
נחושת מאשר מי-נקז מהשקיה במי קולחים. מהמפות הפלואורסצנטית של חא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa ראינו כי אורך גל
הפליטה של פיקים A ו-B (המציינים חומרים הומיים, דמויי חומצות פולביות/הומיות) היה גבוה יותר במי-נקז מהשקיה
המים שפירים, מאשר במי-נקז מהשקיה במי קולחים. מכאן ניתן להניח כי חא"מ ממי-הנקז מהשקיה במים שפירים עשוי
להכיל יותר קבוצות פונקציונליות (כגון קרבווקסיליות ופנוליות בעלות אפיניות גבוהה לנחושת) שככל הנראה קשורות
למבנים ארומטים מצומדים, ולכן יכולות לקשור יותר לנחושת. מכיוון שהטיטרציות בוצעו ב-pH 4.6-4.8, ישנה סבירות
גבוהה יותר לקשירת נחושת ע"י קבוצות קרבווקסיליות ולא פנוליות, שכן מרבית הקבוצות הפנוליות ב-pH זה הן ניטרליות

ולא אניוניות ולכן האפיניות שלהן לנחושת יורדת (Temminhoff et al., ;Cabaniss, 1992 ;Buffle et al., 1977). (1997).

Ma וחובריו (2001) בדקו את הקומפלקסציה של נחושת עם חא"מ מנהרות שונים שהופרד לחומצות הומיות, חומצות פולביות ומקטע הידרופילי. החוקרים מצאו כי מספר האתרים הקושרים נחושת בכל מקטעי החא"מ היה דומה, אך האפיניות לנחושת הייתה נמוכה יותר במקטע ההידרופילי מאשר בשני המקטעים האחרים. הם טענו כי מכיוון שהמקטע ההידרופילי מכיל מרכיבי חא"מ בעלי גודל מוליקולרי גבוה יותר, האפיניות שלהם לנחושת היא נמוכה יותר. Businelli וחובריו (1999) השוו בין חא"מ שהופק מפסולת של חוות חזירים לבין חומצות הומיות וחומצות פולביות שהופקו מקרקע חרסיתית. תוך שימוש בכרומטוגרפיית ג'ל נמצא כי חא"מ מפסולת חוות החזירים הכיל בעיקר מרכיבים גדולים מ-5000 Da, ונחושת הייתה קשורה רובה ככולה לחא"מ במקטע זה. קיבול הקומפלקסציה של החומצות ההומיות היה דומה לזה של חא"מ מפסולת חוות החזירים, בעוד שקיבול הקומפלקסציה של החומצות הפולביות היה גבוה יותר. החוקרים ייחסו ממצא זה לקבוצות קרבוקסיליות המצויות בריכוז גבוה יותר במקטע החומצות הפולביות, ואחראיות לקשירת הנחושת. Linnik (2003) לעומת זאת, בדק קשירה של נחושת לחא"מ שהופק מנהר הדינפר שבאוקראינה, ומצא שכ-80% מהנחושת הייתה קשורה בקומפלקסים אורגניים לחא"מ ו-45-55% מהנחושת הקשורה הייתה עם חא"מ בגודל קטן מ-5000 Da. Linnik (2003) טען כי חומצות פולביות היו האחראיות העיקריות בקשירת הנחושת.

השקיה גירעונית במי קולחים באיכות גבוהה (עם תכולת חומר אורגני נמוכה), לא שינתה במידה משמעותית את מאפייני הקשירה של החא"מ בקרקע לנחושת מוספת. אם הייתה השפעה, אזי אולי היא אפילו בכיוון של הקטנת הקשירה הספציפית של החא"מ בקרקע לנחושת מוספת. ראינו כי מקטע החא"מ הגדול מ-1 kDa, שהופק מנקז של הליזימטרים שהושקו במים שפירים, קשר יותר נחושת מאשר אותו מקטע שהופק ממי-נקז בהשקיה במי קולחים (בדיקה ללא הומיוניזציה). להערכתנו, בתנאי השקיה גירעונית ושהות ממושכת יחסית של החא"מ בקרקע, הביודגראדציה והטרנספורמציות המיקרוביאליות בקרקע גורמות לטשטוש אופיו המקורי של החא"מ (מי הקולחים ושורשי הצמחים), ואולי גם של יתר החומר האורגני בקרקע, ולקבלת חומר אורגני מומס קרקעי.

4.7.2 אפיון משולב של אופי קשירת החא"מ לנחושת:

האפיון המשולב כלל שימוש במדידת הקשירה של נחושת באמצעות האלקטרודה הספציפית ובמדידות של ספקטרום הפליטה הפלואורסצנטי. דוגמאות החא"מ היו בריכוז 20 מ"ג פא"מ לליטר, pH 4.6-4.8, ומוליכות חשמלית של ≈ 1 mS/cm.

עוצמת הפלואורסצנטיה נמדדה עבור דוגמאות החא"מ ללא תוספת נחושת ועם ריכוזים עולים של נחושת (-5.5 pCu 3.5), וכמו כן בוצע תיקון IFE לעוצמת הפלואורסצנטיה (פרק חומרים ושיטות, סעיף 3.3.9). אורכי הגל לעירור ולפליטה, שנמצאו עבור דוגמאות חא"מ ללא נחושת, מוצגים בטבלה 4.12. מיקום הפיקים הפלואורסצנטיים באירועי עירור-פליטה מוצג באיור 4.10 עבור חא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa ובמקטע הגדול $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$, ובשני אורכי גל לעירור.

טבלה 4.12: אורכי גל לעירור ופליטה עבור חא"מ ללא נחושת

λ emission nm	λ_2 excitation nm	λ_1 excitation nm	סימול הדוגמה*	מקטע גודל	
450	340	277	EW1	חא"מ $< 1 \text{ kDa}$	
439	341	274	EW2		
449	338	274	EW4		
450	342	260	TL1		
449	331	261	TL2		
450	334	260	TL3		
442	336	267	TL4		
445	337	266	EL1		
440	336	283	EL2		
450	337	271	EL3		
450	338	278	EL4		
440	331	246	EW2		$200 \text{ Da} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$
447	342	250	EW4		
450	325	250	TL2		
440	329	258	TL4		
440	331	254	EL1		
439	331	251	EL3		

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

ההבדלים במיקום הפיקים בין דוגמאות החא"מ השונות לא היו גדולים, אך ניתן לראות שחא"מ במקטע הגדול $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$ עבר עירור באורכי גל קצרים יותר מהחא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa (כפי שנמצא גם במפות הפלואורסצנטיות).

עוצמת הפלואורסצנטיה של חא"מ ללא תוספת נחושת מנורמלת לריכוז הפא"מ מוצגת באיור 4.11.

במקטע הגדול מ- 1 kDa (איור 4.11 א') הסתמנה מגמה של ירידה בעוצמת הפלואורסצנטיה עפ"י הסדר הבא: נקז קולחים < מי קולחים < נקז שפירים (למעט דוגמה אחת TL2 באורך הגל λ_2). המפות הפלואורסצנטיות הראו מגמה דומה בעוצמת הפיקים A ו-B (אף על פי שבמפות לא נעשה תיקון IFE, ולכן לא היה ניתן להשוות את עוצמת הפיקים). עוצמת הפיקים נמצאת ביחס ישר לריכוז החומרים הפלואורסצנטים, ולכן ניתן לומר שבחא"מ מנקז שפירים הריכוז של חומרים אלה הוא הנמוך ביותר. למרות שעפ"י המפות הפלואורסצנטיות אורך גל הפליטה של פיקים A ו-B היה הארוך ביותר בנקז שפירים, והמסקנה מכך הייתה כי החא"מ מנקז שפירים מכיל את הריכוז הגבוה ביותר של טבעות ארומטיות מצומדות ו/או קבוצות הפונקציונליות (כגון קרבוקסיל, פנול וניטרו) הקשורות למבנים ארומטיים, ייתכן שריכוז החומרים הארומטיים (והפלואורסצנטים) הפשוטים יותר הוא הנמוך ביותר בחא"מ מנקז שפירים.

תוספת מי קולחים לקרקע עשויה להגביר את הפעילות המיקרוביאלית בקרקע ואת פירוק החא"מ.

בהנחה שהפלואורסצנטיה נובעת בעיקר מנוכחותם של חומרים ארומטיים (העמידים בפני פירוק מיקרוביאלי), הריכוז של חומרים אלו בחא"מ מנקז קולחים צפוי להיות הגבוה ביותר מכיוון שבנקז קולחים ישנה תרומה של תוצרי פירוק אלו הן ממי הקולחים והן מהקרקע ומשורשי העצים.

הסבר אפשרי נוסף למגמת הירידה בעוצמת הפלואורסצנטיה עשוי להיות קשור לריכוז שונה של קבוצות פונקציונליות המשפיעות על הפלואורסצנטיה. קבוצות מושכות אלקטרונים (קבוצות קרבוקסיליות) מורידות את ההסתברות למעבר אלקטרון בין המצב המעורר הראשון למצב היסוד ולכן מורידות את עוצמת הפלואורסצנטיה, בעוד שקבוצות תורמות אלקטרוניים (קבוצות הידרוקסיליות ומתוקסיליות) מעלות את ההסתברות למעבר אלקטרון בין המצב המעורר הראשון למצב היסוד ולכן מעלות את עוצמת הפלואורסצנטיה (Senesi, 1990; Senesi et al., 1991; Chen, J. et al 2003).

ייתכן שריכוז גבוה יותר של קבוצות קרבוקסיליות בנקז שפירים בהשוואה לנקז קולחים ולמי הקולחים עצמם, גורם לעוצמת פלואורסצנטיה נמוכה יותר.

במקטע הגודל $1 \text{ kDa} < \text{מ"א} < 200 \text{ Da}$ לא נמצאו הבדלים בולטים בעוצמת הפלואורסצנטיה של החא"מ מהמקורות השונים (איור 4.11 ב').

תוספת נחושת לחא"מ, גרמה לירידה בעוצמת הפלואורסצנטיה, שמוחסת להיווצרות קומפלקס חא"מ-נחושת, שאינו פלואורסצנטי (איור 4.12) אך כמעט שלא השפיעה על מיקום הפיקים הפלואורסצנטיים. דיכוי בעוצמת הפלואורסצנטיה של חא"מ ממקורות טבעיים בנוכחות יוני נחושת ידוע מהספרות (Akagi and Zsolnay, 2005; Dudal et al., 2005). במחקרים רבים, 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, (כגון היווצרות קומפלקס 1:1 בין החא"מ למתכת), מהוות מקור לשגיאות רבות, ולכן הציעו להוסיף למדידות הפלואורסצנטיות את השימוש באלקטרודת נחושת. Cao וחבריו (2004) בחנו את הקומפלקסציה של חא"מ וחומצות הומיות ופולביות מקרקעות לנחושת. התוצאות שהתקבלו בשיטת הדיכוי הפלואורסצנטי, ואלה שהתקבלו תוך שימוש באלקטרודת נחושת לא היו דומות והחוקרים טענו כי שימוש בשיטת הדיכוי הפלואורסצנטי המתייחסת להיווצרות קשר יחיד בין אתר קושר לנחושת (קומפלקס 1:1) פחות טובה לאפיון הקומפלקסציה, היות ונחושת יכולה להיקשר ליותר מאתר אחד וליצור מבנה טבעתי יציב יותר (קומפלקס קלאטי). עוד גרסו החוקרים כי שימוש באלקטרודת הנחושת בריכוזי נחושת גבוהים מ- 10^{-7} M היא השיטה המדויקת ביותר (הניסוי נערך ב-pH 4-6).

גם במחקר הנוכחי לא נעשה שימוש במודלים, ועיבוד הנתונים עבור הדיכוי הפלואורסצנטי נעשה בשילוב עם הנתונים המתקבלים מטיטרציה של חא"מ עם נחושת. הצגה של עוצמת הפלואורסצנטיה בנוכחות נחושת בריכוזים שונים (F) המחולקת לעוצמת הפלואורסצנטיה לפני הוספת נחושת (F_0) נתנה את עוצמת הפלואורסצנטיה היחסית (F/F_0). גרפים המתארים את עוצמת הפלואורסצנטיה היחסית כתלות בריכוז הנחושת הקשורה שחושבה באמצעות השימוש באלקטרודת הנחושת מוצגים באיור 4.13. כל אחד מהעקומים באיור 4.13 מתאר השפעה של קשירת נחושת לחא"מ על עוצמת הפלואורסצנטיה של החא"מ, ומייצג ממוצע של שתי חזרות ואת סטיית התקן. ניתן לראות כי עוצמת הפלואורסצנטיה של החא"מ ממי קולחים (בשני מקטעי הגודל- איור 4.13 א' ו-ב') הושפעה במידה מועטה מקשירת הנחושת וכי הירידה בעוצמת

הפלואורסצנטיה כתלות בריכוז נחושת קשורה הייתה מתונה. בניגוד לכך, עוצמת הפלואורסצנטיה של החא"מ משני סוגי מי-הנקז פחתה במידה ניכרת עקב קשירת נחושת, שהתבטאה בירידה חדה בעוצמת הפלואורסצנטיה כתלות בריכוז הנחושת הקשורה. ניתן להניח שהחא"מ של מי הקולחים קושר את הנחושת באתרים שהינם פחות פלואורסצנטיים, או באתרים הרחוקים מסביבה פלואורסצנטית. לעומת זאת, החא"מ של מי-הנקז מאופיין באתרי קשירה לנחושת שהינם פלואורסצנטיים במידה רבה. למרות שבשני סוגי מי-הנקז החא"מ הגיב בירידה חדה ודומה בעוצמת הפלואורסצנטיה בתגובה לקשירת נחושת, ניתן היה להבחין שבמקטע החא"מ הגדול מ-1 kDa מי-הנקז מהשקיה במים שפירים הראו ירידה חדה יותר בעוצמת הפלואורסצנטיה היחסית, מזו של מי-הנקז מהשקיה במי קולחים. המפות הפלואורסצנטיות של חא"מ מנקז שפירים הראו כי אורך גל הפליטה של פיקים A ו-B היו ארוכים יותר מאלה של חא"מ ממי קולחים ומנקז קולחים, וההסבר לכך היה שחא"מ מנקז שפירים מכיל ריכוז גבוה יותר של טבעות ארומטיות מצומדות, ו/או קבוצות פונקציונליות (כגון קרבוקסיל, פנול וניטרו) הקשורות למבנים ארומטיים. בהנחה שהטבעות הארומטיות המצומדות קשורות לאתרים קושרי נחושת (קרבוקסיל או פנול), או מצויות בקרבה מרחבית לאתרים כאלו, ניתן להסביר את הירידה החדה יותר בעוצמת הפלואורסצנטיה במי-הנקז מהשקיה במים שפירים לעומת מי-הנקז מהשקיה במי קולחים. הנחושת שנקשרת באתרים אלו גורמת לירידה משמעותית בעוצמת הפלואורסצנטיה.

חא"מ מנקז שפירים במקטע הגדול מ-1 kDa הראה קשירה גבוהה יותר לנחושת בהשוואה לחא"מ מנקז קולחים או ממי הקולחים עצמם. כמו כן, כאמור, עוצמת הפלואורסצנטיה הנמוכה של חא"מ מנקז שפירים (ללא נחושת) עשויה להצביע על ריכוז גבוה של קבוצות קרבוקסיליות מושכות אלקטרוניים. מהנ"ל ניתן להסיק כי חא"מ מנקז שפירים קושר יותר נחושת, בהשוואה לחא"מ מנקז קולחים (וממי הקולחים עצמם), מכיוון שהוא מכיל יותר קבוצות קרבוקסיליות שהן הקבוצות העיקריות המשתתפות בקשירת נחושת. הקשירה לנחושת ע"י אתרים אלה וקרבתם למרכזים פלואורסצנטיים, מלווה בירידה חדה בעוצמת הפלואורסצנטיה.

הירידה בעוצמת הפלואורסצנטיה היחסית בתגובה לקשירת נחושת של החא"מ ממי קולחים וממי-הנקז לא הייתה ליניארית. דגם כזה יכול להעיד על הימצאותם של אתרי קשירה שונים לנחושת בחא"מ, או השפעה שונה של אתרים שקשרו נחושת על אתרים פנויים לקשירה. לכן, השימוש במודלים פשוטים של קשירה המניחים תרומה שווה של אתרי קשירה עצמאיים, אינו אפשרי.

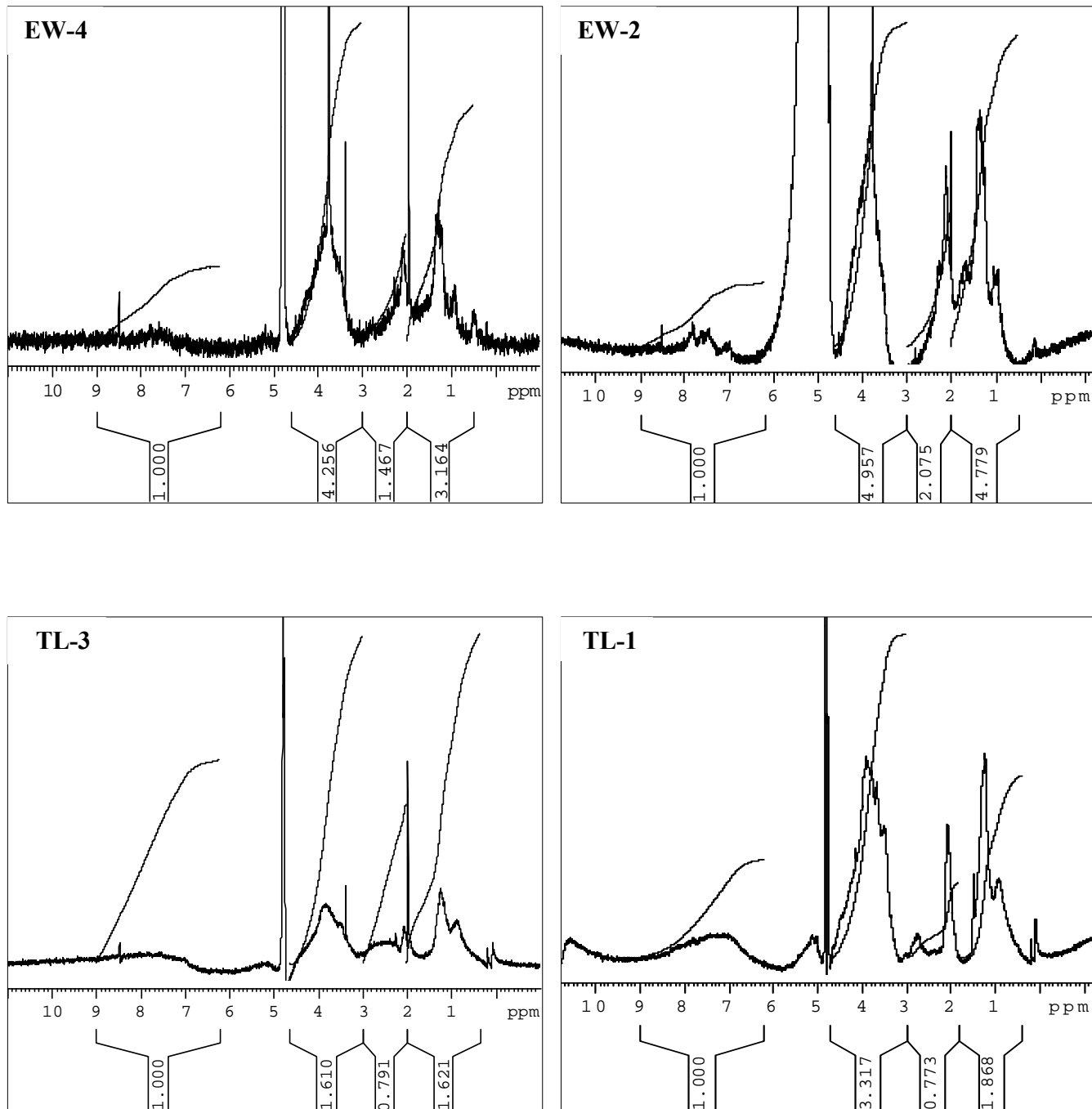
לא מצאנו עבודות המשוות בין דיכוי פלואורסצנטי של חא"מ ממי קולחים לעומת חא"מ מקרקע, אך Reynolds and Ahmad (1995) מצאו 40% דיכוי בעוצמת הפלואורסצנטיה עבור חא"מ ממי שפכים, בנוכחות 0.2 מ"ג/ליטר של Cu^{2+} או Ni^{2+} . לעומת זאת, חא"מ משפכים מטופלים לא הראה דיכוי משמעותי בעוצמת הפלואורסצנטיה בנוכחות מתכות אלו. התוצאות שהתקבלו תומכות בכך שקבוצות החא"מ שקושרות נחושת במי הקולחים הנן יותר אליפטיות ופחות ארומטיות בהשוואה לקבוצות החא"מ שקושרות נחושת בשני סוגי מי-הנקז. קבוצות ארומטיות בחא"מ הינן ככל הנראה בעלות תכונות פלואורסצנטיות, ומאחר שהפלואורסצנטיה של חא"מ משני סוגי מי-הנקז הושפעה יותר מקשירת נחושת, ניתן גם להניח כי לקבוצות ארומטיות יש תפקיד משמעותי בקשירת נחושת לחא"מ במי-הנקז. כאמור, קבוצות קרבוקסיליות וכהליות הקשורות לטבעת ארומטית הן בעלות אפיניות גבוהה יותר לנחושת ולמתכות אחרות, בהשוואה לאותן קבוצות הקשורות לשייר אורגני אליפטי (Schnitzer and Khan, 1978). לעומת זאת, חא"מ במי הקולחים בעל אופי יותר אליפטי וקושר נחושת בעיקר באתרים שאינם פלואורסצנטיים, ולכן ההשפעה של קשירת נחושת על עוצמת הפלואורסצנטיה היחסית קטנה. הירידה בעוצמת הפלואורסצנטיה של החא"מ כתלות בריכוז הנחושת המוספת נותנת תמיכה נוספת להנחה כי חא"מ הוא זה שקושר נחושת ולא חומרים אחרים כגון אוקסידים של ברזל, אלומיניום או מנגן. הפיקים הפלואורסצנטיים אפיינו אך ורק את החא"מ. קביעה זאת אומתה ע"י הכנת תמיסות חא"מ מהולות בריכוז 10 מ"ג לליטר פא"מ, ואפיון הפלואורסצנטי. אורכי הגל של עירור ופליטה לא השתנו בתמיסות המהולות לעומת התמיסות בריכוז 20 מ"ג לליטר פא"מ.

