

Universidad del País Vasco

Euskal Herriko Unibertsitatea

Kimika Zientzien Fakultatea

Kimikako Gradua

GRADU AMAIERAKO LANA

Azido humikoen eta fulbikoen determinazioa
lurzoruetan ultrasoinu bainuaren bidezko erauzketa erabiliz.

Egilea: Leire Zabaleta Bengoa

Zuzendaria: Ainara Gredilla Altonaga

Donostia-San Sebastián, 2020ko uztaila.

LABURPENA

Jakina da, azido humikoak (HA) eta azido fulbikoak (FA) lurzoruko materia organikoaren osagai garrantzitsuak direla. Energia-iturria dira lurzoruan bizi diren organismo onuragarrientzat, baina aldi berean agente eraginkorrak dira kutsatzaile organiko zein inorganikoen garraioan. Hori dela eta, hauen analisia garrantzitsua da. Lan honetan lurzorutik HA eta FA erazteko teknika bat garatu nahi izan da. Orain arte erabili izan diren metodo luzeak eta konplexuak hobetzeko asmoz, erazketa metodo kuantitatiboa, sinplea eta merkea garatu nahi izan da. Horretarako, erazketa prozesua ultrasoinu bainuan aurrera eramane da, NaOH erazle bezala erabiliz.

Metodoaren optimizaziorako ultrasoinu bainuan erazketa denbora desberdinak probatu dira, 5 minututik 5 orduetara doazenak. Metodoa garatzeko Astigarragako lur-lagin bat erabili da.

Metodoaren balidazioa burutu da, tarte lineala, prezisioa eta detekzio muga eta kuantifikazio muga aztertu direlarik. Lortutako balioak onak izan dira orokorrean. Garatutako metodoarekin Gipuzkoako bi lur-laginetan lortutako HA eta FA kontzentrazioak munduko beste lurzoruetan lortu diren kontzentrazioekin konparatu dira.

ABSTRACT

Humic acids (HA) and fulvic acids (FA) are important components of soil organic matter. They are a source of energy for beneficial organisms living in the soil, but at the same time they are effective agents in the transport of both organic and inorganic contaminants. Therefore, their analysis is important. The aim of this work has been to develop a method for the extraction of HA and FA from soil. In order to improve the long and complex methods used so far, the aim has been to develop a quantitative, simple and economical extraction method. To this end, the extraction process has been carried out in the ultrasonic bath, using NaOH as extractant.

To optimize the method, different extraction times have been tested on the ultrasonic bath, ranging from 5 minutes to 5 hours. One soil sample from Astigarraga was used for the development of the method.

The validation of the method has been carried out, analysing the linear range, precision and limits of detection and quantification. In general the values obtained revealed the adequacy of the method. With the developed method, the concentrations of HA and FA obtained in two soil samples from Gipuzkoa have been compared with concentrations obtained in soils from elsewhere in the world.

AURKIBIDEA

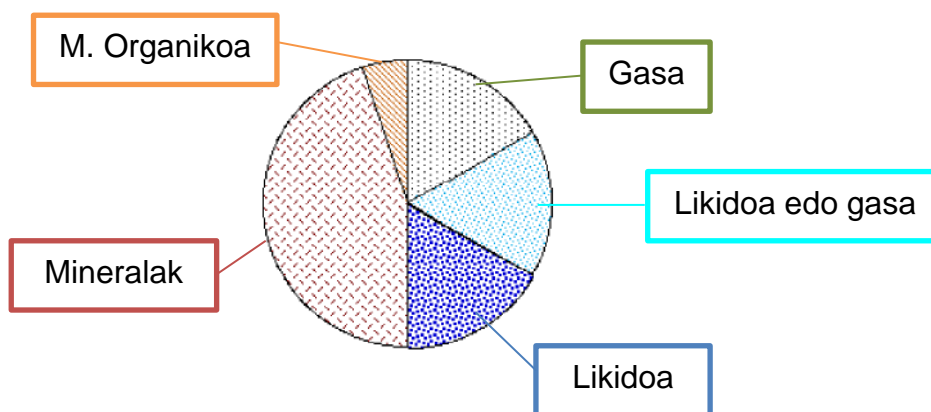
LABURPENA	3
ABSTRACT.....	4
1- SARRERA	7
1.1- Lurzorua	7
1.2- Materia humikoa.....	11
1.2.1- Materia humikoaren egitura, konposizioa eta propietateak ..	13
1.2.2- Materia humikoak lurzoruan duen eragina	15
1.3- HA eta FA erauzteko metodoak	16
2- HELBURUAK.....	21
3- ATAL ESPERIMENTALA.....	22
3.1- Erreaktiboak eta instrumentazioa	22
3.2- Prozedura esperimentalta	24
3.2.1- Laginketa	24
3.2.2- Laginaren aurretratamendua	25
3.2.3- Laginen analisisa.....	25
4- EMAITZAK.....	27
4.1- Metodo analitikoaren diseinua	27
4.1.1- Kalibrazio kurben azterketa	27
4.1.2- Erauzketa denboraren optimizazioa	29
4.2- Metodo analitikoaren balidazioa	30
4.2.1- Tarte lineala.....	30
4.2.2- Prezisioa.....	31
4.2.3- Detekzio- eta kuantifikazio-mugak.....	33
4.3- Laginen analisisa	34
4.3.1- Laginen HA eta FA kontzentrazioak	34
4.3.2- Munduko beste lurzoruetan lortutako HA eta FA kontzentrazioen konparaketa	34

5-	ONDORIOAK.....	37
	CONCLUSIONS.....	38
6-	GERORAKO LANAK	39
7-	ERANSKINAK.....	40
8-	BIBLIOGRAFIA.....	44

1- SARRERA

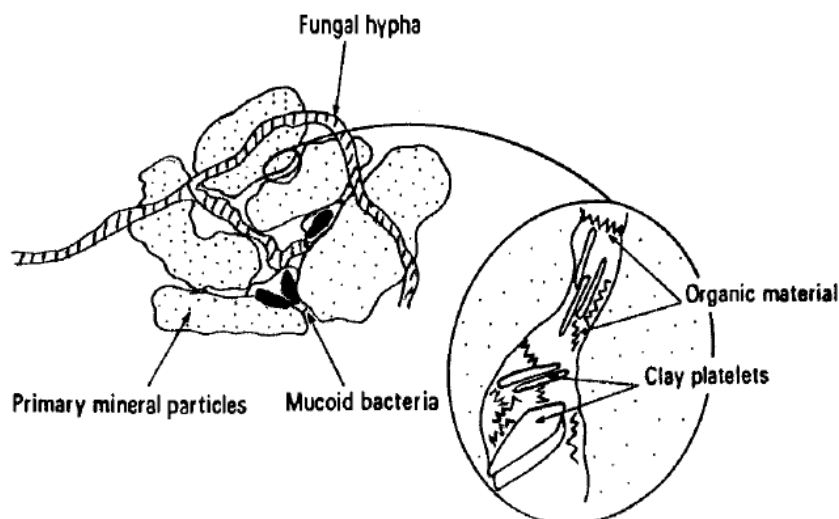
1.1- Lurzorua

Lurzorua hiru fasez osatuta dago: fase solidoa, fase likidoa eta fase gaseosoa. Fase solidoa lurzoruaren % 50eko bolumenari dagokio, 1. irudian ikusten den bezala, eta gehienbat mineralaz osatuta dago. Gainontzeko % 50a airea eta ura dira proportzio desberdinetan.