4.8 איורים:

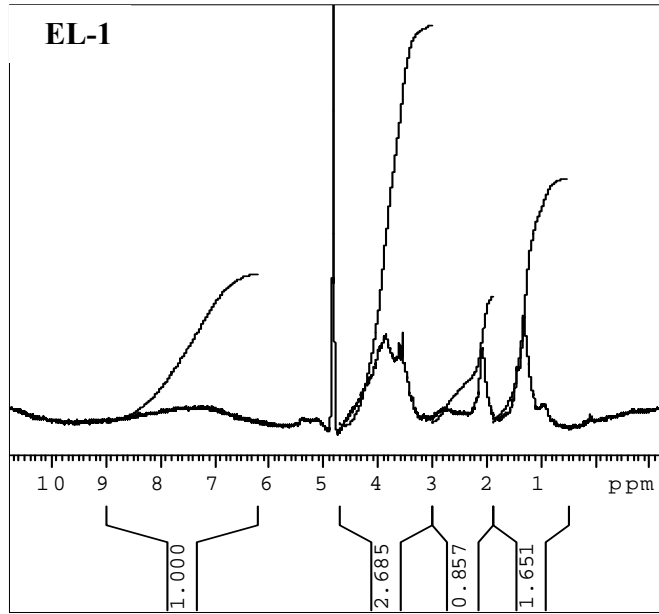
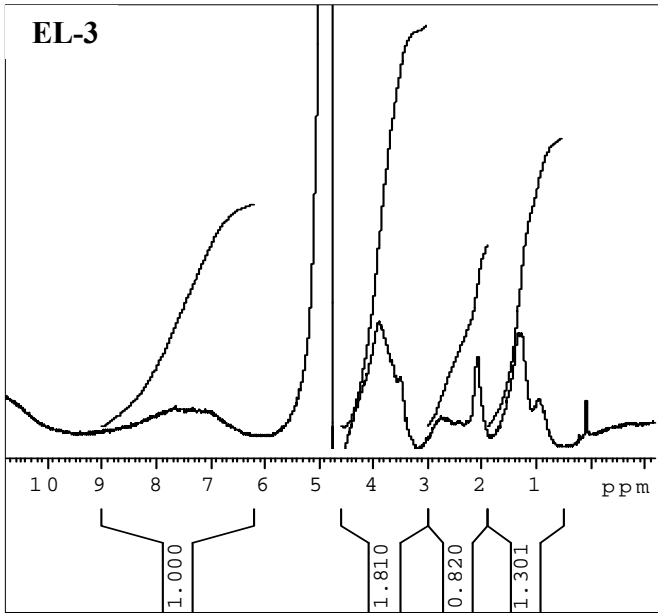
איור 4.1: אנליזת $^1\text{H-NMR}$

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

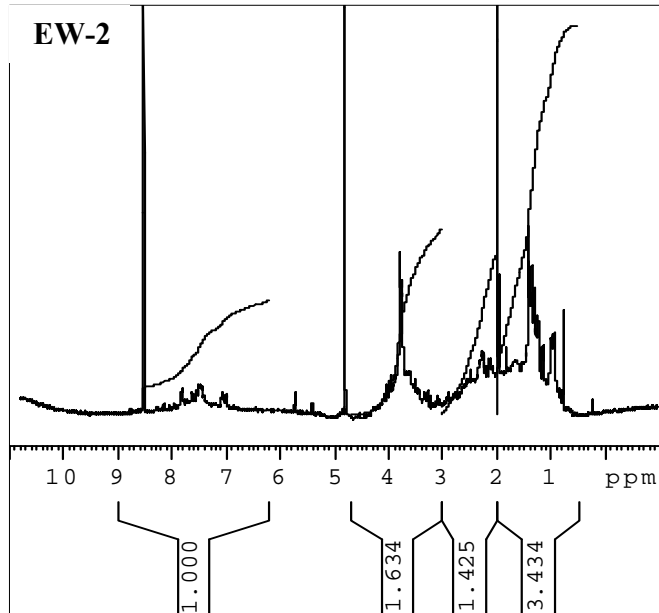
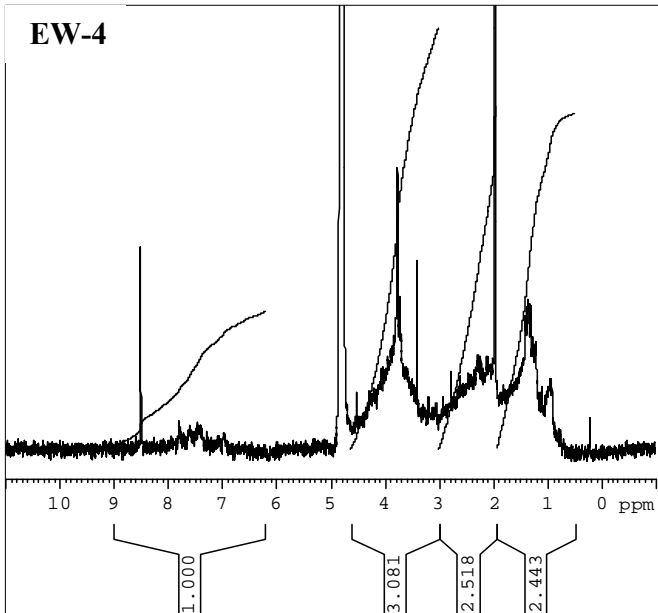
איור 4.1 א': הא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa



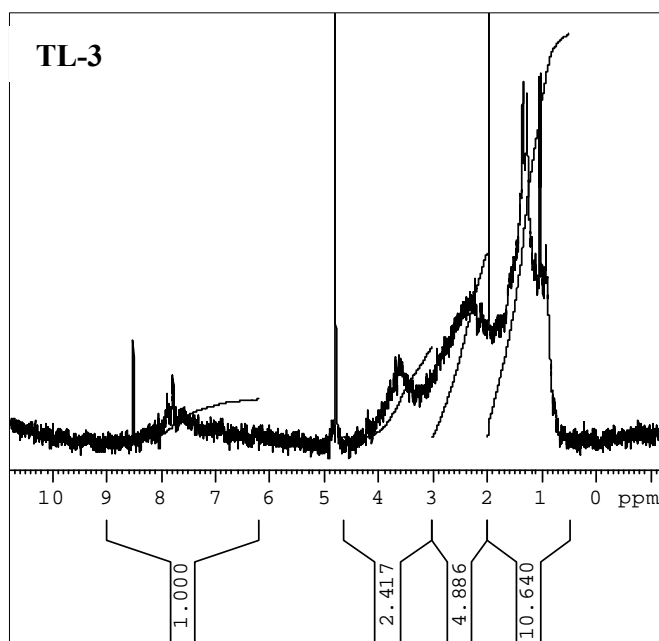
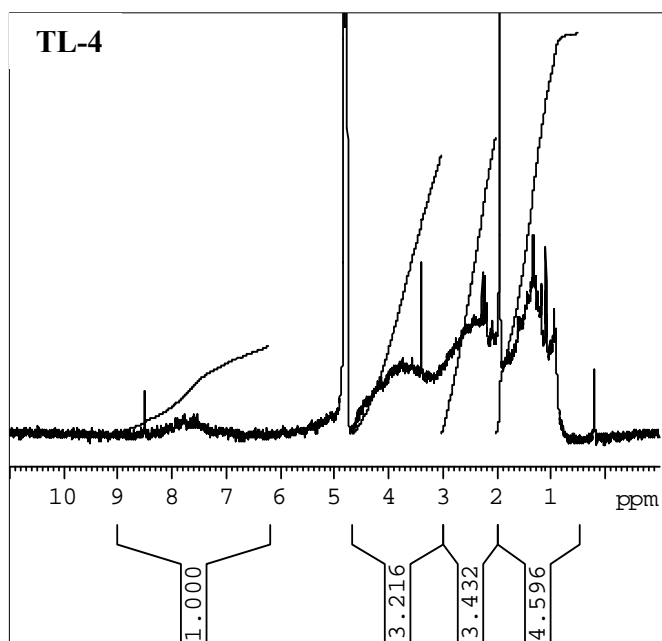
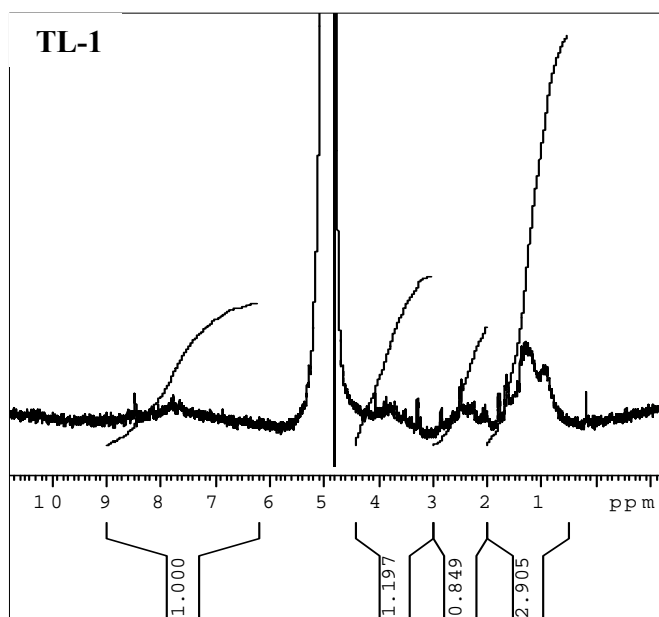
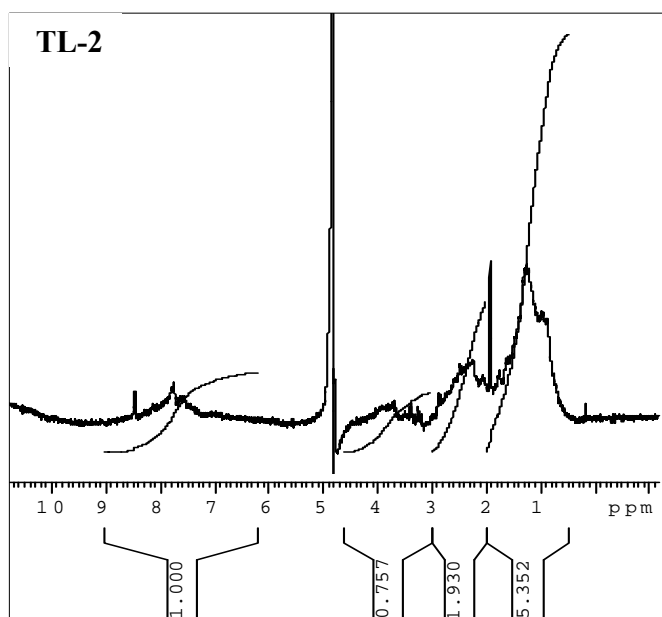
המשך אנליזת $^1\text{H-NMR}$



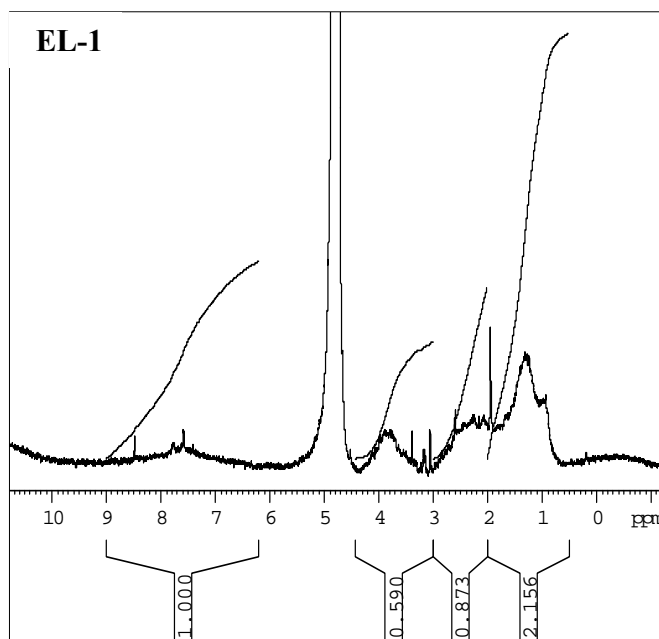
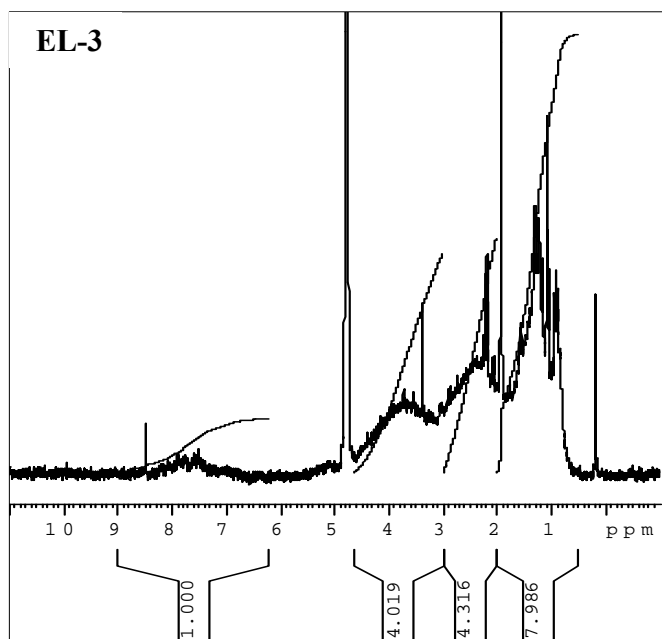
איור 4.1 ב': הא"מ במקטע הגודל 1 kDa < הא"מ < 200 Da



המשך אנליזת $^1\text{H-NMR}$



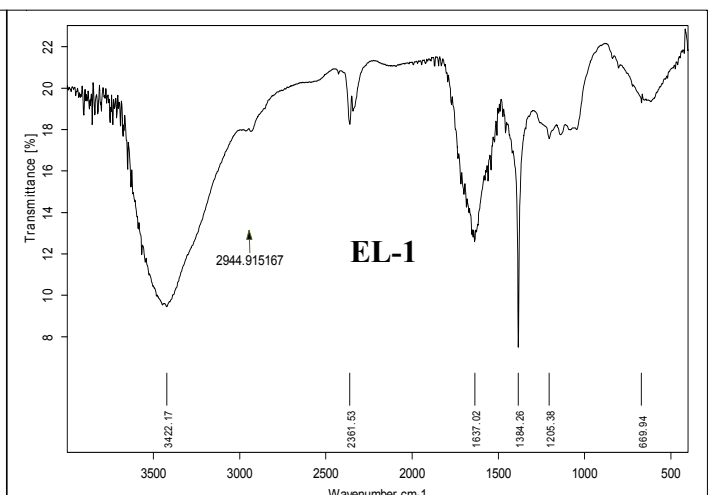
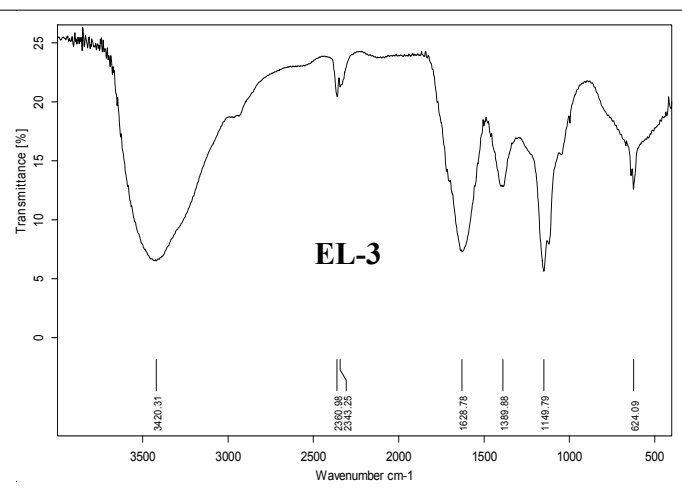
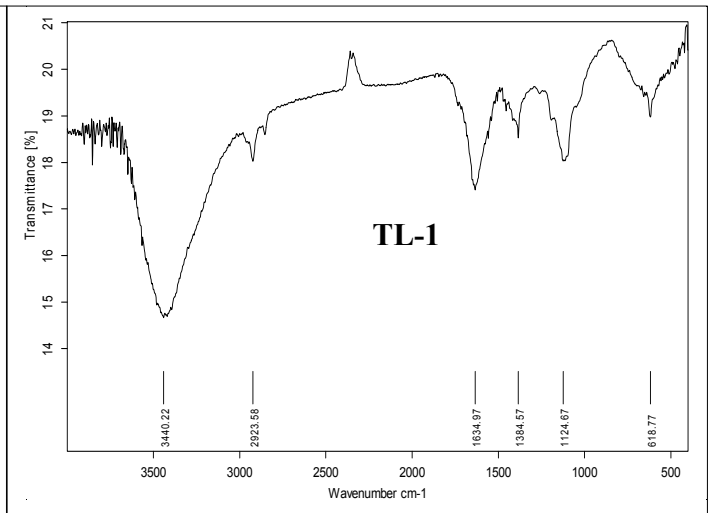
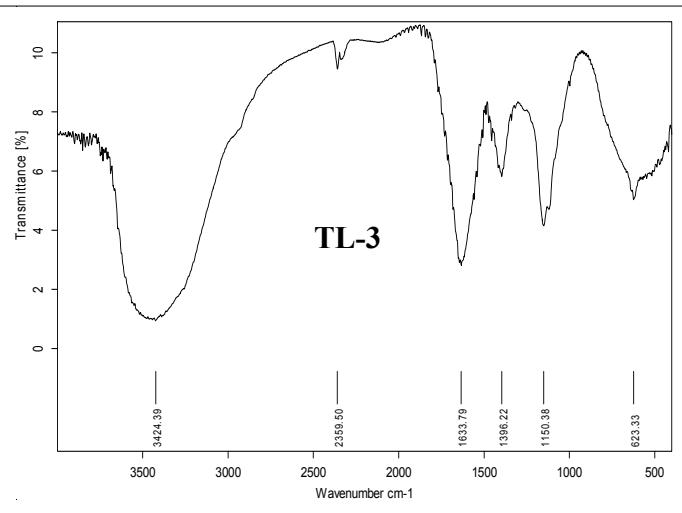
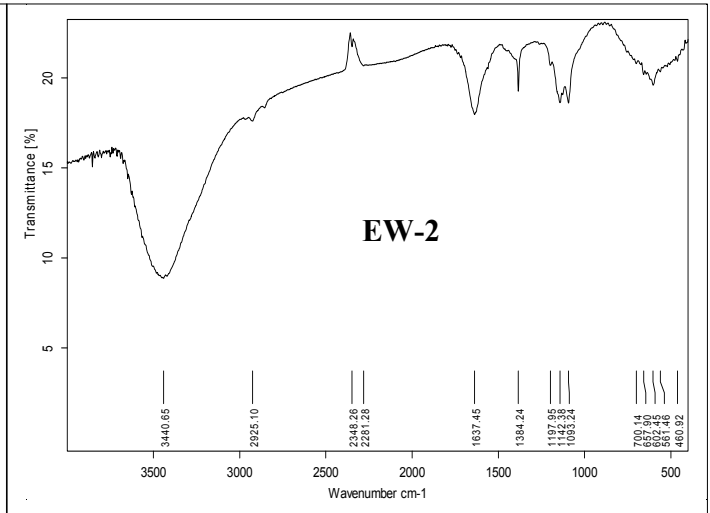
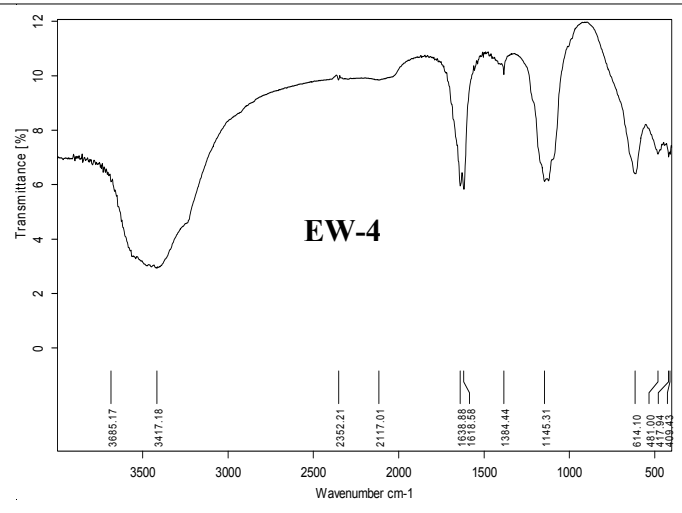
המשך אנליזת $^1\text{H-NMR}$



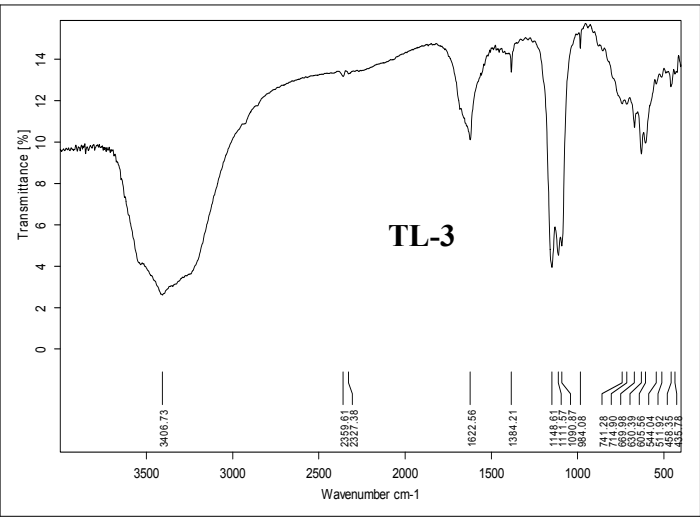
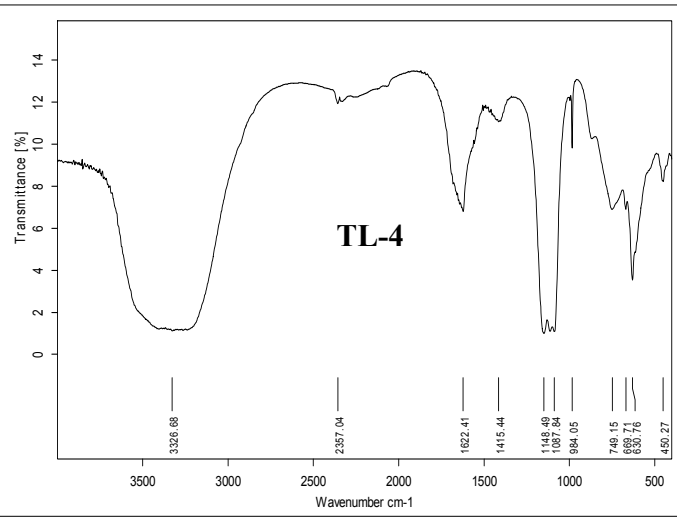
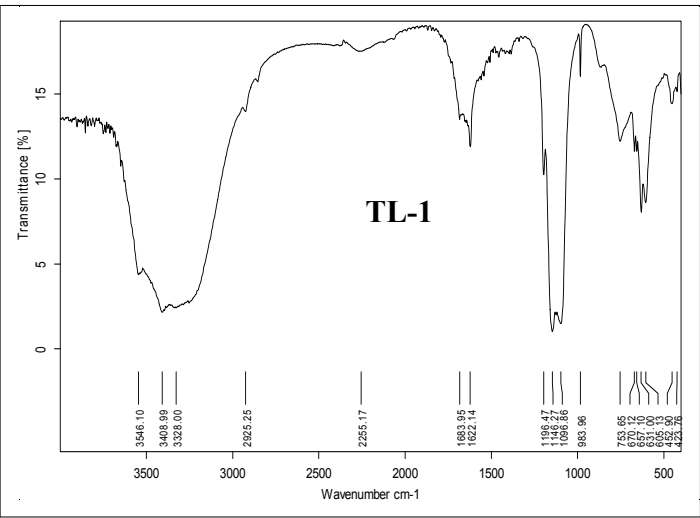
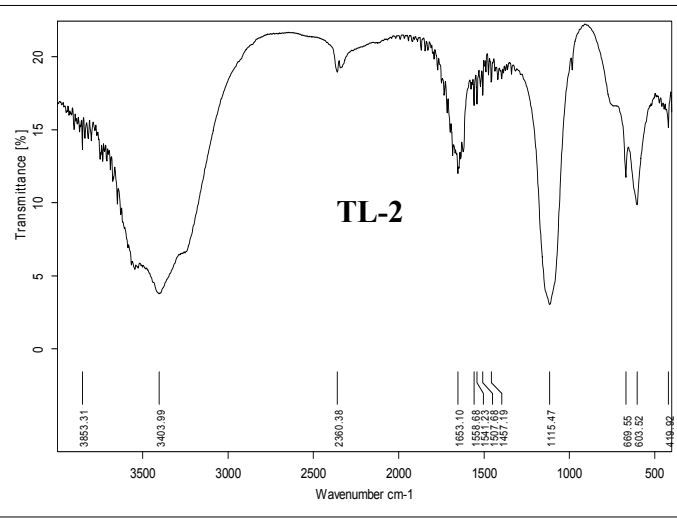
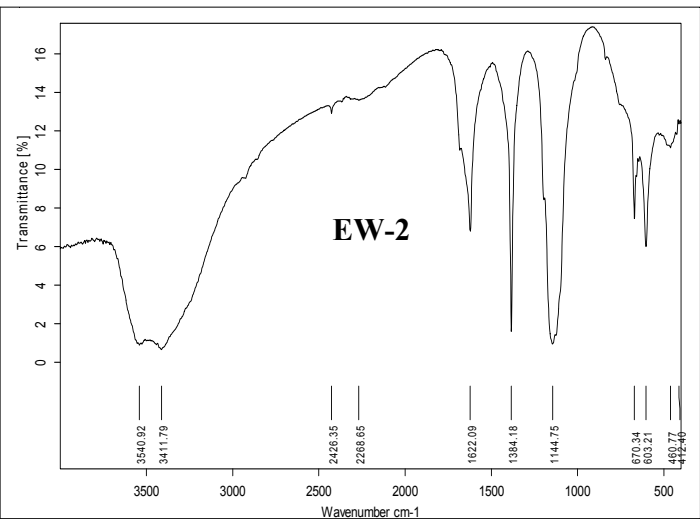
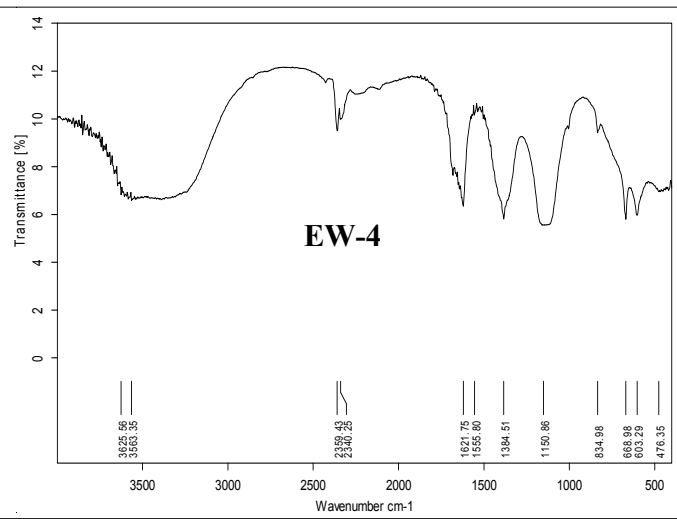
איור 4.2: אנליזת FTIR