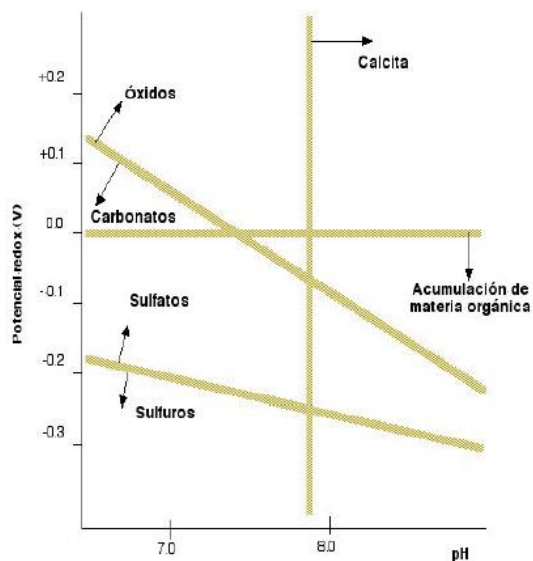
1. Irudia: Lurzoruaren konposizioa.

Fase solidoari dagokionez, partikulak tamaina handiagoko edo txikiagoko agregatuez osatuta egoten dira, eta agregatu horien konposizioa aldakorra izaten da. Lurzoruaren egitura aldatu egiten da partikulen kohesioaren arabera: egiturarik gabeko lurzoruak ez du kohesiorik (areazko dunak), ostera, egitura masiboa duen lurzoruaren partikulak oso paketatua egoten dira kohesio indar handiengatik. Egitura masiboa duten lurzoruaren partikulei dagokionez, buztinezko partikulek paper garrantzitsua jokatzen dute; beraien artean flokulatzen dira "dominio" izaneneko egitura txikiak osatuz, eta horiek elkartuz mikroagregatuak sortzen dira. Agregatu ertainak (20-50 μm) humusaren bitartez, Fe eta Al hidroxidoen eta buztinaren bitartez zementatuak daude. Agregatu ertainak, limo eta arearekin batera agregatu handiagoak osatzen dituzte, eta materia organikoak limo eta arearen lotze-faktore garrantzitsu bezala jokatzen du 2. irudian ikusten den bezala. Agregatu handi horiek sustrai-bizar eta onddoen hifekin (harizpi-formako filamentua) 2 mm baino tamaina handiagoko agregatuak osatzen dituzte ¹⁻⁵.



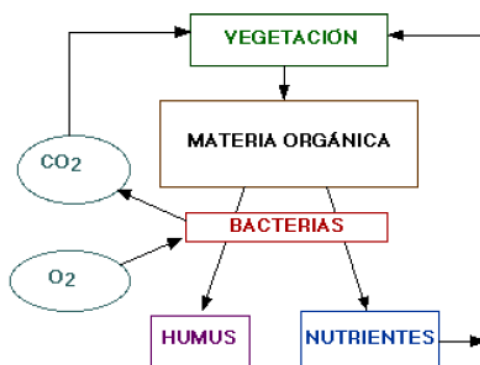
2. Irudia: Lurzoruko fase solidoaren osagai nagusiak.

Fase solidoa, mineralez eta materia organikoz osatuta dago. Lurzoruaren zati inorganikoa arroka fragmentu txikiez eta era askotako partikula mineralez eratuta dago. Tamaina oso aldakorra da, zenbait zentimetrotako legarretik, diametroz mikrometro bat baino gutxiago duten buztinetara joan daiteke. Lurzoruko mineral-aniztasuna oso handia da, baina horien presentzia lurzoruko baldintzen arabera da, hori dela eta, espezie nagusiak gutxi dira. Mineral aniztasuna lurzoruko pH eta erredox potentzialaren arabera dira, 3. irudian ikus daitezke baldintza desberdinetan aurkitzen diren mineral nagusiak. Lurzuruan bi motatako mineralak aurki daitezke nagusiki, mineral primarioak (kuartzo, feldespatu eta mika) eta mineral sekundarioak (karbonato, sulfato, sulfuro, haluro, mineral laminarrak, eta oxido eta hidroxido kristalino edo amorfoak). Area (0,02-2,0 mm-ko diametroko partikulak) eta limodun (0,002-0,02 mm-ko diametroko partikulak) frakzioak (frakzio lodia) ama-harritik datozen mineral primarioak izaten dituzte. Ostera, frakzio finak meteorizazioaren ondoriozko mineral sekundarioekin aberastuta daude ¹⁻⁵.