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

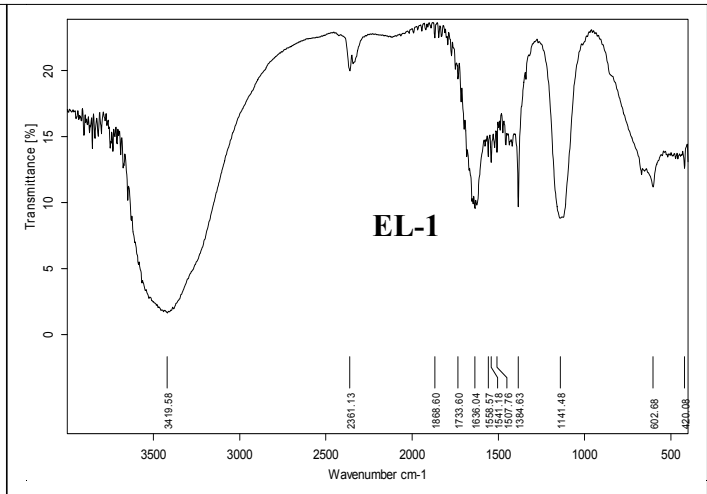
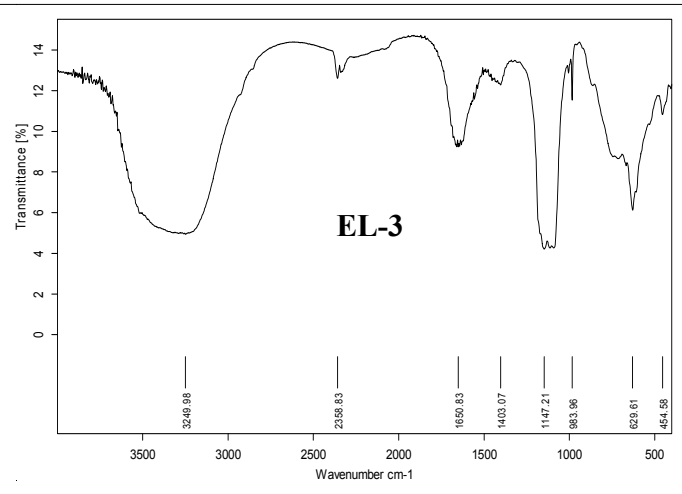
איור 4.2 א': הא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa



איור 4.2 ב': הא"מ במקטע הגודל 1 kDa <math>< 200 \text{ Da}</math>

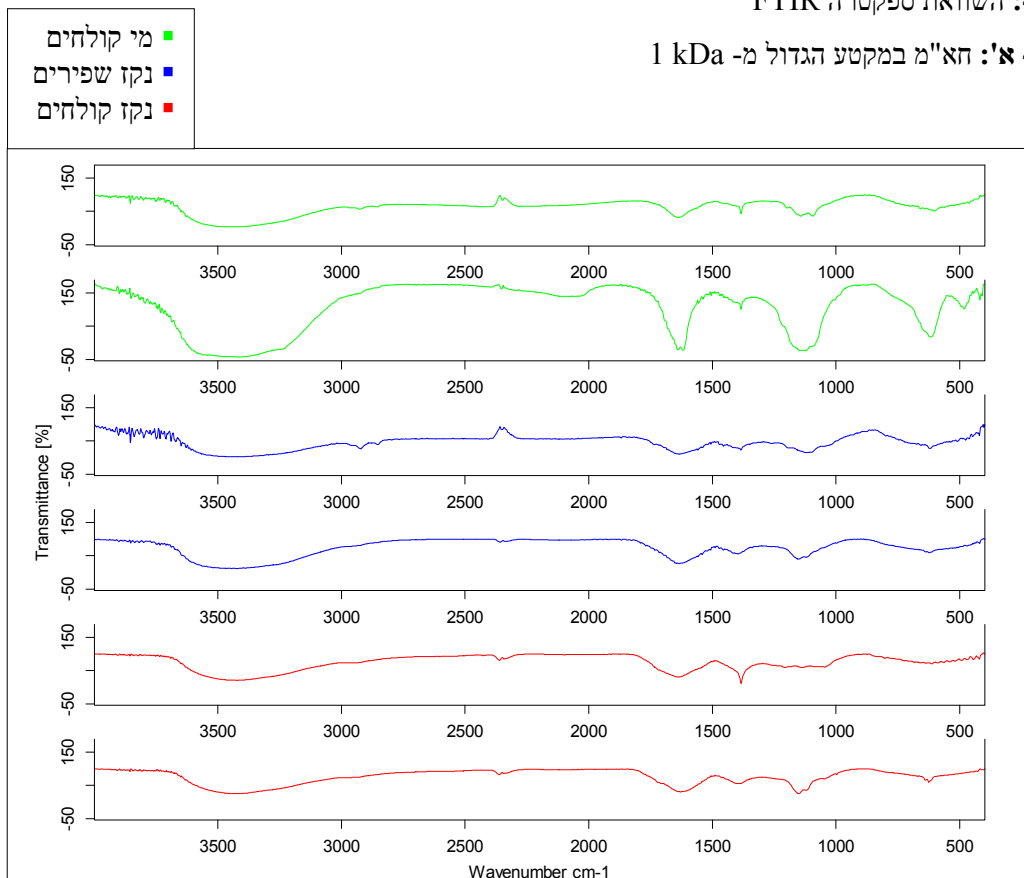


המשך אנליזת FTIR



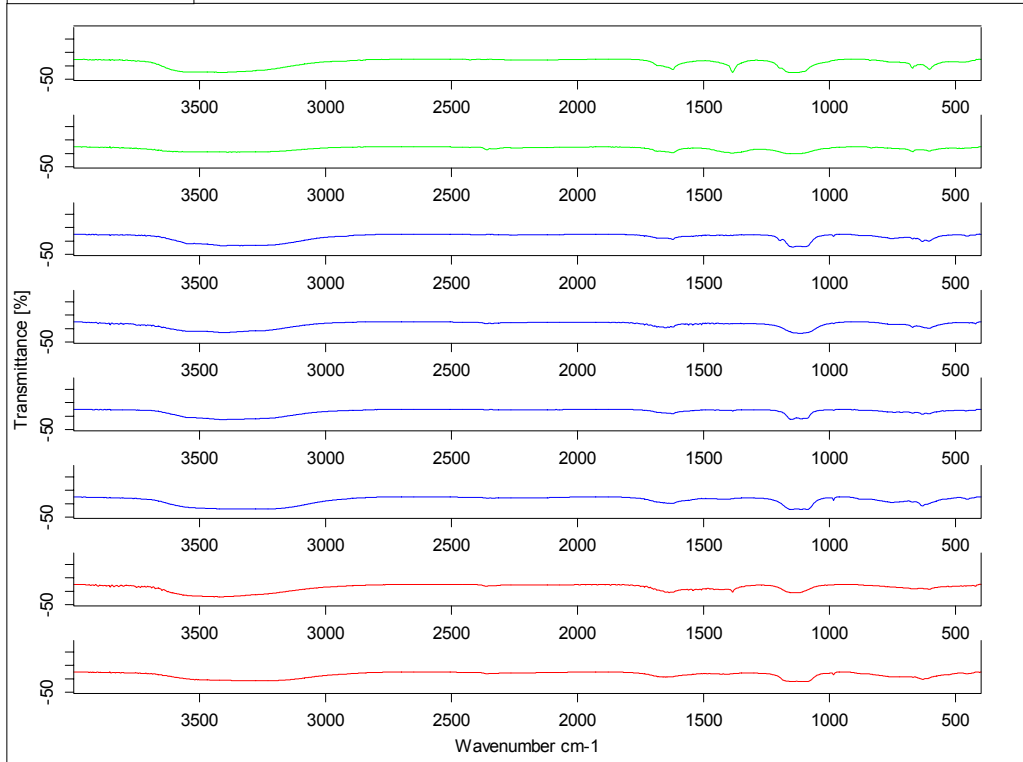
איור 4.3: השוואת ספקטרה FTIR

איור 4.3 א': חא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa



איור 4.3 ב': הא"מ במקטע הגודל 1 kDa < הא"מ < 200 Da

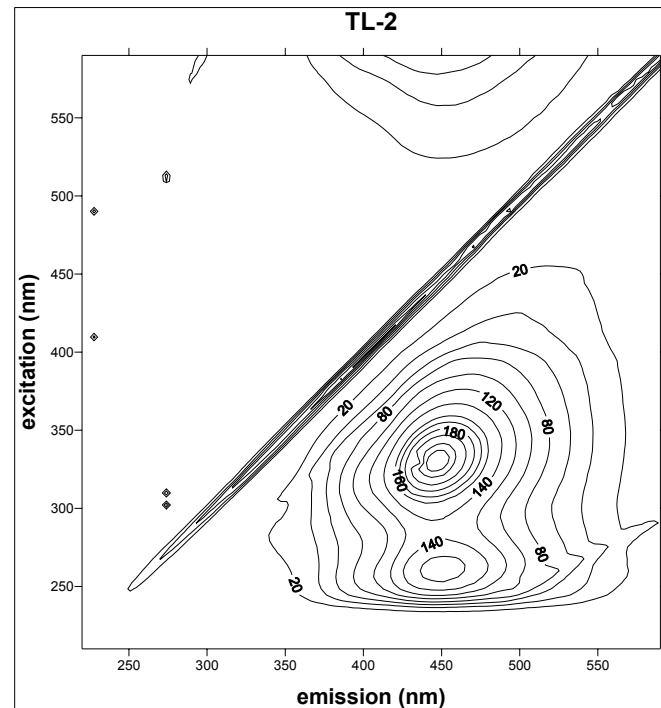
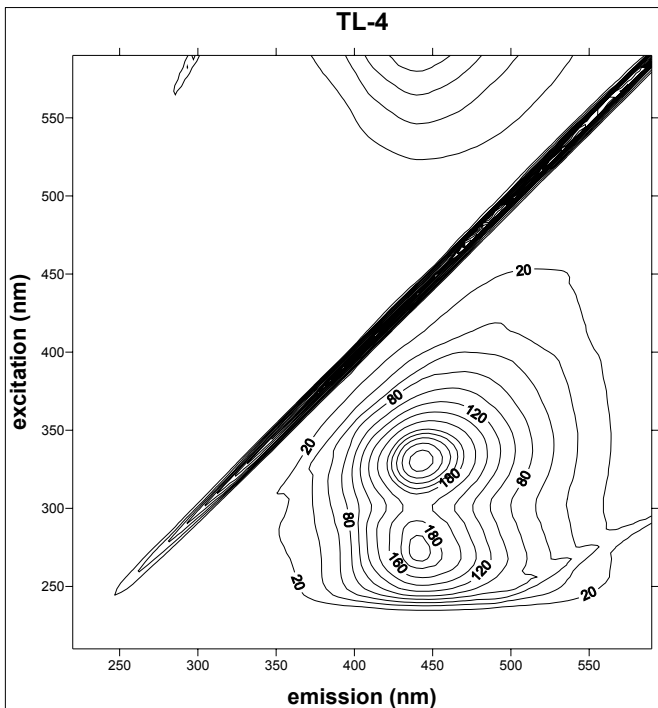
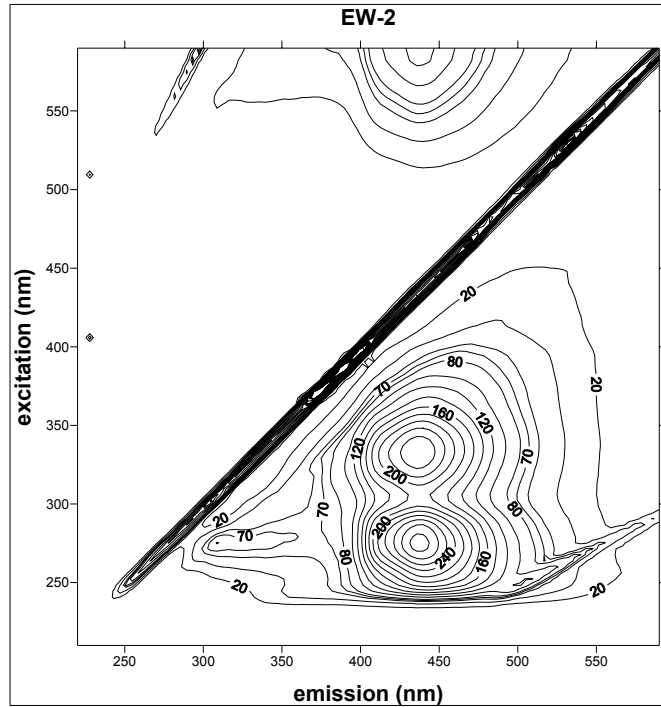
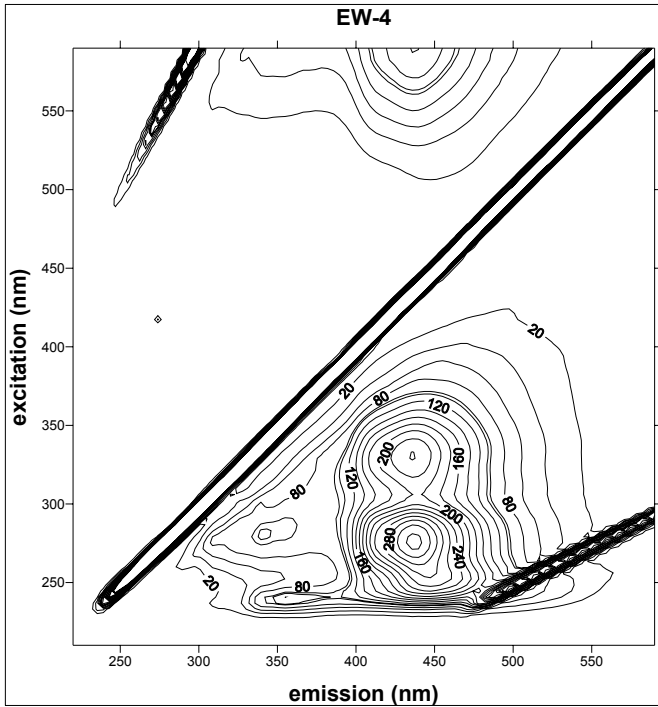
- מי קולחים
- נקז שפירים
- נקז קולחים



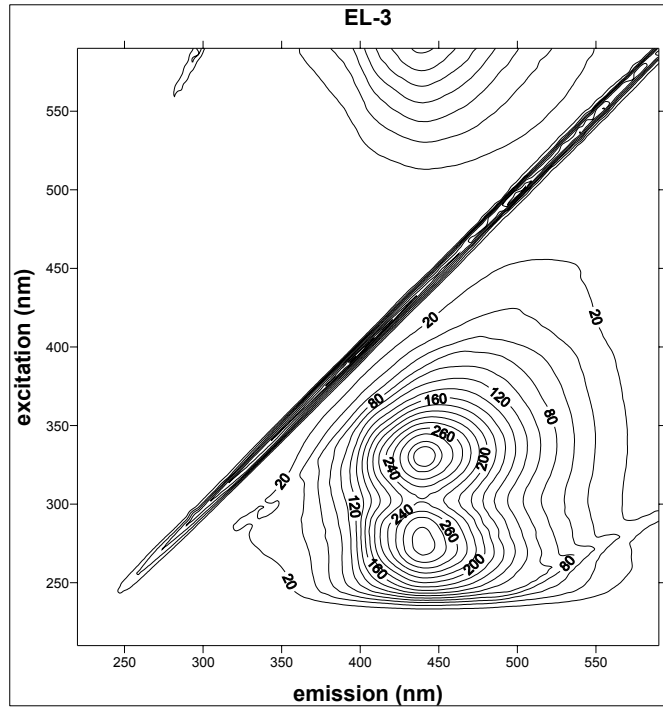
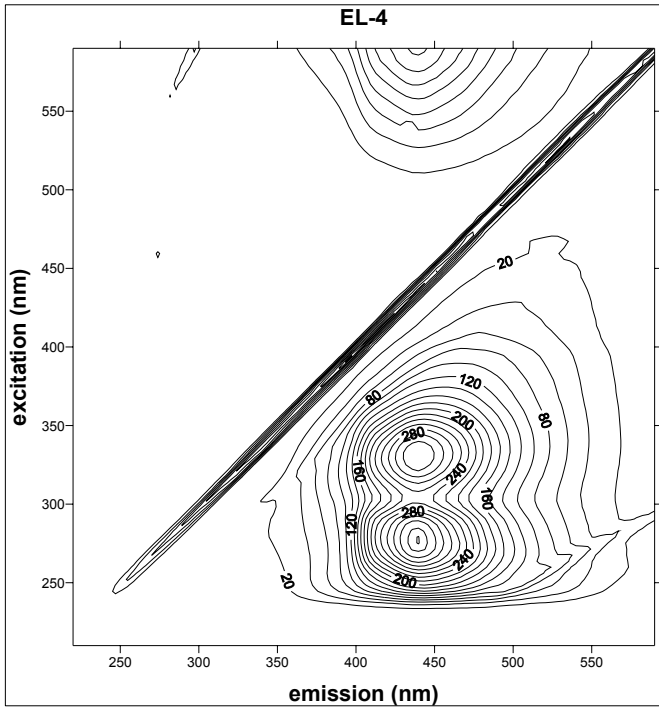
איור 4.4: מפות פלואורסצנטיות של דוגמאות החא"מ

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

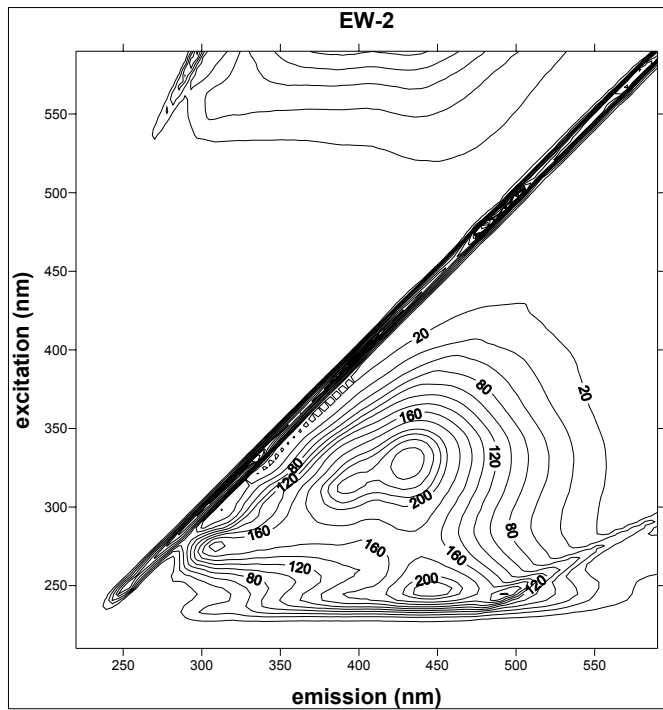
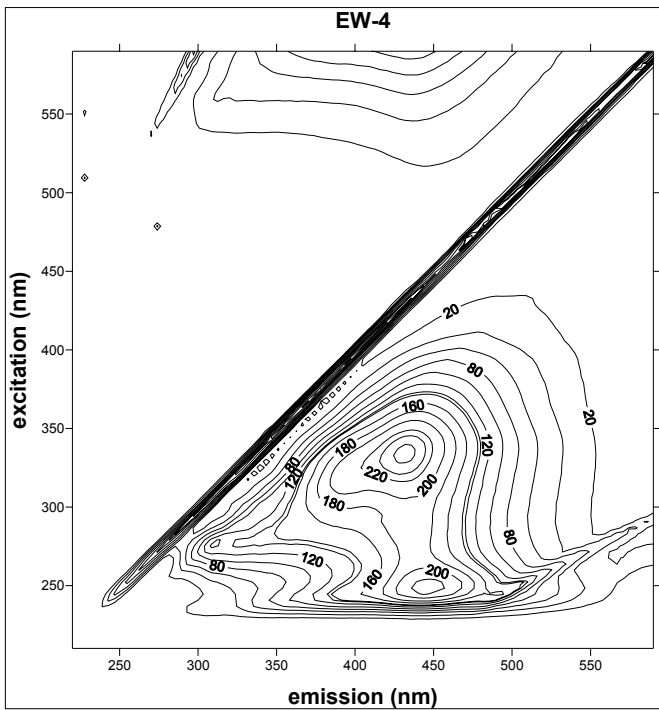
איור 4.4 א': חא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa



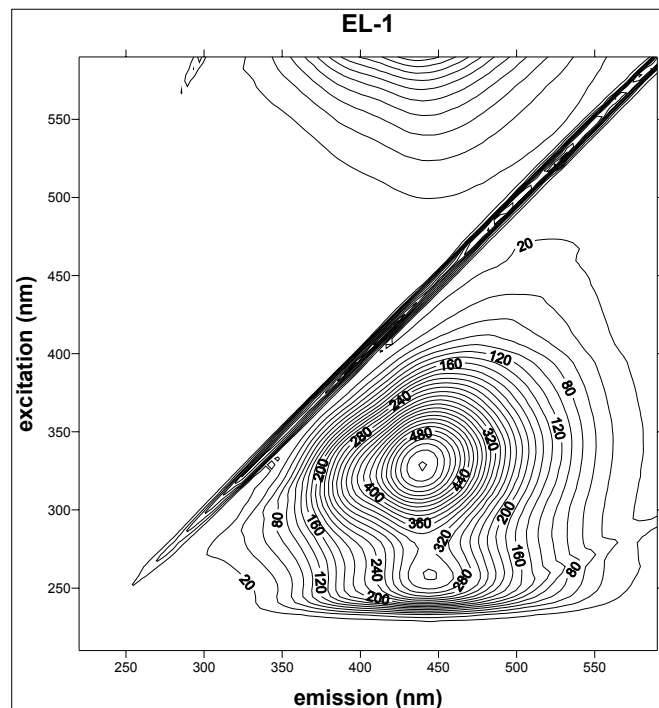
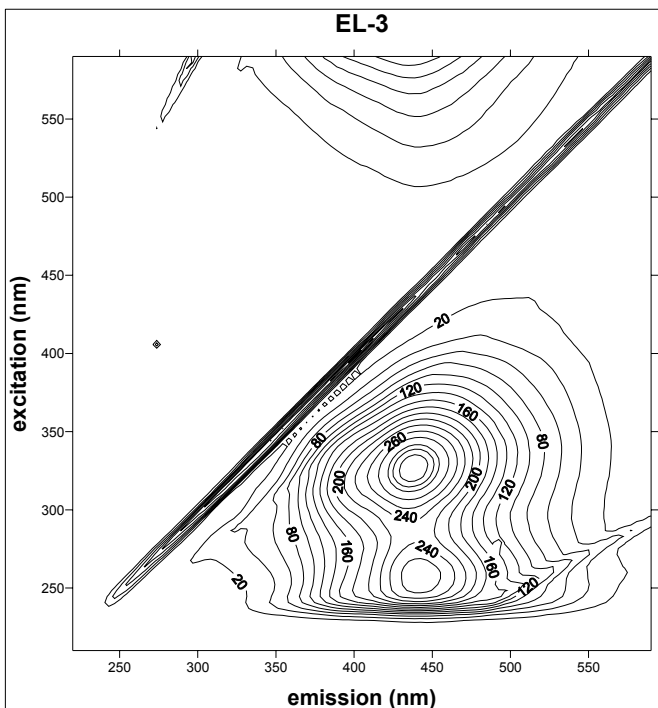
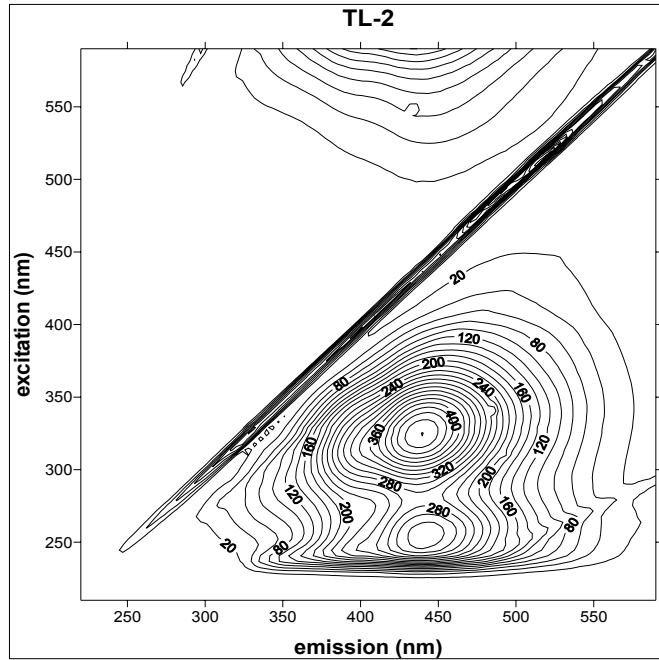
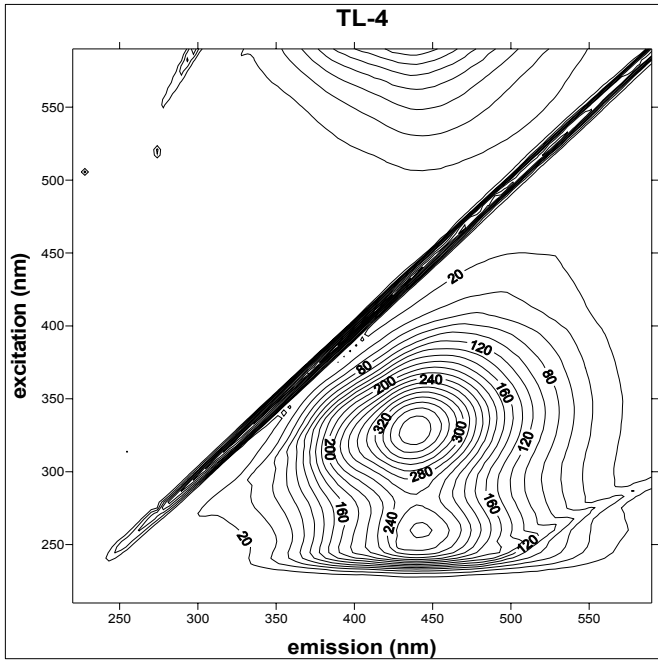
המשך מפות פלואורסצנטיית



איור 4.4 ב': הא"מ במקטע הגודל $1 \text{ kDa} < \text{מ"א} < 200 \text{ Da}$

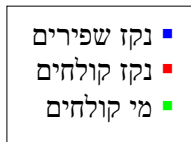
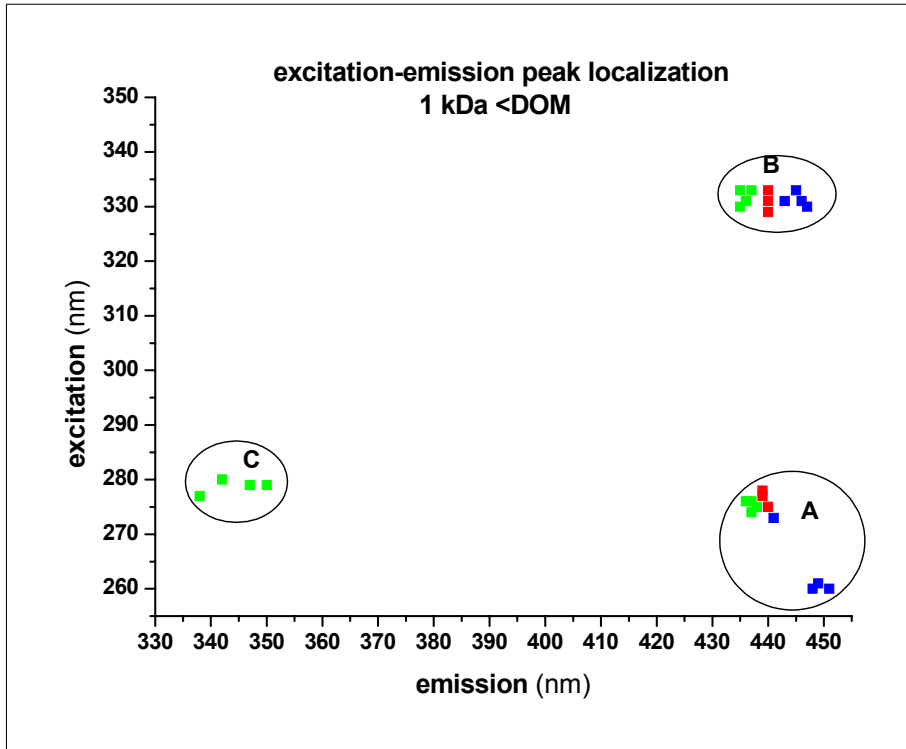


המשך מפות פלואורסצנטיות

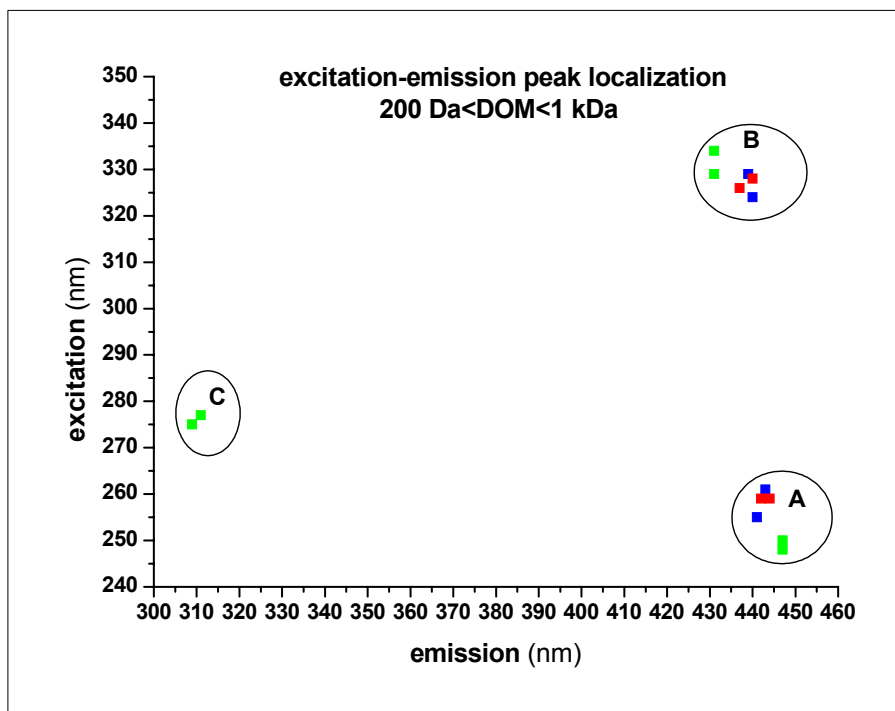


איור 4.5: מיקום הפיקים הפלוואורסצנטיים בחא"מ (זוגות אורכי גל לעירור ופליטה)

איור 4.5 א': חא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa



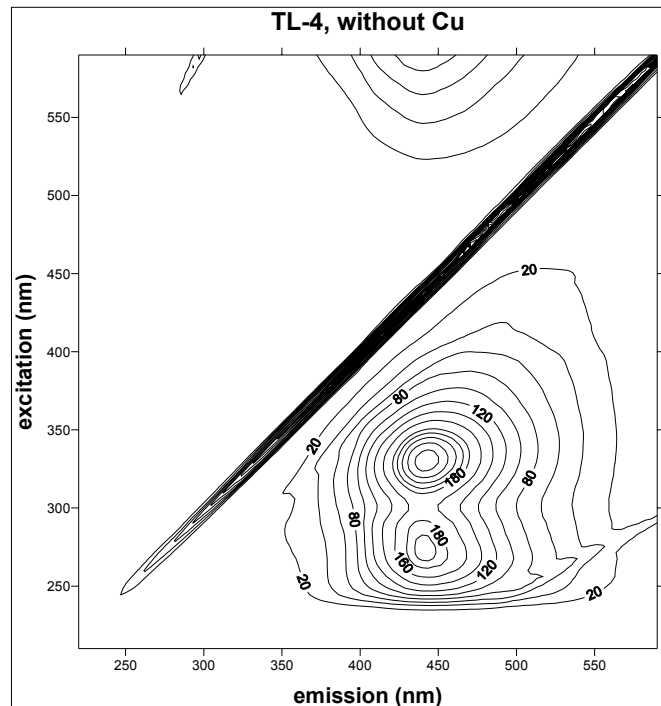
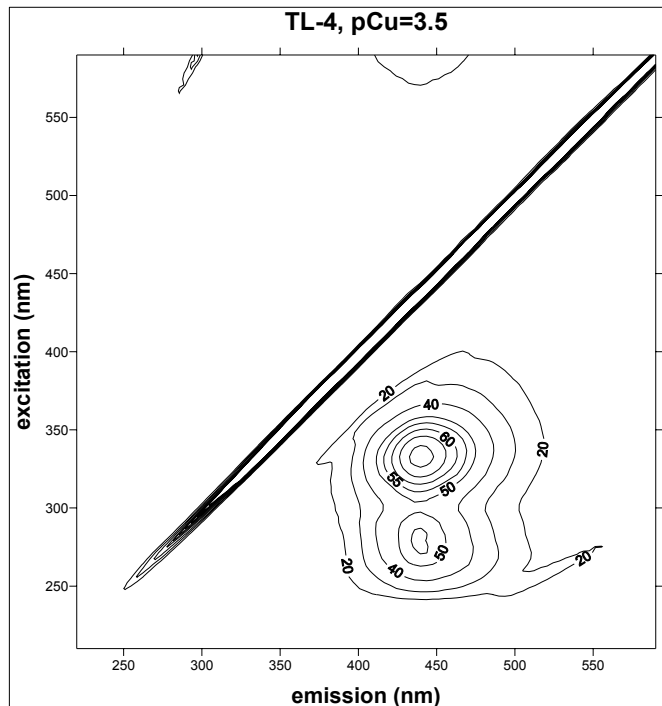
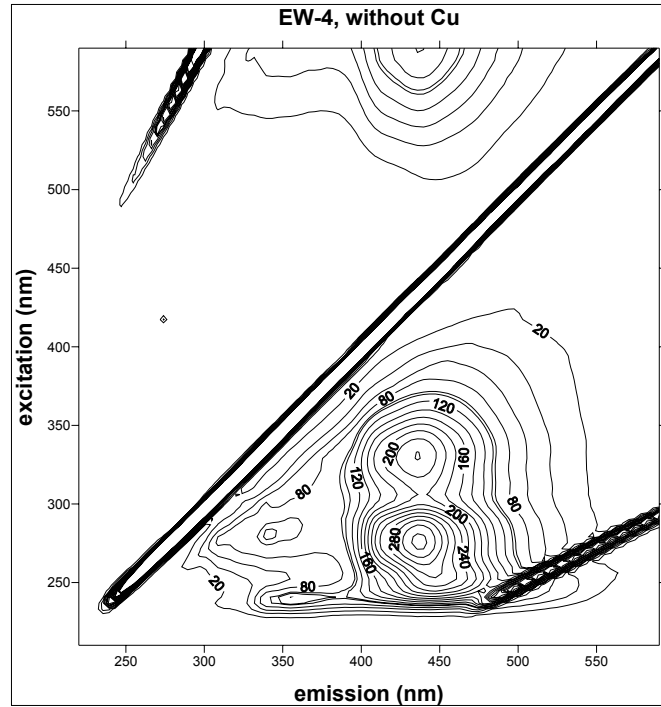
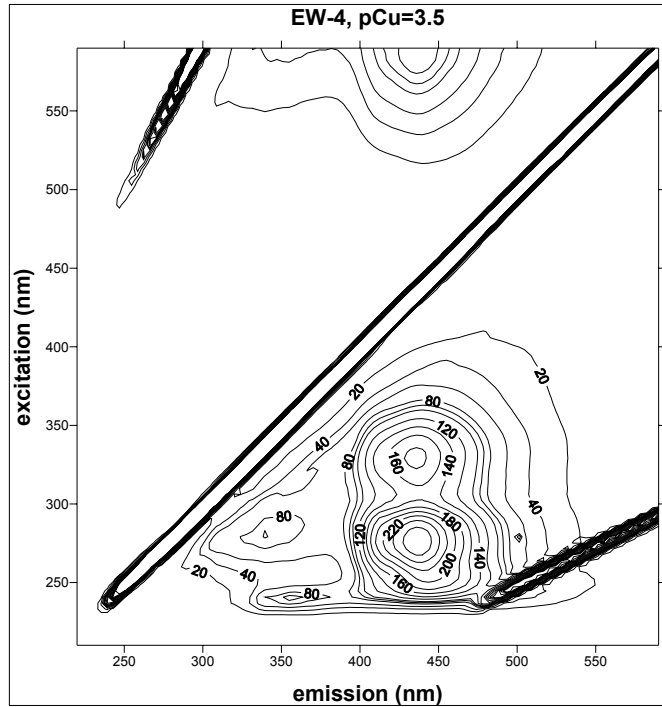
איור 4.5 ב': חא"מ במקטע גודל 200 Da < חא"מ < 1 kDa



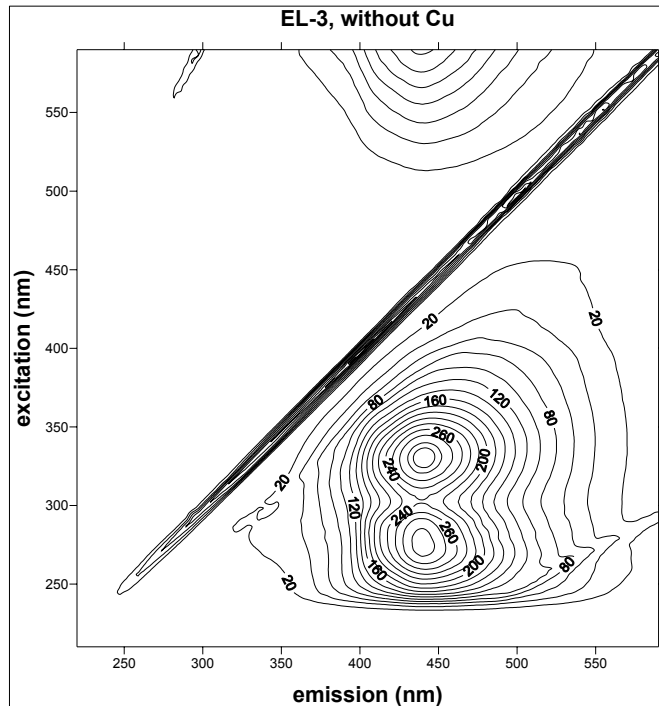
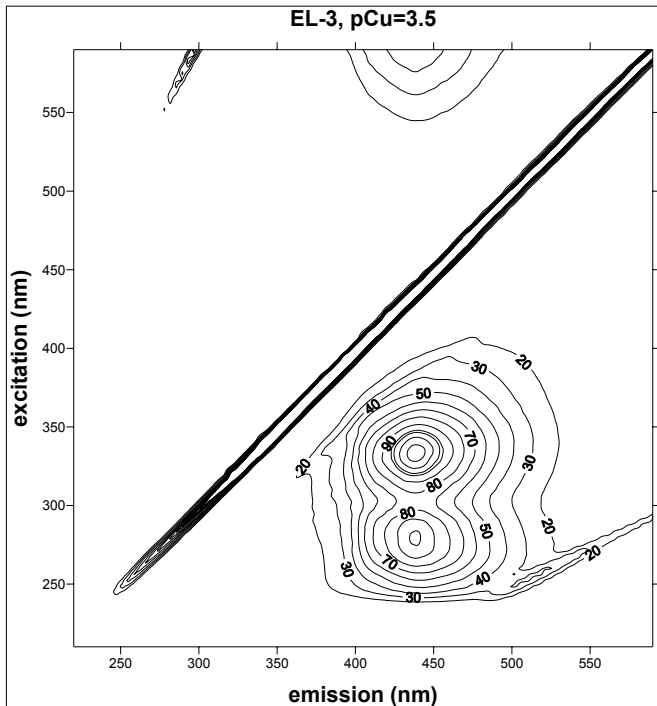
איור 4.6: השוואת המפות הפלואורסצנטיות, לפני ואחרי הוספת נחושת (pCu=3.5)

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

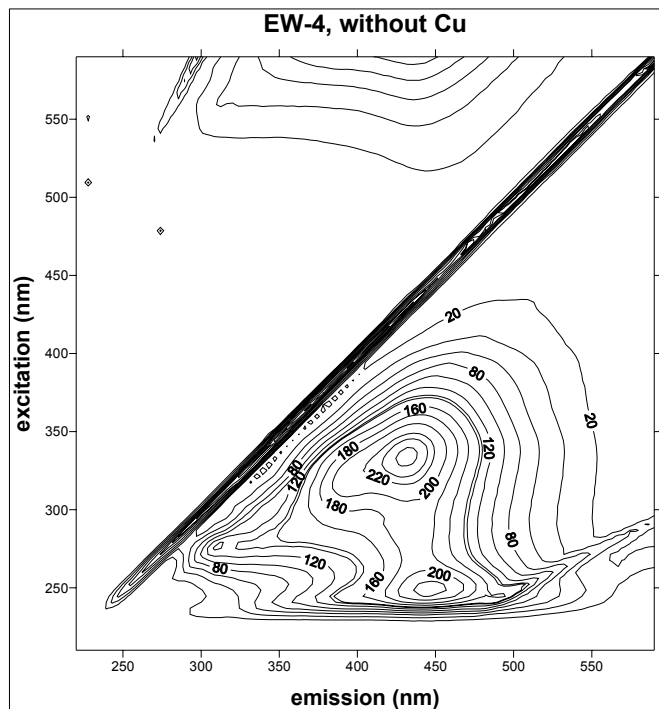
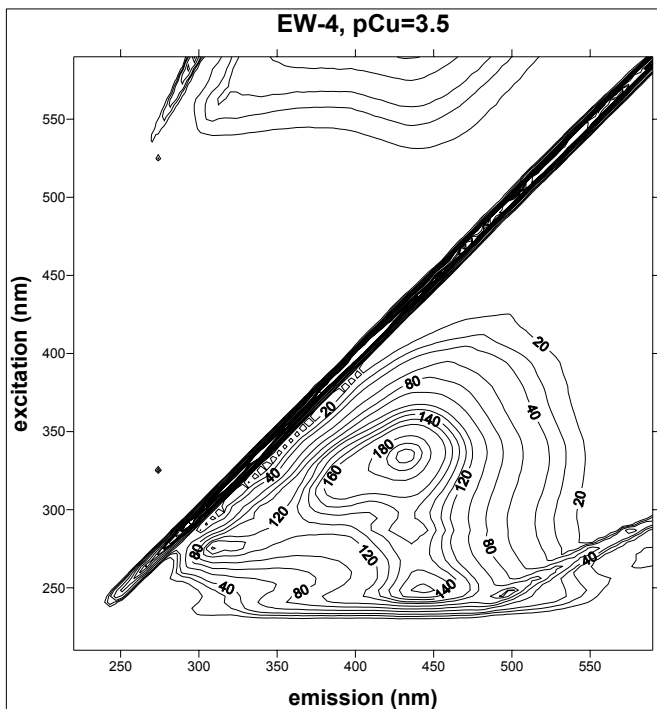
איור 4.6 א': הא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa



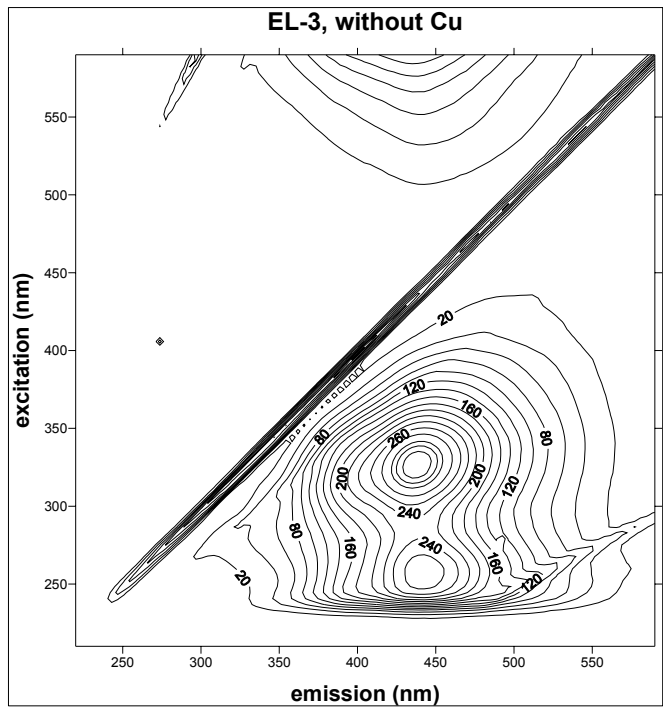
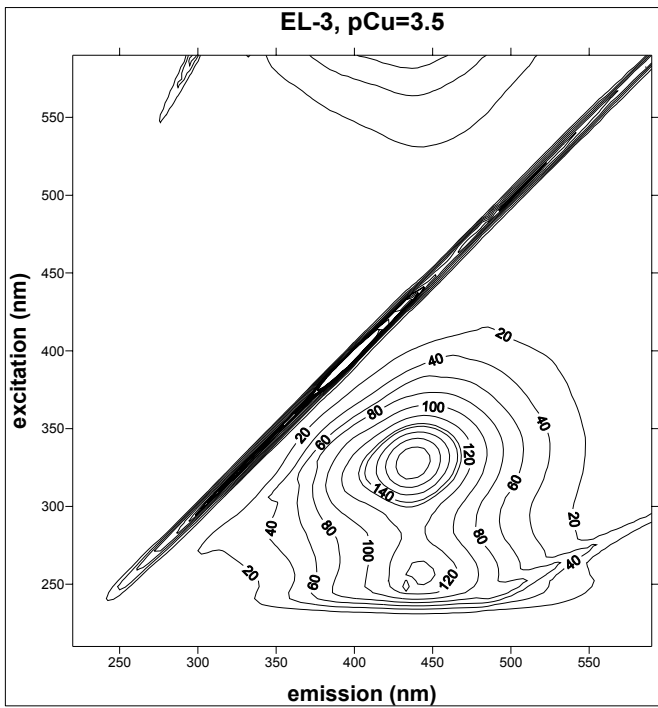
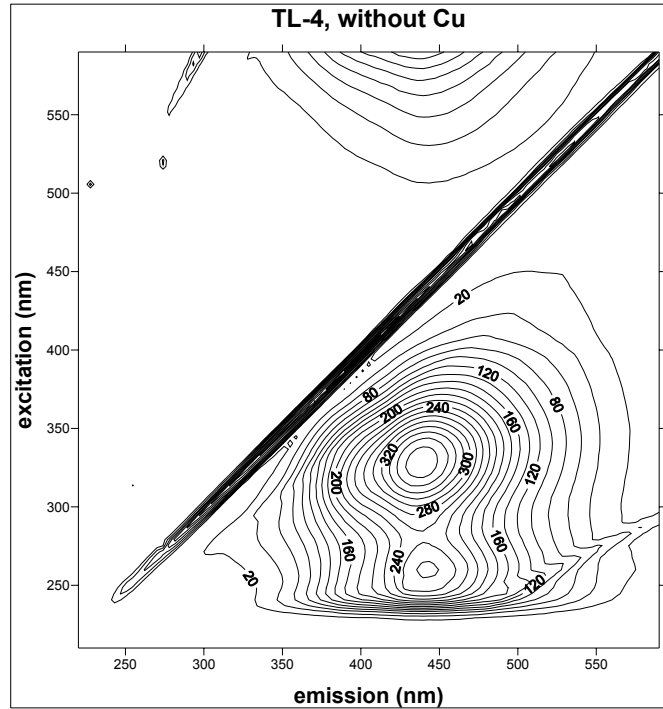
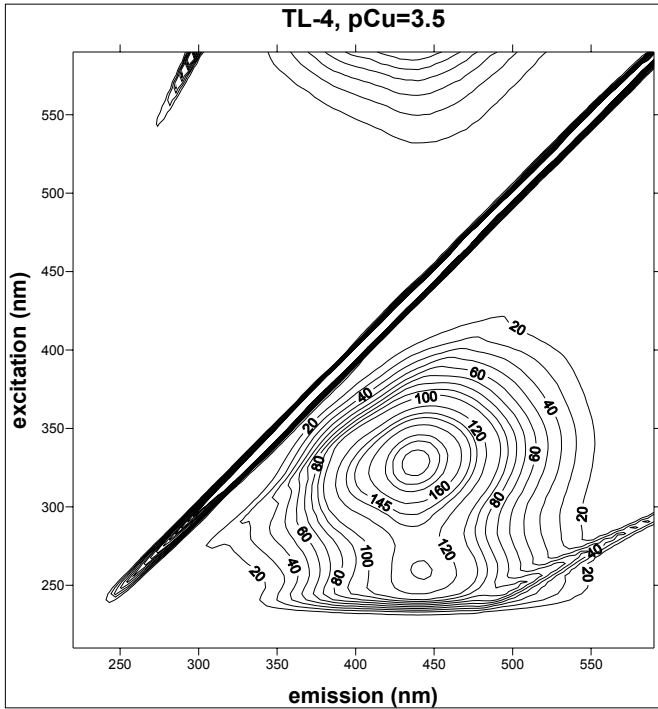
המשך השוואת המפות הפלואורסצנטיות לפני ואחרי הוספת נחושת