3. Irudia: Lurzoruko mineral nagusiak erredox potentzial eta pH-aren arabera.

Lurzoruko materia organikoak paper garrantzitsua jokatzen du lurzoruaren propietateak zehazteko orduan, eta era berean funtsezko faktorea da lurzoruaren emankortasunean. Materia organikoaren konposizio eta propietateak baldintza klimatikoaren, lur motaren eta erabileraren arabera aldatu egiten dira. Lurzoruko materia organikoa animalia- eta landare-jatorriko produktuetatik eta prozesu kimiko eta biologikoetan sintetizatutako molekuletatik dator. Nagusiki, hondakin biologikoen degradazioaren emaitza da, 4. irudian ikusten den bezala, eta degradazio aerobikoaren ondorioz, bakteriak materia organiko hori degradatzen jarraitzen du landareentzako mantenugai eta humusa sortuz ¹⁻⁵.

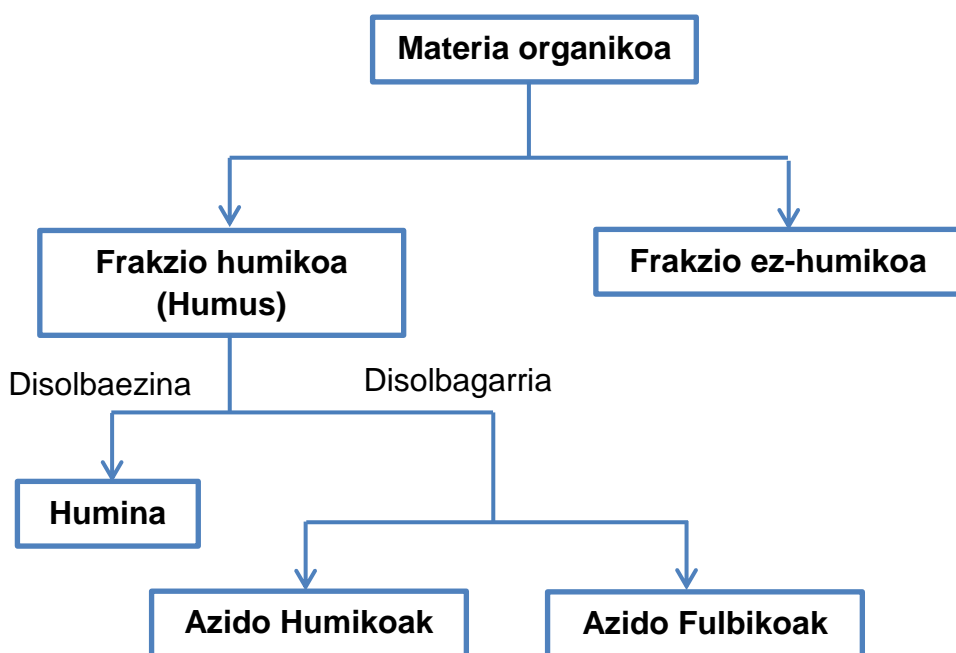


4. Irudia: Lurzoruko materia organiko zikloaren eskema sinplifikatua.

Hondakin biologikoen degradazioaren ondorioz sortutako materia organikoak hainbat konposatu ditu, hala nola pisu molekular handiko eta txikiko azido organikoak, karbohidratoak, proteinak, peptidoak, aminoazidoak, argizariak, konposatu aromatiko kondentsatuak eta lignina. C/N erlazioa erabiltzen da degradazio-adierazle bezala: materia organiko eratu berriak C/N=30 erlazioa du, oster, humusak C/N=10 erlazioa du ¹⁻⁵. Lurzoruan ematen den landare eta animalia hondakinen deskonposizioa oinarritzko prozesu

biologikoa da. Prozesu horretan, karbonoa birzirkulatu egiten da karbono dioxido gisa eta gainerako elementuak (nitrogeno, fosforo, sulfre eta beste zenbait mantenugai) goi mailako landareak behar dituzten forma gisa. Prozesuan zehar karbonoaren zati bat ehun mikrobianoan (hau da, lurzoruko biomasan) asimilatzen da eta beste zati bat humus egonkor bihurtzen da. Humusaren zati bat mineralizatu egiten da aldi berean, horrela, materia organiko totala egoera egonkor eta konstantean mantentzen da ⁶.