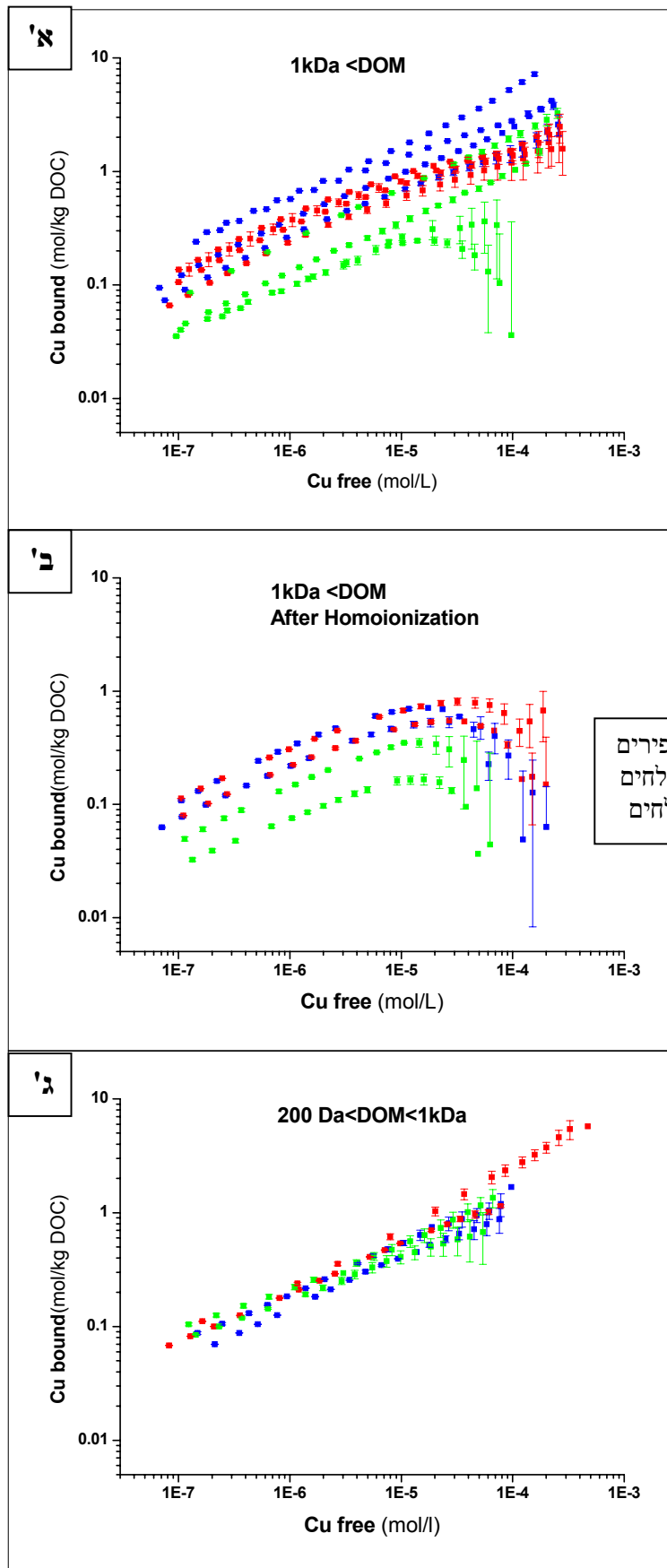
איור 4.6 ב': הא"מ במקטע הגודל 1 kDa < הא"מ < 200 Da



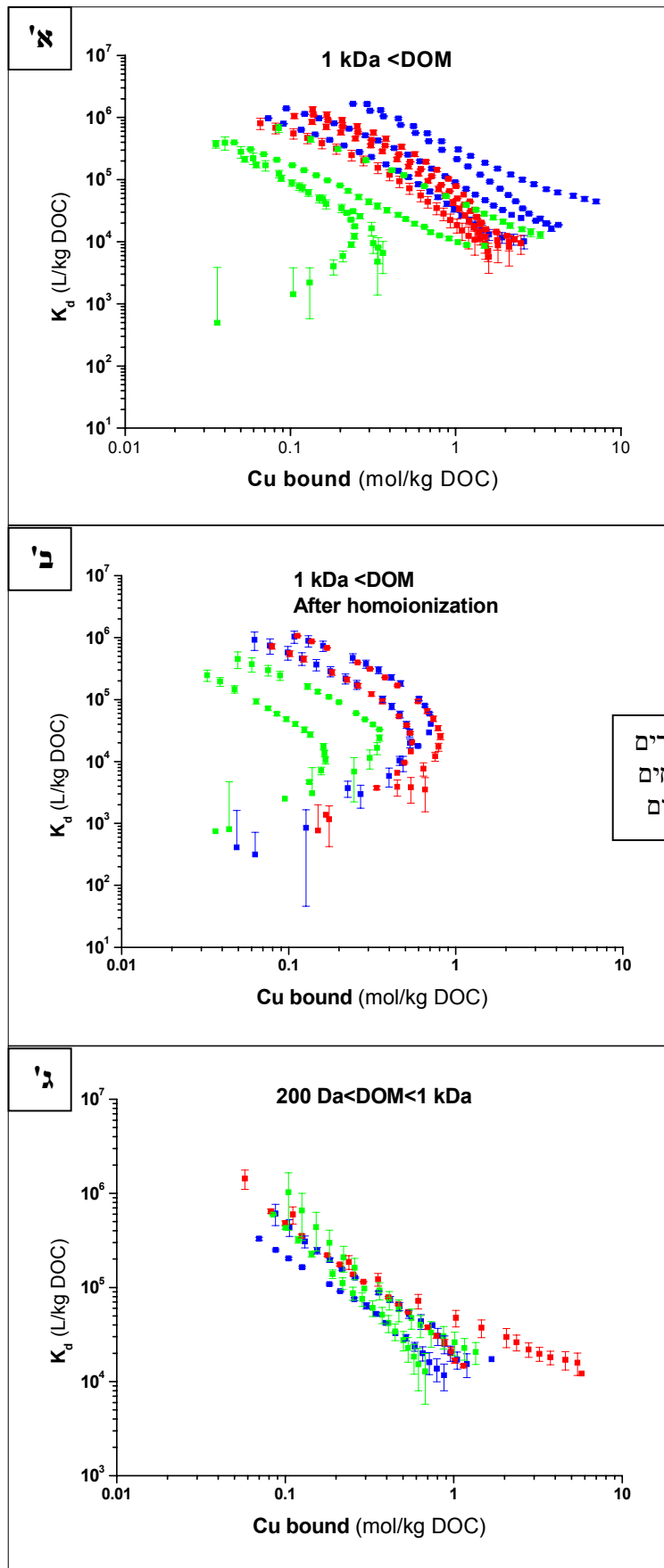
המשך השוואת המפות הפלואורסצנטיות לפני ואחרי הוספת נחושת



איור 4.7: איזותרמות קשירה של הא"מ ונחושת

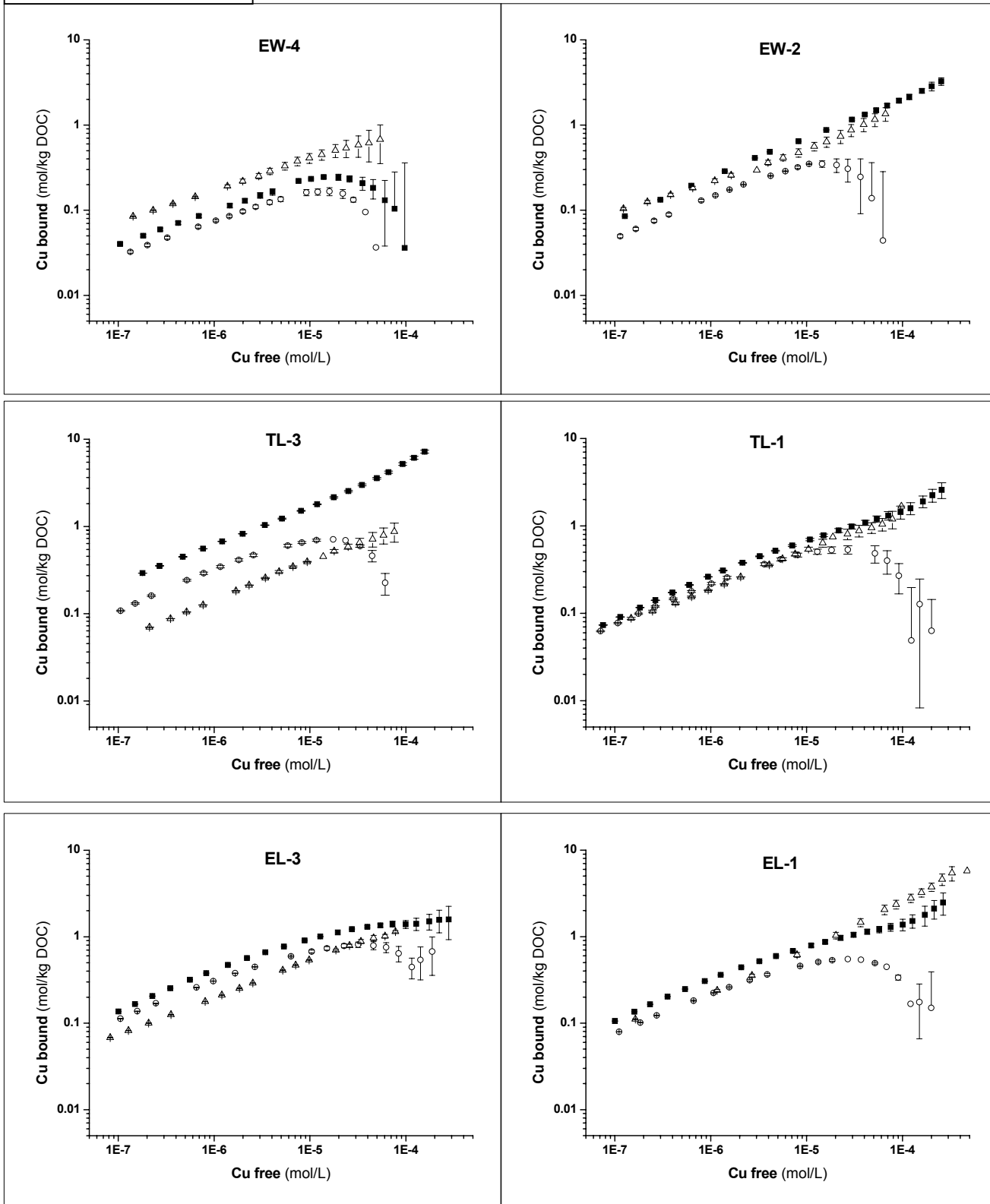


איור 4.8: מקדם החלוקה, K_d , כתלות בריכוז הנהושת הקשורה לחא"מ

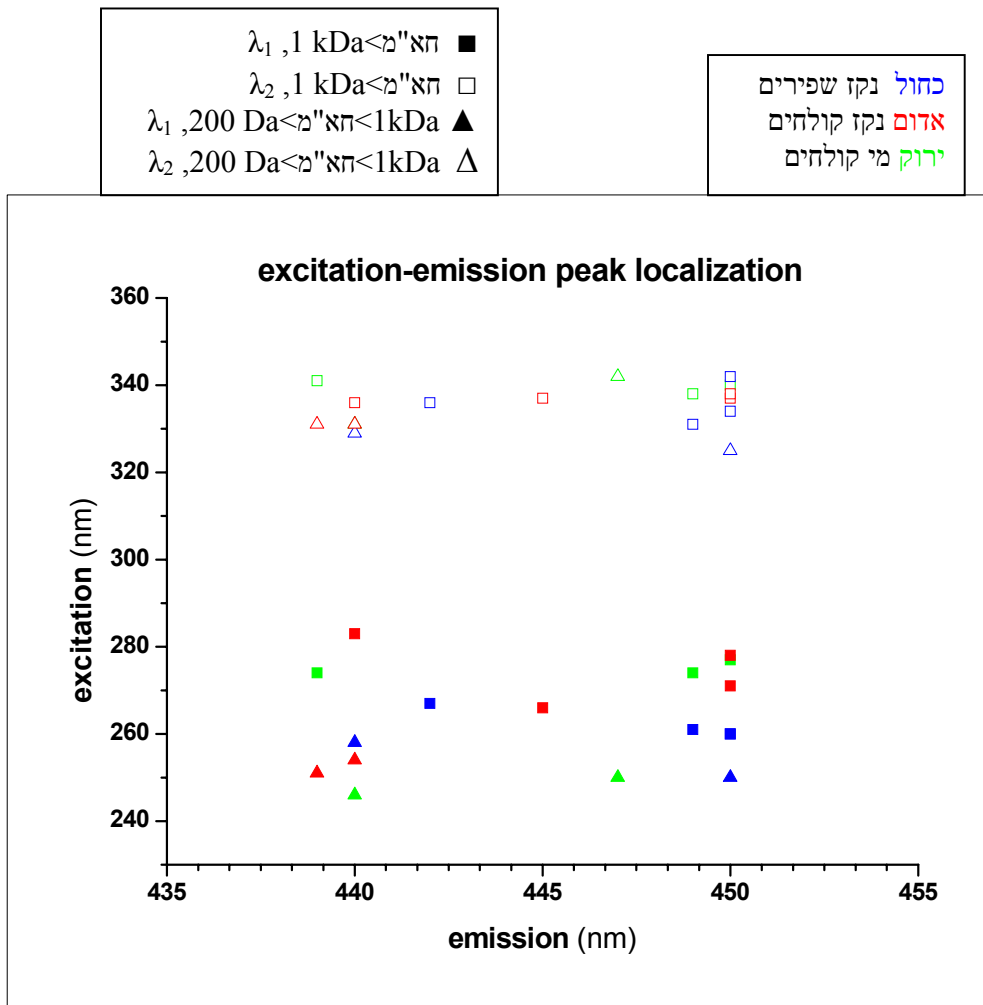


■ הא"מ < 1kDa
 ○ הא"מ > 1kDa
 לאחר הומיוניזציה
 △ הא"מ < 1kDa < 200Da

איור 4.9: השוואת איזותרמות הקשירה של החא"מ, בשני מקטעי הגודל ולאחר הומיוניזציה



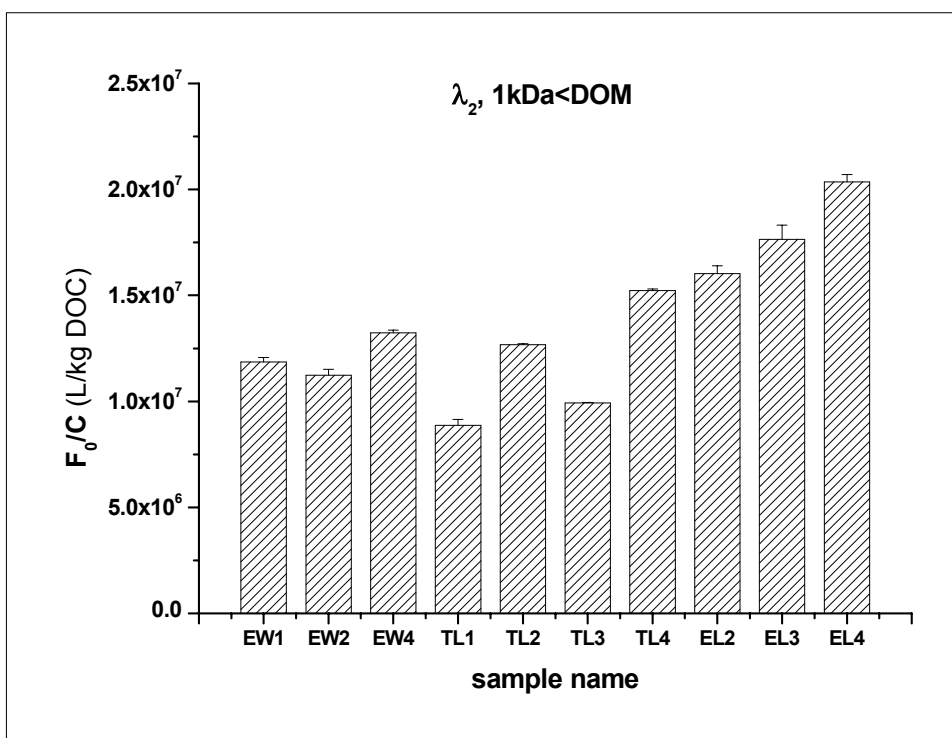
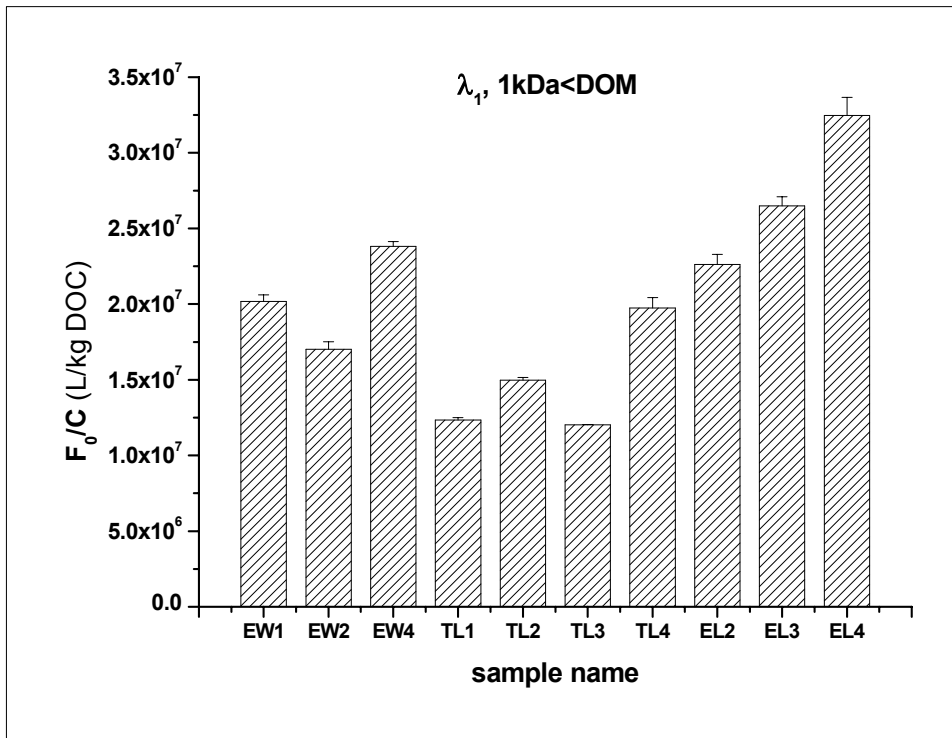
איור 4.10: מיקום הפיקים הפלוואורסצנטיים (זוגות אורכי גל לעירור ופליטה), עבור דוגמאות חא"מ



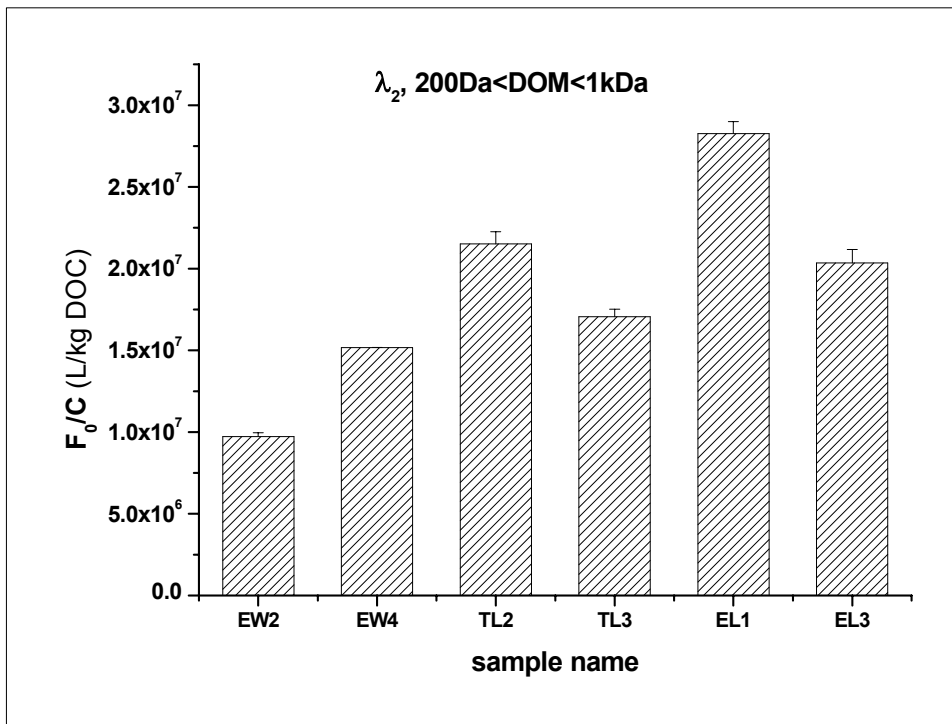
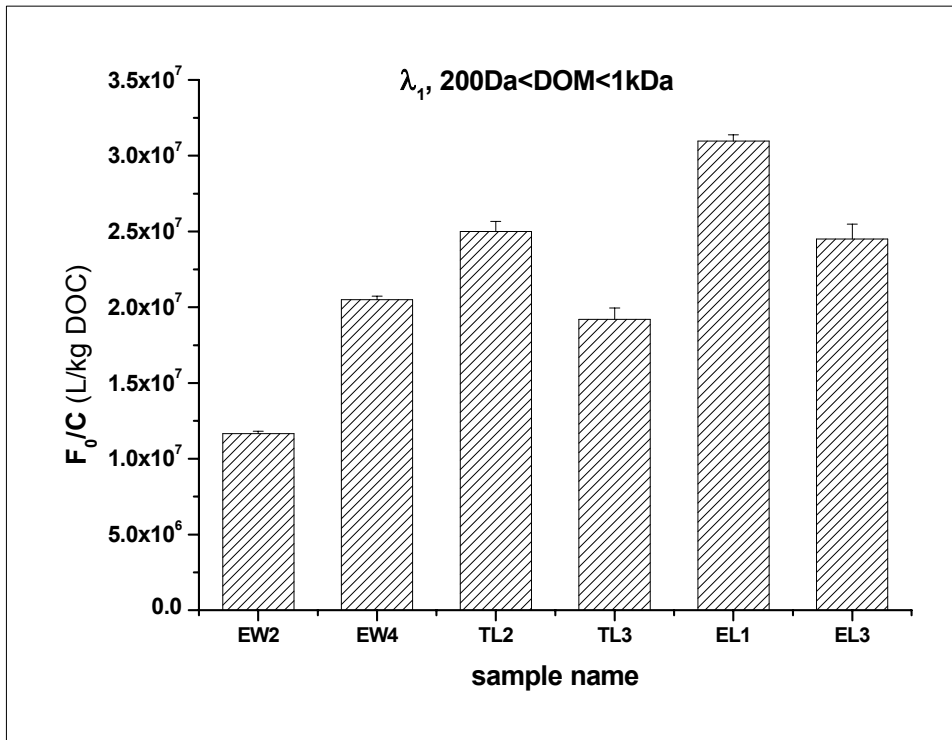
איור 4.11: עוצמת הפלואורסצנטיה המנורמלת לריכוז הפא"מ, בדוגמאות חא"מ ללא תוספת נחושת

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

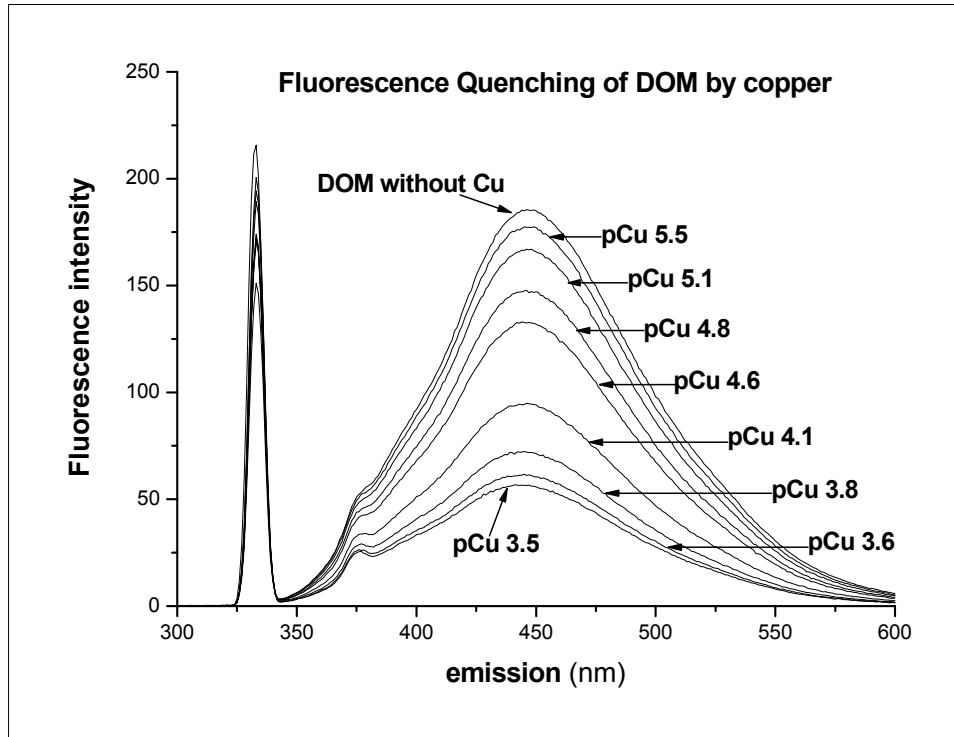
איור 4.11 א': חא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa



איור 4.11 ב': הא"מ במקטע הגודל $200 \text{ Da} < \text{DOM} < 1 \text{ kDa}$

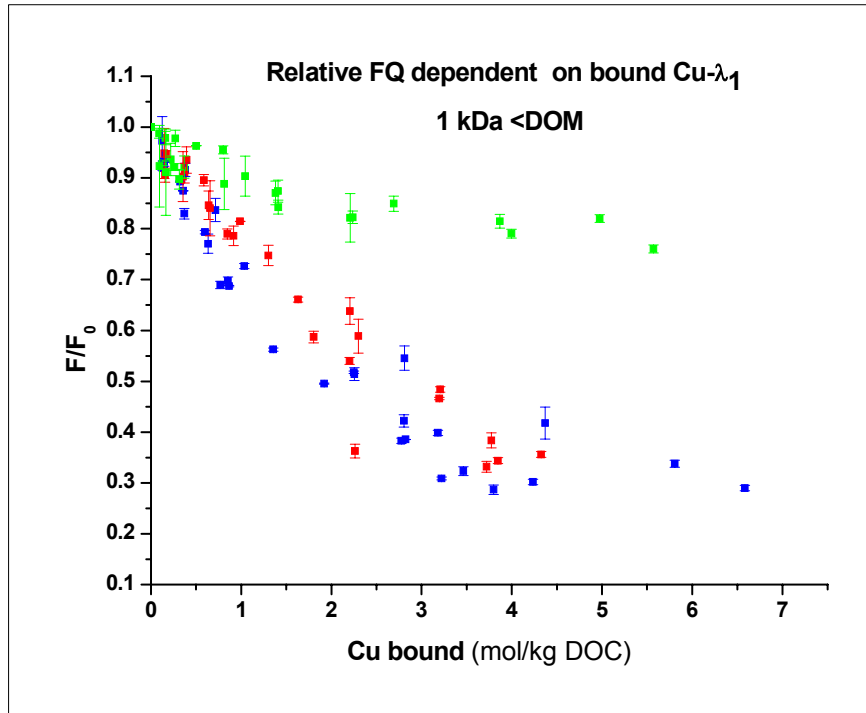


איור 4.12: דיכוי בעוצמת הפלואורסצנטיה של דוגמת חא"מ בתוספת ריכוזי נחושת עולים (דוגמה TL-2, מקטע חא"מ גדול מ-1 kDa, עירור ב-331 nm)

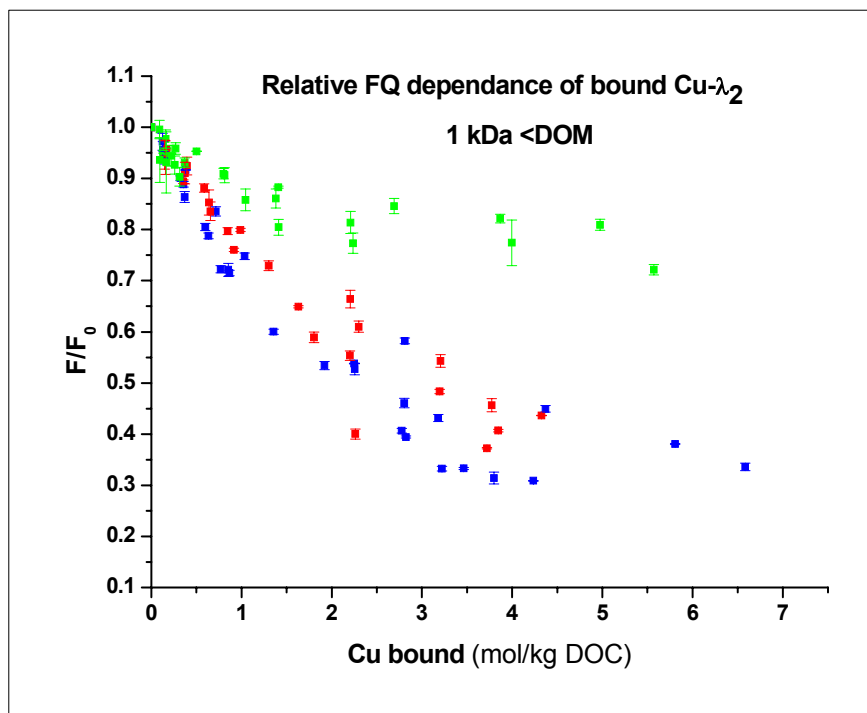


איור 4.13: עוצמת הפלואורסצנטיה היחסית, כתלות בריכוז הנחושת הקשורה

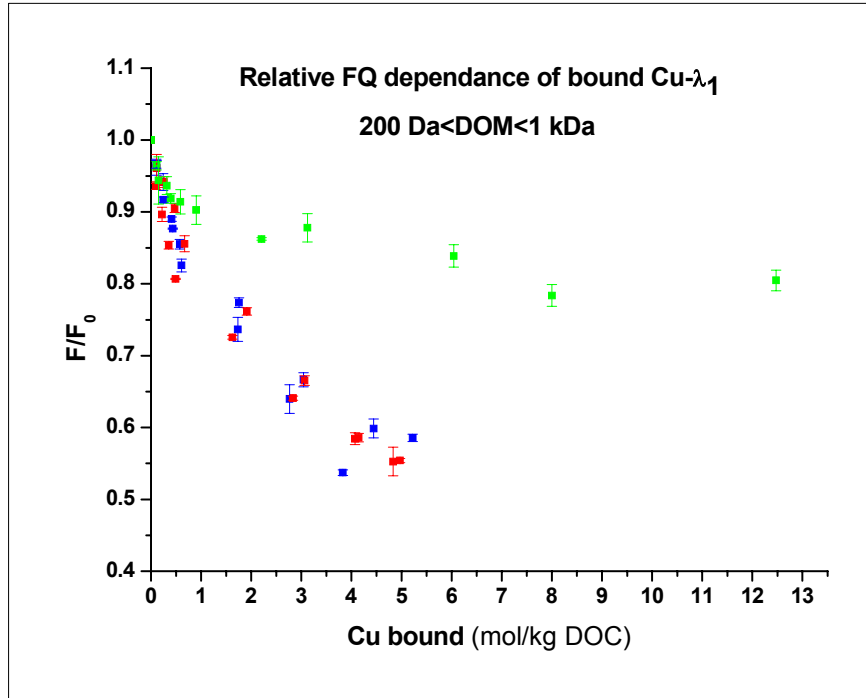
איור 4.13 א': הא"מ במקטע הגדול מ- 1 kDa



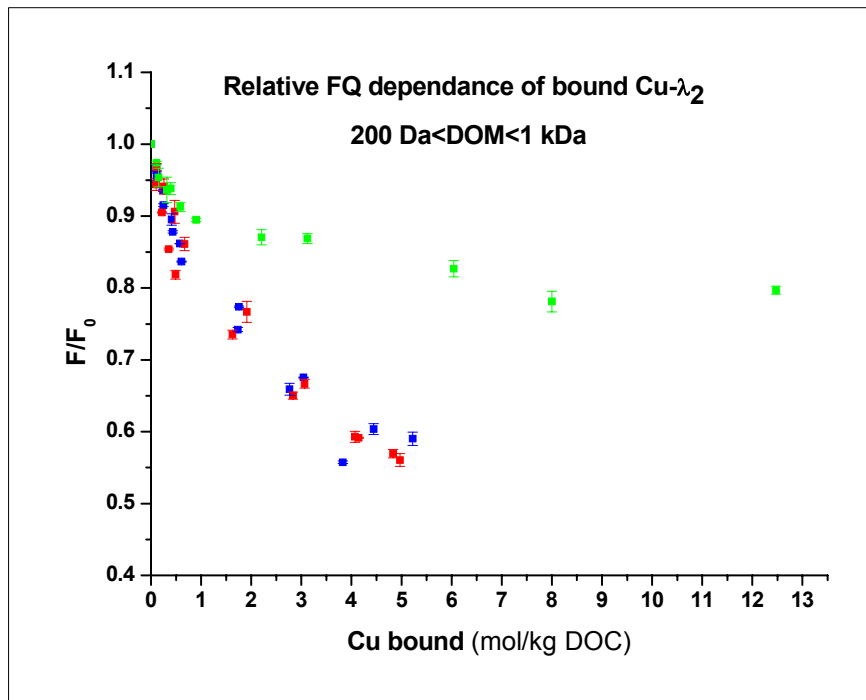
נקז שפירים
נקז קולחים
מי קולחים



איור 4.13 ב': הא"מ במקטע הגודל $200 \text{ Da} < \text{DOM} < 1 \text{ kDa}$



- נקז שפירים
- נקז קולחים
- מי קולחים



5. סיכום ומסקנות:

ליזימטרים שבהם ניטעו עצי איקליפטוס הושקו במי קולחים שניוניים או במים שפירים. ההשקיה הייתה גירעונית ושטיפת הליזימטרים בוצעה פעם אחת בסוף העונה, כך שמי ההשקיה שהו בחתך הקרקע במשך כ-5 חודשים. שהיית מי ההשקיה בקרקע אפשרה הצטברות של החומר האורגני ממי ההשקיה, משורשי העצים ומהקרקע עצמה, וכן את פירוק ע"י מיקרואורגניזם בקרקע. לאחר שטיפת הקרקע התקבלו מי-נקז משני סוגי ההשקיות שנלקחו להמשך אנליזה מעבדתית. בנוסף למי-הנקז, נדגמו גם מי הקולחים השניוניים עצמם.

בהשקיה גירעונית לא נמצא שוני בריכוז הפא"מ במי-הנקז משטיפת הקרקע בין השקיה במי קולחים לבין השקיה במים שפירים (ראה גם Fine et al., 2002).

מי הקולחים הכילו אחוז גבוה יותר של פא"מ קטן מולקולרית ($< 1 \text{ kDa}$), בהשוואה למי-הנקז משני סוגי ההשקיות. התפלגות החומר האורגני ביו מקטעי הגודל הייתה דומה בשני סוגי מי-הנקז.

ריכוז החומרים הארומטיים בפא"מ ($< 0.45 \mu\text{m}$) של מי הקולחים עצמם היה נמוך בהשוואה לפא"מ של שני סוגי מי-הנקז. הפא"מ של מי-הנקז מייצג פא"מ מקרקע שהנו עשיר יותר בחומרים ארומטיים המתקבלים לאחר פירוק מיקרוביאלי של חומר אורגני צמחי בלתי מיוצב.

תוצאות האנליזה של הפא"מ הגדול מ- 1 kDa ב- $^1\text{H-NMR}$ הראו כי במי הקולחים הוא יותר אליפטי, ומכיל ריכוז גבוה יותר של מימנים ליד קבוצות מושכות אלקטרונים (כגון קשר כפול, קרבוניל, קרבוקסיל וטבעת ארומטית) ומימנים ליד פחמן הקשור לחמצן (כגון אתר, אסטר או כוהל), בהשוואה לפא"מ של מי-הנקז (הן מהשקיה במי קולחים והן מהשקיה במים שפירים). אישור לכך שפא"מ במקטע גודל זה ממי הקולחים הוא יותר אליפטי מפא"מ משני סוגי מי-הנקז, נמצא גם עפ"י התוצאות שהתקבלו מאנליזת FTIR.

אנליזת $^1\text{H-NMR}$ של פא"מ במקטע הגודל $< 1 \text{ kDa}$ פא"מ $< 200 \text{ Da}$ לא הראתה הבדלים בין מי קולחים לבין שני סוגי מי-הנקז. בהשוואה בין שני מקטעי הפא"מ נמצא כי במי הקולחים הפא"מ הקטן מולקולרית היה פחות אליפטי ואילו במי-הנקז הוא היה יותר אליפטי. בניגוד לכך, אנליזת ה-FTIR רמזה כי פא"מ ממי-הנקז במקטע הגודל הקטן הוא פחות אליפטי ויותר ארומטי, ופא"מ במי הקולחים במקטע הגודל הקטן הוא יותר אליפטי, ו/או מכיל יותר קבוצות קרבוקסיליות, כוהליות או

פנוליות. עפ"י אנליזת ה-FTIR נמצא גם שחא"מ במקטע הגודל הקטן הוא יותר מחומצן מחא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa, ומכיל יותר קבוצות של כוהל, פנול, אסטר, אתר ופוליסוכרים.

המפות הפלואורסצנטיות התלת ממדיות של חא"מ בשני מקטעי הגודל (חא"מ <1 kDa, 1 kDa <חא"מ <200 Da) הראו שני פיקים מרכזיים (פיק A ופיק B המציינים חומרים הומיים, דמויי חומצות פולביות/הומיות). שני הפיקים הנ"ל הופיעו בכל המדגמים, אם כי מיקומם השתנה בהתאם לסוג החא"מ (מקטע הגודל וסוג המים). במדגמי חא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa, אורכי הגל לפליטה של פיקים A ו-B ירדו בסדר הבא: נקז שפירים < נקז קולחים < מי קולחים. הסטה של מיקום הפיק לאורכי גל ארוכים יותר של פליטה מיוחסת למספר רב יותר של טבעות ארומטיות מצומדות, ו/או עלייה במספר הקבוצות הפונקציונליות (כגון קרבוקסיל, פנול וניטר) הקשורות למבנים ארומטיים (Senesi, 1990; Ferrari and Mingazzini, 1995; Komada et al., 2002). לפיכך ניתן להסיק כי החא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa בנקז מהשקיה במים שפירים היה בעל התכולה הגבוהה ביותר באופן יחסי של טבעות ארומטיות מצומדות ו/או של קבוצות פונקציונליות הקשורות למבנים ארומטיים, וכי מקטע החא"מ הזה במי הקולחים היה בעל התכולה הנמוכה ביותר של מבנים אלה.

עוצמת הפליטה הפלואורסצנטית של פיקים A ו-B במקטע הגדול מ-1 kDa ירדה בסדר הבא: נקז קולחים < מי קולחים < נקז שפירים. תכונה זו נמצאה גם בספקטרום הפליטה של דוגמאות החא"מ.

מכיוון שהעוצמה נמצאת ביחס ישר לריכוז החומרים הפלואורסצנטית, ניתן היה ללמוד מכך שבמי-נקז שפירים, למרות ריכוז גבוה יותר של טבעות ארומטיות מצומדות ו/או של קבוצות פונקציונליות הקשורות למבנים ארומטיים, ביחס למי הקולחים ולמי-הנקז שהתקבלו לאחר השקיה במי הקולחים, ישנו ריכוז כללי נמוך של מבנים ארומטיים המשפיעים על עוצמת הפלואורסצנטיה.

בדוגמאות חא"מ במקטע הגודל <1 kDa <חא"מ <200 Da לא היו הבדלים במיקום הפיקים המרכזיים לעיל בין שני סוגי מי-הנקז, אולם בחא"מ של ממי הקולחים העירור ליצירת פיק A היה באורכי גל קצרים יותר והפליטה של פיק B הייתה באורכי גל קצרים יותר מאלו של החא"מ במי הקולחים. מכך ניתן היה להבין כי גם במקטע הגודל הקטן, חא"מ ממי הקולחים שונה בהרכבו מחא"מ במי-הנקז וכי הוא מכיל פחות טבעות ארומטיות מצומדות ו/או קבוצות פונקציונליות הקשורות למבנים ארומטיים.

בשני מקטעי הגודל של החא"מ ממי קולחים זוהה פיק ברור נוסף (פיק C), שייצג חומרים דמויי חלבונים (ככל הנראה תוצרי פירוק מיקרוביאליים). בנוסף לכך זוהה גם פיק נוסף (כתף), המאפיין חלבונים ארומטים שגם הם ככל הנראה תוצרי פירוק מיקרוביאלי. שני הפיקים הנ"ל לא זוהו במי-נקז מהשקיה במי קולחים והמסקנה המתבקשת היא שאלו הן "טביעות אצבע" של חומרים המצויים במי הקולחים, אשר עוברים פירוק בזמן השהות שלהם בקרקע. המפות הפלואורסצנטיות, כמו גם ספקטרום הפליטה, הראו כי לאחר הוספת נחושת (pCu 3.5) חלה ירידה בעוצמת הפיקים הפלואורסצנטיים אך מיקומם כמעט לא השתנה. ניתן להסיק מכך שהקומפלקס הנוצר בין החא"מ לבין הנחושת אינו פלואורסצנטי. אתרים בחא"מ שהיו פלואורסצנטיים לפני הוספת הנחושת, איבדו תכונה זו לאחר הוספתה.

קשירת נחושת לחא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa של מי הקולחים הייתה נמוכה בהשוואה לקשירתה בשני הסוגים של מי-הנקז. הדבר חזר על עצמו גם אחרי הומוניזציה בנתרן של מקטע חא"מ זה. להערכתנו, קבוצות קושרות נחושת (כגון קבוצות קרבוקסיליות) הקשורות לשייר אורגני אליפטי, וריכוז נמוך של קבוצות פנוליות בחא"מ ממי הקולחים, הן הגורמות לירידה באפיניות של חא"מ ממי הקולחים לנחושת.

לפני הומוניזציה, חא"מ מנקז שפירים קשר יותר נחושת מאשר חא"מ מנקז קולחים. ניתן להסביר את הממצא הזה על סמך הנתונים שהתקבלו מהמפות הפלואורסצנטיות, שיכלו להעיד כי החא"מ מנקז שפירים הוא בעל מבנה ארומטי מצומד יותר המכיל בתוכו ריכוז גבוה יחסית של קבוצות בעלות אפיניות גבוהה לנחושת. מבנים ארומטים מצומדים הקשורים לקבוצות קושרות נחושת (קבוצות קרבוקסיליות או פנוליות), מגדילים את האפיניות לנחושת (או מתכות אחרות), עקב הייצוב של המטען השלילי במערכת.

מטרת ההומוניזציה בנתרן של החא"מ במקטע הגדול מ-1 kDa הייתה להחליף מתכות הקשורות לחא"מ בנתרן, ולגרום לפריסה מרבית של מרכיבי החא"מ. עם זאת, ההרוויה בנתרן של החא"מ של שלושת סוגי הנוזלים דווקא הקטינה את קשירת הנחושת בהשוואה לקשירה שהייתה לפני ההרוויה. הקשירה הנמוכה של הנחושת לאחר ההומוניזציה עשויה להיות קשורה לאיבוד פא"מ בתהליך (איבוד של 29%-3). הסבר נוסף אפשרי הוא שהייתה התפרדות של מרכיבי החא"מ ליחידות שקשירתן קטנה יותר, כגון הריסה של ליגנדים פולידינטיים והופעת ליגנדים מונודינטיים במקומם.

כאמור, קשירת הנחושת ע"י החא"מ גרמה לירידה בעוצמת הפלואורסצנטיה, שנבעה מהיווצרות קומפלקס חא"מ-נחושת שאינו פלואורסצנטי. הירידה בעוצמת הפלואורסצנטיה הייתה תלולה ומשמעותית בחא"מ של שני סוגי מי-הנקז, בעוד

שבחא"מ של מי הקולחים הירידה הייתה מתונה וקטנה הרבה יותר. מכך ניתן להסיק שהחא"מ במי הקולחים קשר נחושת באתרים שונים מאלה בהם היא נקשרה לחא"מ של מי-הנקז משני הסוגים. בחא"מ ממי הקולחים, הנחושת נקשרה ככל הנראה לאתרים שאינם פלואורסצנטים, או לאתרים שאינם קרובים לסביבה פלואורסצנטית, ולא הייתה לה כמעט השפעה על עוצמת הפלואורסצנטיה של החא"מ. בחא"מ משני סוגי מי-הנקז, הנחושת נקשרה בעיקר באתרים פלואורסצנטים, או באתרים הקרובים לסביבה פלואורסצנטית, ולכן הייתה בהם ירידה חדה ומשמעותית בעוצמת הפלואורסצנטיה בתגובה לקשירת נחושת.

בעבודה זו הראנו כי צבירת חא"מ בקרקע במהלך השקיה גירעונית של עצי איקליפטוס במי קולחים שניוניים, לא שינתה את אופיו של החא"מ בקרקע בהשוואה להשקיה גירעונית במים שפירים. גם כמות הנחושת היכולה להיקשר לחא"מ לא השתנתה במידה ניכרת, ואולי אף הייתה קטנה בהשוואה להשקיה במים שפירים (כפי שהיה המצב במקטע הגדול מ- 1 kDa). עם זאת, ההשקיה הגירעונית גרמה להצטברות משמעותית של חא"מ בחתך הקרקע, והעלתה את סך כל הכמות של הנחושת (ומתכות מעבר אחרות) שיכולה הייתה להיקשר אליו ולהיות מנוידת בחתך הקרקע באמצעותו. אופיו של החא"מ במי-הנקז שהופקו לאחר השקיה במים שפירים היה דומה בעיקרו לזה של מי-הנקז שהופקו לאחר השקיה במי קולחים. לכן ניתן להניח שתהליכים שונים המתרחשים בקרקע, בחומר האורגני שמקורו במי הקולחים ובחומר האורגני שמקורו בשורשי העץ, הם הגורם העיקרי המשפיע על אופי החא"מ בעוד שלחומר האורגני שהוסף עם מי הקולחים הייתה השפעה איכותית וכמותית קטנה.

החא"מ בעיקרו הוא קטן מולקולרית ונחשב להידרופילי מכיוון שהוא טעון שלילית, ולכן קשירתו למתכות כבדות (נחושת כמתכת מודל) עשויה לגרום לזירוז התנועה של מתכות אלה בקרקע וחלחולן למי התהום. יחד עם זאת, כאמור, לא נמצאו הבדלים משמעותיים בין החא"מ שהופק לאחר השקיה במים שפירים לבין זה שהופק לאחר השקיה במי קולחים.

לכן ניתן לומר שככל הנראה השקיה במי קולחים אינה גורמת לזירוז התנועה של המתכות הכבדות בקרקע ואופיו של החא"מ מושפע בעיקר מתהליכים המתרחשים בקרקע, ופחות מהרכב מי ההשקיה.

6. רשימת מקורות:

- דו"ח ועדת הלפרין, 2002. עקרונות למתן היתרים להשקיה בקולחים. מדינת ישראל, משרד הבריאות, שירותי בריאות הציבור, המחלקה לבריאות הסביבה.
- הלפרין, ר., אהרוני, א., 2003. ניטור מפעל קו השלישי- עיבוד, ניתוח וסיכום ממצאים. הוצאת מקורות.
- הס אמיר, 2002. התפלגות כימית של מתכות כבדות בקרקעות מטופלות בבוצת שפכים. האוניברסיטה העברית בירושלים, הפקולטה לחקלאות רחובות.
- Akagi, J., and Zsolnay, A., 2005. Relationships between DOM's quality and its interaction with copper. *Geophysical Research Abstracts*, Vol. 7, No. EGU05-A-01588
- Amon, R.M.W., Fitznar, H-P., and Benner, R., 2001. Linkages among the bioreactivity, chemical composition, and diagenetic state of marine dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 46, pp. 287–297
- Asano, T., 2002. Water from (waste) water-the dependable water resource. *Wat. Sci. Technol.* 45, pp. 24-33
- Ashworth, D.J., and Alloway, B.J., 2004. Soil mobility of sewage sludge-derived dissolved organic matter, copper, nickel and zinc. *Environmental Pollution* 127, pp. 137-144
- Baker, A., and Genty, D., 1999. Fluorescence wavelength and intensity variations of cave waters. *Jou. Hydrology* 217, pp. 19–34
- Baker, A., and 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
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Waters, A.G., Peng, X., Vassallo, A.M., and Wilson, A.M., 1992. Aspects of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state ¹³C NMR spectroscopy. *Biogeochemistry* 16, pp. 1-42
- Barber, L.B., Leenheer, J.A., Noyes, T.I., and Stiles, E.A., 2001. Nature and transformation of dissolved organic matter in treatment wetlands. *Environ. Sci. Technol.* 35, pp. 4805-4816
- Bolan, N.S., Adriano D.C., and De-la-Luz, M., 2004. Dynamics and environmental significance of dissolved organic matter in soil. *SuperSoil 2004: 3rd Australian New Zealand Soils Conference*, University of Sydney, Australia, pp. 5-9
- Boissier, J.M., and Fontvieille, D., 1993. Biodegradable dissolved organic carbon in seepage waters from two forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 25, pp. 1257-1261
- Buffle, J., Gretel, F-L., and Haerdi, W., 1977. Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes. *Anal. Chem.* 49, pp. 216-222
- Businelli, M., Altieri, R., Giusquiani, P.L., and 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., 1992. Synchronous fluorescence spectra of metal-fulvic acid complexes. *Environ. Sci. Technol.*, 26, pp. 1133-1136

- Cabaniss, S.E., and 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., and Shuman, M.S., 1988. Fluorescence quenching measurements of copper-fulvic acid binding. *Anal. Chem.* 60, pp. 2418-2421
- Caille, N., Tiffreau, C., Leyval, C., and Morel, J.L., 2003. Solubility of metals in an anoxic sediment during prolonged aeration. *Sci. Tot. Environ.* 301, pp. 239-250
- Cancès, B., Ponthieu, M., Castrec-Rouelle, M., Aubry, E., and Benedetti, M.F., 2003. Metal ions speciation in a soil and its solution: experimental data and model results. *Geoderma* 113, pp. 341-355
- Cao, J., Lan, K.C., Dawson, R.W., and Tao, S., 2004. The effect of pH, ion strength and reactant content on the complexation of Cu^{2+} by various natural organic ligands from water and soil in Hong Kong. *Chemosphere* 54, pp. 507-514
- Cartel, C.W., and Suffet, I.H., 1982. Binding of DDT to dissolved humic materials. *Environ. Sci. Technol.* 16, pp. 735-740
- Chakrabarti, C., 1995. Residual effects of long-term land application of domestic wastewater. *Env. Inter.* 21, pp. 333-339
- Chantigny, M.H., 2003. Dissolved and water-extractable organic matter in soils: a review on the influence of land use and management practices. *Geoderma* 113, pp. 357-380
- Chapman, P. J., B. Reynolds, and H. S. Wheeler. 1995. The seasonal variation in soil water acid neutralizing capacity in peaty podzols in mid- Wales. *Water Air Soil Pollut.* 85, pp. 1089-1094
- Chefetz, B., Hadar, Y., and 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, J., LeBoeuf, E.J., Dai, S., and Gu, B., 2003. Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 50, pp. 639-647
- Chen, W., 2002. Fluorescence properties of effluent organic matter and role of mineral adsorption in soil aquifer treatment. Arizona state university.
- Chen, W.H., and Wangersky, P.J., 1993. A high-temperature catalytic-oxidation method for the determination of marine dissolved organic-carbon and its comparison with the uv photooxidation method. *Marine Chemistry* 42, pp. 95-106
- 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
- Cheng, T., De Schamphelaere, K., Lofts, S., Janssen, C., and Allen, H.E., 2005. Measurement and computation of zinc binding to natural dissolved organic matter in European surface waters. *Analytic Chimica Acta* 542, pp. 230-239
- Chin, Y.P., Aiken, G., and O'Loughlin, E., 1994. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 28, pp. 1853-1858
- Chiou, C.T., Malcolm, R.L., Brinton, T.I., and Kille, D.E., 1986. Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. *Environ. Sci. Technol.* 20, pp. 502-508

- Christl, I., and Kretzschmar, R., 2001. Interaction of copper and fulvic acid at the hematite–water interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, pp. 3435-3442
- Cilenti, A., Provenzano, M.R., and Senesi, N., 2005. Characterization of dissolved organic matter from saline soils by fluorescence spectroscopy. *Environ Chem Lett* 3, pp. 53-56
- Coale, K.H., and Bruland, K.W., 1988. Copper complexation in the northeast pacific. *Limnol. Oceanogr.* 33, pp. 1084-1101
- Coble, P.G., 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51, pp. 325-246
- Dawson, H.J., Ugolini, F.C., Hrutford, B.F., and Zachara, J., 1978. Role of soluble organics in the soil processes of a podzol, Central Cascades, Washington. *Soil Sci.* 126, pp. 290-296
- Darmody, R.G., Foss, J.E., Mcintoch, M., and Wolf, D.C., 1983. Municipal sewage sludge compost-amended soils: Some spatiotemporal treatment effects. *J. Environ. Qual.* 12, pp. 231-236
- de Wit, J.C.M., van Riemsdijk, W.H., and Koopal, L.K., 1993a. Proton binding to humic substances. 1. Electrostatic effects. *Environ. Sci. Technol.* 27, pp. 2005-2014
- de Wit, J.C.M., van Riemsdijk, W.H., and Koopal, L.K., 1993b. Proton binding to humic substances. 2. Chemical heterogeneity and adsorption models. *Environ. Sci. Technol.* 27, pp. 2015-2022
- Dill, K.A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K.M., Yee, D.P., Thomas, P.D., and Chen, H.S., 1995. Principles of protein folding -A perspective from simple exact models. *Protein Science* 4, pp. 561-602
- Duarte, R.M.B.O., Santos, E.B.H., and 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., and Guillon, E., 2005. Fate of the metal-binding soluble organic matter throughout a soil profile. *Soil Science* 170, pp. 707-715
- Easthouse, K.B., Mulder, J., Christophersen, N., and Seip, H.M., 1992. Dissolved organic carbon fractions in soil and stream water during variable hydrological conditions at Birkenes, Southern Norway. *Water Resour. Res.* 28, pp. 1585-1596
- Esteves da Silva, J., Machado, A., Oliveira, C., and Pinto, M., 1998. Fluorescence quenching of anthropogenic fulvic acids by Cu(II), Fe(III) and UO_2^{2-} . *Talanta* 45, pp. 1155-1165
- Evans, L.J., 1989. Chemistry of metal retention by soils. *Environ. Sci. Technol.* 23, pp. 1046-1056
- Ewald, M., Berger, P., and Visser, S.A., 1988. UV-visible absorption and fluorescence properties of fulvic acids of microbial origin as functions of their molecular weights. *Geoderma* 43, pp. 11-20
- Feigin, A., Ravina, I., and Shalhevet, J., 1991. Irrigation with treated sewage effluent. Management for environmental protection. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Ferrari G.M., and Mingazzini M. 1995. Synchronous fluorescence spectra of dissolved organic matter (DOM) of algal origin in marine coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 125, pp. 305-315
- Fiedler, S., and 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., and 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., and 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
- Fotovat, A., and R. Naidu. 1998. Changes in composition of soil aqueous phase influence chemistry of indigenous heavy metals in alkaline sodic and acidic soils. *Geoderma* 84, pp. 213-234
- Friedel, J.K., Langer, T., Siebe, C., and Stahr, K., 2000. Effects of long-term waste water irrigation on soil organic matter, soil microbial biomass and its activities in central Mexico. *Biol. Fertil. Soils*. 31, pp. 414-421
- Gauthier, T.D., Shane, E.C., Guerin, W.F., Seltz, W.R., and Grant, C.L., 1986. Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environ. Sci. Technol.* 20, pp. 1162-1166
- Gélinas, Y., Baldock, J.A., and Hedges, J.I., 2001. Demineralization of marine and freshwater sediments for CP/MAS ¹³C NMR analysis. *Org. Geochem.* 32, pp. 677-693
- Gerritse, R.G., Vriesema, R., Dalenberg, J.w., and de Roos, H.P., 1982. Effect of sewage sludge on trace element mobility on soils. *J. Environ. Qual.* 11, pp. 359-364
- Gigliotti, G., Giusquiani, P. L., Businelli, D., and Macchioni, A., 1997. Composition of dissolved organic matter in a soil amended with municipal waste compost. *Soil science* 162, pp. 919-926
- Gigliotti, G., Kaiser, K., Guggenberger, G., and Haumaier, L., 2002. Differences in the chemical composition of dissolved organic matter from waste material of different sources. *Biol Fertil Soils* 36, pp. 321-329
- Goody, D.C., Shand, P., Kinniburgh, D.G., and Van-Riemsdijk, W.H., 1995. Field-based partition coefficients for trace elements in soil solutions. *Eur. J. Soil Sci.* 46, pp. 265-285
- Graber, E.R., Dror, I., Bercovich, F.C., and Rosner, M., 2001. Enhanced transport of pesticides in a field trial with treated sewage sludge. *Chemosphere* 44, pp. 805-811
- Graber, E.R., Gerstl, Z., Fischer, E., and Mingelgrin, U., 1995. Enhanced transport of atrazine under irrigation with effluent. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59, pp. 1513-1519
- Gu, B., Schmitt, J., Chen, Z., Liang, L., and McCarthy, J.F., 1994. Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: mechanisms and models. *Environ. Sci. Technol.* 28, pp. 38-46
- Guggenberger, G., Glaser, B., and Zech, W., 1994. Heavy metal binding by hydrophobic and hydrophilic dissolved organic carbon fractions in a spodosol A and B horizon. *Water, Air, & Soil Pollution* 72, pp. 111-127
- Guo, M., and Chorover, J., 2003. Transport and fractionation of dissolved organic matter in soil columns. *Soil Science* 168, pp. 108-118
- Hall, K.J., and Lee, F.G., 1974. Molecular size and spectral characterization of organic matter in a meromictic lake. *Water Res.* 8, pp. 239-251
- Han, N., and 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., and 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

Herbert, B.E., 1993. Pyrene Sorption by Water-Soluble Organic Carbon. *Environ. Sci. Technol.* 27, pp. 398-403

Hoffmann, C., Marschner, B., and Renger, M., 1998. Influence of DOM-quality, DOM-quantity and water regime on the transport of selected heavy metals. *Phys. Chem. Earth* 23, pp. 205-209

Hsu, J. H., and Lo, S. L., 1999. Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformations during composting of pig manure. *Environmental Pollution* 104, pp. 189-196

Huang, Y., Li, B.C., Bryant, C., Bol, R., and Eglinton, G., 1999. Radiocarbon dating of aliphatic hydrocarbons: a new approach for dating passive-fraction carbon in soil horizons. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, pp. 1181-1187

Huibers, F.P., and Van Lier, J.B., 2005. Use of wastewater in agriculture: the water chain approach. *Irrig. and Drain.* 54, pp. S3-S9

Ilani, T., Schulz, E., and Chefetz, B., 2005. Interactions of organic compounds with wastewater dissolved organic matter: Role of hydrophobic fractions. *J. Environ. Qual.* 35, pp. 552-562

Imai A., Fukushima, T., Matsushige, K., and Kim, Y-H., 2001. Fractionation and characterization of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, its flowing rivers and other organic matter sources. *Water* 35, pp. 4019-4028

Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y-H., and Chio, K., 2002. Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants. *Water Research* 36, pp. 859-870

Jardine, P.M., Wilson, G.V., McCarthy, J.F., Luxmoore, R.J., Taylor, D.L., and Zelany, L.W., 1990. Hydrogeochemical processes controlling the transport of dissolved organic carbon through a forested hill-slope. *J. Environ. Contam. Hydrol.* 6, pp. 3-19

Jozefaciuk, G., Sokolowska, Z., Hajnos, M., Hoffmann, C., and Renger, M., 1996. Large effects of leaching of DOC on water adsorption properties of a sandy soil. *Geoderma* 74, pp. 125-137

Kaiser, K., Guggenberger, G., Haumaier, L., and Zech, W., 2001. Seasonal variations in the chemical composition of dissolved organic matter in organic forest floor layer leachates of old-growth scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and european beech (*Fagus sylvatica* L.) stands in northeastern Bavaria, Germany. *Biogeochemistry* 55, pp. 103-143

Kaiser, K., and Kaupenjohann, M., 1998. Influence of the soil solution composition on retention and release sulfate in acid forest soils. *Water Air Soil Pollut.* 101, pp. 363-376

Kalbitz, K., Schmerwitz, J., Schwesig, D., and Matzner, E., 2003a. Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma* 113, pp. 273-291

Kalbitz, K., Schwesig, D., Schmerwitz, J., Kaiser, K., Haumaier, L., Glaser, B., Ellerbrock, R., and Leinweber, P., 2003b. Changes in properties of soil-derived dissolved organic matter induced by biodegradation. *Soil Biol. and biochem.* 35, pp. 1129-1142

Kalbitz, K., Solinger, S., Park, J-H., Michalzik, B., and Matzner, E., 2000. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Science* 165, pp. 277-304

- Kalbitz, K., and Wennrich, R., 1998 Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland soils and its dependence on dissolved organic matter. *Sci. Tot. Environ.* 209, pp. 27-39
- Karthikeyan, K.G., and Elliott, H.A., 1999. Surface complexation modeling of copper sorption by hydrous oxides of iron and aluminum. *Journal of Colloid and Interface Science* 220, pp. 88-95
- Kaschl, A., Römheld, V., and Chen, Y., 2002a. The influence of soluble organic matter from municipal solid waste compost on trace metal leaching in calcareous soils. *Sci. Tot. Environ.* 291, pp. 45-57
- Kaschl, A., Römheld, V., and Chen, Y., 2002b. Cadmium binding by fractions of dissolved organic matter and humic substances from municipal solid waste compost. *J. Environ. Qual.* 31, pp. 1885-1892
- Keren, R., and Sparks, D.L., 1995. The Role of Edge Surfaces in Flocculation of 2:1 Clay Minerals. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59, pp. 430-435
- 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
- Kinniburgh, D.G., van Riemsdijk, W.H., Koopal, L.K., Borkovec, M., Benedetti, M.F., and Avena, M.J., 1999. Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 151, pp. 147-166
- Komada T., Schofield O.M.E., and Reimers C.E., 2002. Fluorescence characteristics of organic matter released from coastal sediments during resuspension. *Mar. Chem.* 79, pp. 81-97
- Kunz, A., and Jardim, W.F., 2000. Complexation and adsorption of copper in raw sewage. *Wat. Res.* 34, pp. 2061-2068
- Lakowicz, J.R., 1983. Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York. Chapter 9, pp. 260-264
- Lee, G., Bigham, J.M., and Faure, G., 2002. Removal of trace metals by coprecipitation with Fe, Al and Mn from natural waters contaminated with acid mine drainage in the Ducktown Mining District, Tennessee. *Applied Geochemistry* 17, pp. 569-581
- Leenheer, J. A., 1981. Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. *Environmental science and technology* 15, pp. 578-587
- Leenheer, J.A., and Croué, J.-P., 2003. Characterizing dissolved aquatic organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 37, pp. 19A-26A
- Liechty, H. O., E. Kuuseoks, and G. D. Mroz. 1995. Dissolved organic carbon in northern hardwood stands with differing acidic inputs and temperature regimes. *J. Environ. Qual.* 24, pp. 927-933
- Lin, C-F., Lee, D-Y., Chen, W-T., and Lo, K.S., 1995. Fractionation of fulvic acids: characteristics and complexation with copper. *Environmental Pollution* 87, pp. 181-187
- Linnik, P.M., 2003. Complexation as the most important factor in the fate and transport of heavy metals in the Dnieper water bodies. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, pp. 405-412
- Lu, J., Chang, A.C., and Wu, L., March 2005. Distinguishing sources of groundwater nitrate by ¹H-NMR of dissolved organic matter. *Water Resources Center archives*, Vol. 11, No. 2

- Lu, Y., and Allen, H.E., 2002. Characterization of copper complexation with natural dissolved organic matter (DOM)—link to acidic moieties of DOM and competition by Ca and Mg. *Water Research* 36, pp. 5083-5101
- Lu, X., and Jaffe, R., 2001. Interaction between Hg(II) and natural dissolved organic matter: a fluorescence spectroscopy based study. *Wat. Res.* 35, pp. 1793-1803
- Lucia, M., Compos, A.M., and Van den Berg, C.M.G. 1994. Determination of copper complexation in sea water by cathodic stripping voltammetry and ligand competition with salicylaldoxime. *Anal. Chim. Acta.* 284, pp. 481-496
- Lundquist, E. J., Jackson, L.E., and Scow, K.M., 1999. Wet-dry cycles affect dissolved organic carbon in two California agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 31, pp. 1031-1038
- Ma, H., Allen, H., and Yin, Y., 2001. Characterization of isolate fractions of dissolved organic matter from natural waters and wastewater effluent. *Water Res.* 35, pp. 985-996
- Magee, B.R., Lion, L.W., and Lemley, A.T., 1991. Transport of dissolved organic macromolecules and their effect on the transport of phenanthrene in porous media. *Environ. Sci. Technol.* 25, pp. 323-331
- Manka, J., Rebhum, M., Mandelbaum, A., and Bortinger, A., 1974. Characterization of Organics in Secondary Effluents. *Environ. Sci. Technol.* 8, pp. 1017-1020
- Marschner, B., 1999. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 162, pp. 1-14
- Marschner, B., and Bredow, A., 2002. Temperature effect on release and ecologically relevant properties of dissolved organic carbon in sterilized and biologically active soil samples. *Soil Biol. and Biochem.* 34, pp. 459-466
- Marschner, B., and Kalbitz, K., 2003. Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma* 113, pp. 211-235
- Mayer, L.M., Schick, L.L., and Loder, T.C., 1999. Dissolved protein fluorescence in two Maine estuaries. *Marine Chemistry* 64, pp. 171-179
- McBride, M.B., Richards, B.K., Steenhuis, T., Russo, J.J., and Sauve, S., 1997. Mobility and solubility of toxic metals and nutrients in soil fifteen years after sludge application. *Soil Sci.* 162, pp. 487-500
- McDowell, W. H., and T. Wood. 1984. Soil processes control dissolved organic carbon concentration in stream water. *Soil Sci.* 137, pp. 23-32
- McKnight, D.M., Boyer, E.W., Westerhoff, P.K., Doran, P.T., Kulbe, T., and Andersen, D.T., 2001. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnol. Oceanogr.* 46, pp. 561-569
- Meili, M., 1992. Sources, concentrations and characteristics of organic matter in softwater lakes and streams of the Swedish forest region. *Hydrobiology* 229, pp. 23-41
- Meli, S., Maurizio, M., Belligno, A., Bufo, S.A., Mazzatura, A., and Scopa, A., 2002. Influence of irrigation with lagooned urban wastewater on chemical and microbial soil parameters in a citrus orchard under Mediterranean condition. *The Science of the Total Environment.* 285, pp. 69-77
- Michalzik, B., and Matzner, E., 1999. Fluxes and dynamics of dissolved organic nitrogen and carbon in a spruce (*Picea abies* Karst.) forest ecosystem. *Eur. J. Soil Sci.* 50, pp. 579-590

- Miller, L.A., and Bruland, K.W., 1997. Competitive equilibration techniques for determining transition metal speciation in natural waters: Evaluation using model data. *Analytica Chimica Acta* 343, pp. 161-181
- Mingelgrin, U., and Bigger, J.W., 1986. Copper species in aqueous sewage sludge extract. *Water Air Soil Pollut.* 28, pp. 351-359
- Monteir-Rivera, F., and Dumonceau, J., 2002. Fluorescence spectrometry for quantitative characterization of cobalt(II) complexation by Leonardite humic acid. *Anal Bioanal Chem* 374, pp. 1105-1112
- Moore, T.R., 1987. An assessment of a simple spectrophotometric method for the determination of dissolved organic carbon in freshwaters. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21, pp. 585-589
- Namour, P., and Müller, M.C., 1998. Fractionation of organic matter from wastewater treatment plants before and after a 21-day biodegradability test: a physical-chemical method for measurement of the refractory part of effluents. *Water Res.* 32, pp. 2224-2231
- Oliver, I.W., Hass, A., Merrington, G., Fine, P., and McLaughlin, M.J., 2005. Copper availability in seven israeli soils incubated with and without biosolids. *J. Environ. Qual.* 34, pp. 508-513
- Oste, L.A., Temminghoff, E.J.M., Lexmond, T.M., and Van Riemsdijk, W.H., 2002. Measuring and modeling zinc and cadmium binding by humic acid. *Anal. Chem.* 74, pp. 856-862
- Pandey, A.K., Pandey, S.D., and Misri, V., 2000. Stability constants of metal-humic acid complexes and its role in environmental detoxification. *Ecotox. Environ. Saf.* 47, pp. 195-200
- Parlanti, E., Wörz, K., Geoffroy, L., and Lamotte, M., 2000. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry* 31, pp. 1765-1781
- Perdue, E.M., and Parrish, R.S., 1987. Fitting multisite binding equilibria to statistical distribution models: turbo pascal program for Gaussian models. *Comput. Geosci.* 13, pp. 587-601
- Perdue, E.M., Reuter, J.H., and Parrish, R.S., 1984. A statistical model of proton binding by humus. *Geochim. Cosmochim. Acta* 48, pp. 1257-1263
- Peuravuori, J., and Pihlaja, K., 1998. Multimethod characterization of lake aquatic humic matter isolated with sorbing solid and tangential membrane filtration. *Analytica Chimica Acta* 364, pp. 203-221
- Pinney, M.L., Westerhoff, P.K., and Baker, L., 2000. Transformations in dissolved organic carbon through constructed wetlands. *Water Research* 34, pp. 1897-1911
- Plaza, C., Bronetti, G., Senesi, N., and Polo, A., 2006. Molecular and quantitative analysis of metal ion binding to humic acids from sewage sludge and sludge amended soils by fluorescence spectroscopy. *Environ. Sci. Technol* 40, pp. 917-923
- 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.
- Qin, F., Shan, X-Q., and Wei, B., 2004. Effects of low-molecular-weight organic acids and residence time on desorption of Cu, Cd, and Pb from soils. *Chemosphere* 57, pp. 253-263

- Ramirez-Fuentes, E., Lucho-Constantino, C., Escamilla-Silva, E., and Dendooven, L., 2002. Characteristics, and carbon and nitrogen dynamics in soil irrigated with wastewater for different lengths of time. *Bioresource Technology*. 85, pp. 179-187
- Raulund-Rasmussen, K., Borregaard, O.K., Hansen, H.C.B., and Olsson, M., 1998. Effect of natural soil solutes on weathering rates of soil minerals. *Eur. J. Soil Sci.* 49, pp. 397-406
- Rebhun, M., and Manka, J., 1971. Classification of Organics in Secondary Effluents. *Environ. Sci. Technol.* 5, pp. 606-609
- Reynolds, D.M., 2002. The differentiation of biodegradable and non-biodegradable dissolved organic matter in wastewaters using fluorescence spectroscopy. *J. Chem Technol Biotechnol* 77, pp. 965-972
- Reynolds, D.M., and Ahmad, S.R., 1995. The effect of metal ions on the fluorescence of sewage wastewater. *Water Res.* 29, pp. 2214-2216
- Rosenstock, B., Zwisler, W., and Simon, M., 2005. Bacterial Consumption of humic and non-humic low and high molecular weight DOM and the effect of solar irradiation on the turnover of labile DOM in the southern ocean. *Microbial Ecology* 50, pp. 90-101
- Rozan, T.F., and Benoit, G., 1999. Geochemical factors controlling free Cu ion concentrations in river water. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63, pp. 3311-3319
- Ryan, D.K., and Weber, J.H., 1982a. Copper (II) complexing capacities of natural waters by fluorescence quenching. *Environ. Sci. Technol.* 16, pp 866-872
- Ryan, D.K., and Weber, J.H., 1982b. Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. *Anal. Chem.* 54, pp. 986-990
- Saadi, I., Borisover, M., armon, R., and Laor, Y., 2006. Monitoring of effluent DOM biodegradation using fluorescence, UV and DOC measurements. *Chemosphere* 63, pp. 530-539
- Sauvé, S., McBride, M.B., and Hendershot, W.H., 1995. Ion selective electrode measurements of copper(II) activity in contaminated soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29, pp. 373-379
- Schnitzer, M., and Khan, S.U., 1978. Humic substances: chemistry and reactions. *Soil Organic Matter*, eds. Pp. 1-64. Elsevier Science, New York
- Senesi, N., 1990. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals: Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Anal. Chem. Acta* 232, pp. 77-106
- Senesi, N., Miano, T.M., Provenzano, M.R., and Brunetti, G., 1991. Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.* 152, pp. 259-271
- Shank, G.C., Skrabal, S.A., Whithead, R.F., Avery, G.B., and Kieber, R.J., 2004. River discharge of strong Cu-complexing ligands to south atlantic bight waters. *Marine Chemistry* 88, pp. 41-51
- Seol, Y., and Lee, L.S., 2000. Effect of Dissolved Organic Matter in Treated Effluents on Sorption of Atrazine and Prometryn by Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, pp. 1976-1983
- Sheikh, B., Jaques, R.S., and Cort, R.P., 1987. Reuse of tertiary municipal wastewater effluent for irrigation of raw-eaten food crops: a five year study. *Desalination* 67, pp. 245-254
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., and Morrill, T.C., 1991. Spectrometric identification of organic compounds, 5th Edition. John Wiley and Sons, Inc., USA.

- Smith, D.S., Bell, R.A., and Kramer, J.R., 2002. Metal speciation in natural waters with emphasis on reduced sulfur groups as strong metal binding sites. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 133 pp. 65-74
- Smith, D.S., Bell, R.A., Valliant, J., and Kramer, J.R., 2004. Determination of strong ligand sites in sewage effluent-impacted waters by competitive ligand titration with silver. *Environ. Sci. Technol* 38, pp. 2120-2125
- Smith, R.-K., 1994, *Handbook of Environmental Analysis*. Schnectady, New York, Genium Publishing
- Solomon, T.W.G., and Fryhle, G.B., 2004. *Organic Chemistry*, 8th Edition. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Stevenson, F.J., 1994. *Humus chemistry, genesis, composition, reactions*. Second ed. John Willey, New York
- Stevenson, F.J., and Chen, Y., 1991. Stability constants of copper(II)- humate complexes determined by modified potentiometric titration. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 55, pp. 1586-1591
- Temminghoff, E.J.M., Plette, A.C.C., Eck, R.V., and Van Riemsdijk, W.H., 2000. Determination of the chemical speciation of trace metals in aqueous systems by the wageningen donnan membrane technique. *Analytica Chimica Acta* 417, pp. 149-157
- Temminghoff, E.J.M., Van Der Zee, S.E.A.T.M., and De Haan, F.A.M., 1997. Copper mobility in a copper-contaminated sandy soil as affected by pH and solid and dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 31, pp. 1109-1115
- 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, pp. 3-48
- Tipping, E., and Hurley, M.A., 1988. A model of solid-solution interactions in acid organic soils based on the complexation properties of humic substances. *J. Soil Sci.* 39, pp. 505-519
- Tipping, E., and Hurley, M.A., 1992. A unifying model of cation binding by humic substances. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56, pp. 3627-3641
- Traina, S.J., Novak, J., and 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
- You, S.-J., Yin, Y., and Allen, H.E., 1999. Partitioning of organic matter in soils: Effects of pH and water/soil ratio. *Sci. Total Environ.* 227, pp. 155-160
- Van Hees, P.A.W., Lundström, U.S., and Giesler, R., 2000. Low molecular weight organic acids and their Al-complexes in soil solution—composition, distribution and seasonal variation in three podzolized soils. *Geoderma* 94, pp. 173-200
- van Leeuwen, H.P., and Jansen, S., 2005. Dynamic aspects of metal speciation by competitive ligand exchange-adsorptive stripping voltammetry (CLE-AdSV). *J. Electroanal. Chem.* 579, pp. 337-342
- Volk, C.J., Volk, C.B., and Kaplan, L.A., 1997. Chemical composition of biodegradable dissolved organic matter in streamwater. *Limnology and Oceanography* 42, pp. 39-44
- Vulkan, R., Mingelgrin, U., Ben-Asher, J., and Frenkel, H., 2002. Copper and zinc speciation in the solution of a soil-sludge mixture. *J. Environ. Qual.* 31, pp. 193-203
- Westerhoff, P., Chen, W., and Esparza, M., 2001. Fluorescence analysis of a standard fulvic acid and tertiary treated wastewater. *J. Environ. Qual.* 30, pp. 2037-2046

- Wiklander, L. 1975. The role of neutral salts in the ion exchange between acid precipitation and soil. *Geoderma* 14, pp. 95-105
- Wu, F., Midorikawa, T., and Tanoue, E., 2001. Fluorescence properties of organic ligands for copper(II) in Lake Biwa and its rivers. *Geochemical Journal*, 35, pp. 333-346
- Wu, Q., Apte, S.C., Batley, G.E., and Bowles, K.C., 1997. Determination of the mercury complexation capacity of natural waters by anodic stripping voltammetry. *Analytic Chimica Acta* 350, pp. 129-134
- Xue, H.B., and Sigg, L., 1993. Free cupric ion concentration and Cu(II) speciation in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 38, pp. 1200-1213
- Xue, H., and Sunda, W.G., 1997. Comparison of [Cu²⁺] measurements in lake water determined by ligand exchange and cathodic stripping voltammetry and by ion-selective electrode. *Environ. Sci. Technol.* 31, pp. 1902-1909
- Zabowski, D., and F. C. Ugolini. 1990. Lysimeter and centrifuge soil solution: Seasonal differences between methods. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54, pp. 1130-1135
- Zhou, L.X., and Wong, J.W.C., 2001. Effect of dissolved organic matter from sludge and sludge compost on soil copper sorption. *J. Environ. Qual.* 30, pp. 878-883
- Zsolnay, A., 2003. Dissolved organic matter: artefacts, definitions, and functions. *Geoderma* 113 pp. 187-209
- Zsolnay, A., Baigar, E., Jimenez, M., Steinweg, B., and Saccomandi, F., 1999. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38, pp. 45-50
- Zumstein J. and Buffle J. 1989. Circulation of pedogenic and aquagenic organic matter in a eutrophic lake. *Water Res.* 23, pp. 229-239

7. נספחים

נספח 1: תכולת מתכות בחא"מ, לאחר סינון בפילטר $0.45\mu\text{m}$

* EW- מי קולחים, TL- נקז מים שפירים, EL- נקז מי קולחים
IDL-Instrumental detection limits

Ca mg/L	Mg mg/L	K mg/L	B mg/L	Fe $\mu\text{g/L}$	Zn $\mu\text{g/L}$	Sr $\mu\text{g/L}$	Ni $\mu\text{g/L}$	Mo $\mu\text{g/L}$	Li $\mu\text{g/L}$	Co $\mu\text{g/L}$	Ba $\mu\text{g/L}$	שם הדוגמא*
71	28	35	0	121	188	657	24	<IDL	6	<IDL	42	EW-1
75	27	22	0	121	60	547	15	5	7	<IDL	45	EW-2
83	28	21	0	84	69	613	16	6	5	<IDL	43	EW-3
60	27	27	0	26	47	565	12	<IDL	10	<IDL	36	EW-4
683	493	283	1	201	485	4918	425	63	27	27	372	TL-1
496	295	183	1	62	228	3601	278	34	19	13	250	TL-2
183	480	141	1	102	107	5488	341	56	20	10	471	TL-3
330	495	302	2	32	134	3422	499	38	87	16	220	TL-4
491	252	85	1	456	107	3989	211	7	33	5	538	EL-1
227	888	510	2	148	229	5011	774	56	135	31	396	EL-2
365	477	273	2	68	295	3941	484	69	91	16	376	EL-3
437	387	320	1	80	462	4299	292	62	82	13	190	EL-4

נספח 2: אפיון בסיסי עבור דוגמאות החא"מ במקטעי הגודל השונים

1.1: חא"מ לאחר סינון על ממבראנה 1kDa

תרכיז- חא"מ <1 kDa, תסנין- חא"מ >1 kDa

SUVA	OD ₂₅₆	pH	EC mS/cm	DOC** mg/L	סוג הדוגמה	שם הדוגמה*
1.35	1.47	5.5	1.5	109	תרכיז	EW-1
nd	0.22	4.8	1.9	nd	תסנין	
1.07	0.96	6.1	2.0	89	תרכיז	EW-2
3.33	0.61	5.8	2.0	18	תסנין	
0.49	0.40	6.3	2.1	82	תרכיז	EW-3
0.98	0.14	5.4	2.1	14	תסנין	
1.41	0.54	4.4	1.7	38	תרכיז	EW-4
2.76	0.21	3.9	2.1	8	תסנין	
2.63	10.60	5.4	2.1	404	תרכיז	TL-1
2.41	2.50	4.1	39.0	104	תסנין	
1.60	13.50	6.0	2.0	845	תרכיז	TL-2
2.77	2.30	5.4	24.2	83	תסנין	
3.53	16.10	5.8	2.0	456	תרכיז	TL-3
2.89	2.30	5.6	26.2	80	תסנין	
3.88	45.10	7.3	2.5	1162	תרכיז	TL-4
2.29	2.80	6.7	30.4	122	תסנין	
2.87	22.20	6.9	2.2	775	תרכיז	EL-1
2.39	2.30	5.8	14.7	96	תסנין	
3.19	20.30	6.0	2.3	637	תרכיז	EL-2
2.66	3.30	5.4	49.6	124	תסנין	
3.46	24.40	5.6	1.9	705	תרכיז	EL-3
2.75	2.60	4.5	32.0	95	תסנין	
3.11	17.40	6.1	2.7	559	תרכיז	EL-4
2.59	1.80	5.5	22.2	70	תסנין	

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

** לא נמצא DIC בדוגמאות

nd- not detected

המשך סעיף 1.1: חא"מ לאחר סינון על ממבראנה 1kDa- ריכוזי מתכות

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*
87	25	35	1501	216	720	59	6	71	32	34	<IDL	81	תרכיז	EW-2
63	25	22	77	99	527	11	4	31	8	<IDL	<IDL	60	תסנין	
84	24	31	563	315	710	50	17	49	37	60	<IDL	45	תרכיז	EW-3
59	27	20	85	128	596	10	5	23	5	7	<IDL	45	תסנין	
56	24	25	130	51	525	39	5	16	17	<IDL	<IDL	34	תרכיז	EW-4
62	27	28	42	52	577	16	<IDL	15	6	<IDL	<IDL	37	תסנין	
56	42	53	331	205	535	175	780	23	39	11	21	37	תרכיז	TL-1
593	573	698	346	708	5200	437	18	46	25	8	31	301	תסנין	
116	50	46	796	296	785	205	75	141	111	9	39	13	תרכיז	TL-2
530	336	526	270	277	3679	262	16	249	22	10	17	140	תסנין	
97	44	29	507	80	752	186	152	9	74	14	24	66	תרכיז	TL-3
688	414	372	471	128	4926	274	15	26	18	7	11	369	תסנין	
128	96	81	10940	603	1136	836	33	214	191	15	63	31	תרכיז	TL-4
287	437	675	235	213	3032	390	31	277	21	4	19	134	תסנין	
65	58	35	4320	118	902	436	8	569	26	34	39	107	תרכיז	EL-1
198	288	256	479	58	3125	190	<IDL	1252	11	10	9	287	תסנין	
21	60	60	1972	178	604	364	45	28	105	10	36	47	תרכיז	EL-2
105	747	697	430	242	4269	619	30	118	38	5	32	275	תסנין	
54	67	81	439	374	921	275	43	14	117	16	39	34	תרכיז	EL-3
210	379	605	183	385	3883	253	45	31	18	8	18	123	תסנין	
55	19	21	899	257	526	76	6	47	30	27	4	52	תרכיז	EL-4
72	27	35	837	235	707	21	<IDL	66	6	5	<IDL	55	תסנין	

* EW- מי קולחים, TL- נקז מים שפירים, EL- נקז מי קולחים
IDL-Instrumental detection limits

1.2: הא"מ לאחר סינון בממבראנה 200 Da

תרכיז- <1 kDa הא"מ <200 Da, תסנין- הא"מ >200 Da

SUVA	OD ₂₅₆	pH	EC mS/cm	DOC** mg/L	סוג הדוגמה	שם הדוגמה*
1.35	0.34	6.2	1.1	25	תרכיז	EW-2
6.00	0.03	6.4	0.8	1	תסנין	
1.24	0.21	5.4	1.3	17	תרכיז	EW-4
1.58	0.03	5.8	0.5	2	תסנין	
1.99	1.59	6.2	2.3	80	תרכיז	TL-1
5.83	0.14	6.3	2.2	2	תסנין	
1.09	1.19	5.6	3.3	109	תרכיז	TL-2
1.50	0.03	6.4	1.2	2	תסנין	
2.94	1.81	6.0	1.6	62	תרכיז	TL-3
3.08	0.08	6.2	2.8	3	תסנין	
3.10	1.08	6.6	0.9	35	תרכיז	TL-4
2.37	0.09	6.7	2.7	4	תסנין	
2.64	1.47	7.0	1.9	56	תרכיז	EL-1
3.33	0.03	7.0	1.5	1	תסנין	
2.19	0.60	5.3	0.9	27	תרכיז	EL-3
3.33	0.10	5.4	2.7	3	תסנין	

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

** לא נמצא DIC בדוגמאות

המשך סעיף 1.2: חא"מ לאחר סינון על ממבראנה 200Da- ריכוזי מתכות

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*
73	32	6	40	163	615	16	6	37	<IDL	<IDL	<IDL	55	תרכיז	EW-2
20	7	10	4	21	177	<IDL	<IDL	9	<IDL	<IDL	<IDL	19	תסנין	
67	31	3	71	150	680	30	<IDL	22	13	7	5	<IDL	תרכיז	EW-4
11	4	<IDL	8	33	100	8	<IDL	5	5	5	5	8	תסנין	
<IDL	216	<IDL	1545	260	1649	342	14	54	<IDL	9	9	92	תרכיז	TL-1
29	28	34	28	25	230	13	4	<IDL	<IDL	<IDL	<IDL	11	תסנין	
10	377	<IDL	1218	391	3251	567	53	269	12	16	26	113	תרכיז	TL-2
12	8	55	27	26	80	<IDL	<IDL	6	<IDL	<IDL	<IDL	<IDL	תסנין	
158	141	2	39	123	1226	232	14	8	6	<IDL	7	79	תרכיז	TL-3
45	29	34	<IDL	29	360	11	<IDL	<IDL	<IDL	<IDL	<IDL	27	תסנין	
37	59	8	106	190	388	119	10	41	6	<IDL	4	17	תרכיז	TL-4
18	27	55	<IDL	17	186	17	<IDL	17	<IDL	<IDL	<IDL	7	תסנין	
58	104	17	753	134	855	232	13	419	13	14	6	68	תרכיז	EL-1
13	18	10	105	20	170	<IDL	<IDL	77	<IDL	5	<IDL	19	תסנין	
16	53	6	27	184	330	121	<IDL	<IDL	<IDL	<IDL	5	19	תרכיז	EL-3
10	29	54	9	75	208	25	<IDL	<IDL	<IDL	<IDL	<IDL	13	תסנין	

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

IDL-Instrumental detection limits

נספח 3: אפיון הא"מ בדוגמאות לפני ואחרי הומיוניזציה

OD ₂₅₆	pH	EC mS/cm	סה"כ איבוד DOC mg	DOC mg/L	סוג הדוגמא	שם הדוגמא*
0.085	6.7	24.7	2.9	4.3	תסנין 1	EW-2
0.069	6.4	18.2		3.5	תסנין 2	
0.018	6.8	7.8		1.0	תסנין 3	
0.019	4.1	3.3		2.0	תסנין 4	
0.009	4.8	1.1		1.5	תסנין 5	
0.011	5.3	23.8	2.6	2.7	תסנין 1	EW-4
0.003	5.7	18.2		1.7	תסנין 2	
0.007	6.7	8.7		7.2	תסנין 3	
0.000	4.0	3.2		1.3	תסנין 4	
0.003	5.1	0.7		0.5	תסנין 5	
0.050	6.0	24.1	3.9	3.0	תסנין 1	TL-1
0.039	6.2	19.0		2.8	תסנין 2.1	
0.046	6.3	16.2		4.2	תסנין 2.2	
0.027	7.1	6.5		6.4	תסנין 3	
0.006	3.8	2.9		1.5	תסנין 4	
0.006	3.9	1.6		0.8	תסנין 5	
0.001	3.8	0.9		0.7	תסנין 6	
0.002	4.1	0.6		0.7	תסנין 7	
0.005	4.3	0.4		1.0	תסנין 8	
0.006	4.5	0.3		0.6	תסנין 9	
0.172	6.4	24.0	3.8	7.0	תסנין 1	TL-3
0.091	6.6	16.6		3.9	תסנין 2	
0.050	6.9	6.5		4.4	תסנין 3	
0.015	3.8	2.6		0.4	תסנין 4	
0.021	4.3	0.7		1.1	תסנין 5	
0.094	7.1	22.5	3.2	3.3	תסנין 1	EL-1
0.029	6.9	8.1		2.1	תסנין 2	
0.033	7.2	3.6		2.9	תסנין 3	
0.115	7.6	5.8		7.0	תסנין 4	
0.087	7.2	1.6		4.5	תסנין 5	
0.014	7.1	0.6		1.2	תסנין 6	
0.022	7.0	0.3		1.9	תסנין 7	
0.016	3.5	0.4		1.1	תסנין 8	
0.034	3.7	0.3		1.4	תסנין 9	
0.089	6.6	23.6	5.3	6.5	תסנין 1	EL-3
0.037	6.4	19.3		2.7	תסנין 2	
0.085	6.8	8.5		7.2	תסנין 3	
0.030	4.0	3.6		2.6	תסנין 4	
0.045	4.1	2.0		3.9	תסנין 5	
0.045	4.6	0.5		2.3	תסנין 6	

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

BH - לפני הומיוניזציה, AH - אחרי הומיוניזציה

המשך: ריכוזי מתכות לפני ואחרי הומיוניזציה

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*
216	720	59	6	71	34	<IDL	81	BH	EW-2
146	666	30	<IDL	21	7	<IDL	40	AH	
205	535	175	780	23	11	12	37	BH	TL-1
161	68	149	99	33	10	31	10	AH	
80	752	186	152	9	14	24	66	BH	TL-3
29	9	8	<IDL	<IDL	4	6	<IDL	AH	
118	902	436	8	569	34	39	107	BH	EL-1
73	209	369	18	255	25	34	50	AH	
374	921	275	43	14	16	39	34	BH	EL-3
10	10	8	<IDL	<IDL	5	6	<IDL	AH	

* EW - מי קולחים, TL - נקז מים שפירים, EL - נקז מי קולחים, BH - לפני הומיוניזציה,

AH - אחרי הומיוניזציה

IDL-Instrumental detection limits

Abstract

Wastewater effluent irrigation is a common practice worldwide, especially in arid and semi-arid countries where the fresh water supply is limited.

The main activity of most municipal wastewater treatment plants is the biological process, also known as the secondary treatment stage. Secondary wastewater effluent can be used for irrigation according to health standard guidelines, which are determined by the method of wastewater treatment and the possibility of transfer of disease to the grower and/or consumer. "Tertiary" wastewater effluent, which is suitable for unrestricted irrigation, is derived through "deep-bed filtration" (i.e. recharge of "secondary" wastewater into the aquifer for a period of some months).

Irrigation with wastewater effluent enriches the soil with organic matter, part of which is the dissolved organic matter (DOM), that can affect the soil characteristics and transport micro-pollutants, such as heavy metals, through the soil profile to the ground water.

The aim of the research was to examine the effect of secondary wastewater effluent irrigation ("effluent") versus tertiary wastewater irrigation ("tap-water") on the nature of DOM and its copper binding capabilities.

Eucalyptus trees which were planted in 200 liter containers were irrigated with a consistent amount of effluent or tap-water. Less water was given to the trees than they could evaporate (deficit irrigation). After 5 months of summer irrigation, the soil in the containers was rinsed and the leachates were collected. The DOM was derived from both leachates ("effluent leachate" and "tap-water leachate") after filtration with a 0.45 μm cut-off filter. In addition, DOM was also extracted from the original effluent.

The DOM was size fractionated ($\text{DOM} > 1 \text{ kDa}$, $200 \text{ Da} < \text{DOM} < 1 \text{ kDa}$, $\text{DOM} < 200 \text{ Da}$), with the use of membranes by a tangential flow technique.

Selected samples of DOM > 1 kDa were washed with sodium chloride solution using a stirred cell as a means of exchanging the bound elements with sodium (homoionization), and to cause maximum separation of the DOM's components.

DOM in the size fractions DOM > 1 kDa and 200 Da < DOM < 1 kDa was characterized by ¹H-NMR, FTIR, fluorescence Excitation-Emission Matrix (EEM) and fluorescence emission spectrum.

The Cu-DOM complexation (in the DOM > 1 kDa before and after homoionization and in the 200 Da < DOM < 1 kDa size fractions) was investigated by titration with Cu(NO₃)₂, employing a copper ion selective electrode (Cu-ISE).

Changes in the fluorescence emission spectrum of the DOM after copper binding, was used for characterization of the DOM binding sites for this metal.

It was found that in the deficit irrigation practice, the concentration of DOM in the soil solution was 1-2 magnitude higher than that in the effluent, but there was no significant difference in the concentration between effluent irrigation and tap-water irrigation.

Aromatic residue concentration in the DOM (< 0.45 μm) was higher in both leachates, and lower in the effluent itself.

¹H-NMR of DOM > 1 kDa showed that effluent DOM was more aliphatic and less aromatic than both of the leachates DOM. Leachates DOM showed higher concentration of aromatic protons and lower concentration of aliphatic protons compared to their concentrations in effluent DOM.

Effluent DOM contained more aliphatic protons in the α position to withdrawing electron groups (i.e. double bond, carbonyl, carboxyl and aromatic ring), and more aliphatic protons on carbons bonded to the oxygen atom (i.e. ether, ester and alcohols) compared to both leachates DOM.

The FTIR analysis of DOM > 1 kDa also confirms that the leachates DOM is more aromatic than effluent DOM, but this result is equivocal since the FTIR absorption of aromatic substances occurs at the same frequencies as that of carboxylic acids, ketones and aldehydes which can be found in high concentration in the leachates.

No significant differences were noted in the FTIR analysis of DOM in the size fraction 200 Da < DOM < 1 kDa. The analysis showed a larger presence of alcoholic, phenolic, esteric, etheric and polysaccharide groups, compared to the DOM > 1 kDa.

The EEM of DOM > 1 kDa and 200 Da < DOM < 1 kDa showed two significant peaks which indicate the presence of humic substances (fulvic/humic acid-like substances). These peaks were located in the excitation/emission wavelengths of 248-278 nm /436-451 nm (peak A), and 324-334 nm/431-447 nm (peak B). The location of the peaks differed between the DOM types and the DOM size fractions.

Effluent DOM of both size fractions showed an additional peak along the excitation/emission wavelengths of 275-280 nm/309-350 nm (peak C), which indicates a presence of the amino acid tryptophan and represents protein-like substances, and another less noticeable peak (shoulder) apparently indicates the presence of the amino acid tyrosine and represents aromatic protein-like substances. These peaks were not identified in the leachates DOM in either size fractions.

It therefore appears that these protein substances in the effluent undergo biodegradation during its stay in the soil.

The effluent DOM > 1 kDa bound less copper in comparison to the DOM of the two types of leachates. Tap-water leachate DOM bound more copper than the effluent leachate DOM, apparently due to the fact that tap-water leachate DOM had a higher concentration of condensed aromatic rings and/or functional groups (i.e. carboxyl, phenol and nitro) which are bound to the aromatic structures. The functional groups that are bound to the aromatic rings are known to have a high affinity to heavy metals, including copper.

Homoionization with sodium of all DOM > 1 kDa samples reduced the copper binding in comparison to non homoionized DOM samples in the same size fraction. It appears that homoionization changed the spatial structure of the DOM so that less functional groups were able to bind copper.

The copper binding capability of homoionized effluent DOM was less than that of both leachates DOM.

The fluorescence emission spectrum of the DOM samples showed that specific emission (per organic carbon unit) was in the following order: effluent leachate > effluent water > tap-water leachate. It appears that the low specific emission of tap-water leachate was due to a high concentration of carboxylic groups (electron withdrawing groups) which decrease the fluorescence intensity.

A decrease in the fluorescence intensity was found after the addition of copper to the DOM solutions. Copper, which binds to DOM sites close to fluorescence centers (i.e. carboxyl group which is bound to aromatic ring) causes a decrease in the fluorescence intensity of these sites. The DOM-copper complex emits light and immediately goes back to the ground state without fluorescence emission.

The copper binding of effluent DOM showed a moderate decrease of the relative fluorescence intensity (the fluorescence intensity with copper divided to the fluorescence intensity without copper), while the copper binding of the two types of DOM leachates showed a steep and much more pronounced decrease in the relative fluorescence intensity.

Since effluent DOM is more aliphatic than both leachates DOM, it can be assumed that copper binding groups are not found near fluorescence centers (which are predominantly aromatic rings), and therefore copper binding has only a small influence on the fluorescence intensity of effluent DOM.

Both leachates DOM are more aromatic and therefore it can be assumed that more of the copper binding groups are found near fluorescence centers, and copper binding has a strong influence on the fluorescence intensity.

In summary, during the tree growing process with deficit irrigation (without rinsing), organic matter and DOM accumulate in the soil (the original planting was in dune sand without organic matter). The nature of the DOM which accumulated in the soil after secondary effluent irrigation was very similar to the DOM which accumulated in the soil after tap-water irrigation, and very different from the DOM of the effluent leachate itself.

The amount of copper that can bind to the DOM of the soil which was irrigated with effluent water was similar (or a bit less as found in the DOM > 1 kDa) to the amount that can bind to the DOM of the soil which was irrigated with tap-water.

It can be assumed that microbial degradation processes that occur during the presence of the organic matter originating from the trees roots and from the irrigation water in the soil, were the main factor that had influence on the nature of the DOM.

Tel-Aviv University
RAYMOND AND BEVERLY SACKLER
FACULTY OF EXACT SCIENCES

**The Nature of Dissolved Organic Matter
Originating from Wastewater Effluent
and Leachate after Soil Irrigation
and its Copper Binding Properties**

Thesis Submitted Towards the M.Sc. Degree
At Tel-Aviv University
School of Chemistry

By
Revital Hayat

This Thesis was carried out under the supervision of
Dr. Pinchas Fine and Prof. Uri Mingelgrin from
The Institute of Soil, Water and Environmental Sciences,
The Volcani Center, ARO
and Prof. Shmuel Carmeli from
The School Of Chemistry- Tel-Aviv University

October 2006