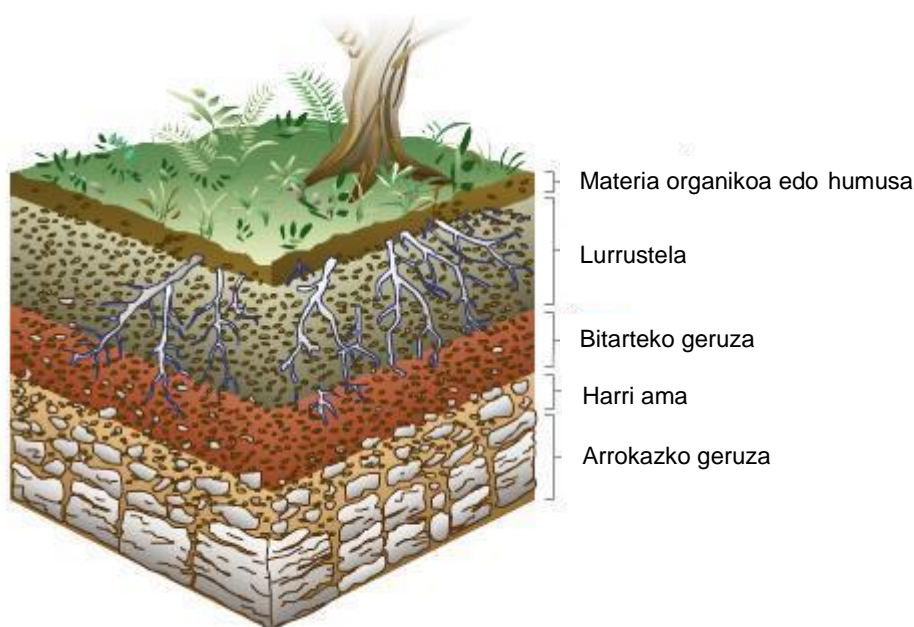
Lurzoruko materia organikoaren konposizioari dagokionez frakzio humikoa eta ez-humikoa bereiz daitezke. Frakzio ez-humikoa (arina), gutxi deskonposatutako hondakinez osatuta dago, begi bistaz edo lupa erabiliz ikus daitezke, eta 1 g/cm³-ko dentsitatea izaten dute. Lurzoruaren biomasa ere atal honetan sartzen da. Frakzio humikoari dagokionez, substantzia humikoak edo humusak ez dute ezaugarri fisiko-kimiko (konposizio elemental, fusio puntua...) espezifikorik, eta nahiko egonkorak dira biodegradazioaren aurrean, 20 urtetik gorako bizitzarekin. Lurzoruko konposatu egonkorrenak dira, eta 5. irudian ikusten den bezala sailkatzen dira: azido humikoak, azido fulbikoak eta humina ¹⁻⁵.



5. Irudia: Materia humikoaren banaketaren eskema.

1.2- Materia humikoa

Ingurumenean aurkitzen diren karbono kantitate handia duten substantzia orori materia humikoa deritzo (HS, *humic substances*)⁷. Substantzia humikoak ingurumenean nonahi agertzen diren substantzia organikoak dira, hala nola lurzoruan, uretan eta ekosferako sedimentuetan agertzen dira⁸. Lurzoruetan gainazaleko geruzan aurkitzen da gehien bat, 6. irudian ikusten den bezala. Egitura oso konplexuak dituzten substantzia organiko naturalak dira, oso deskonposatuak, oxidatuak eta polimerizatuta daudenak⁷. Landare- eta animalia-hondakinen (edozein molekula organikoren, hala nola karbohidratoaren, lipidoaren, terpenoidearen, taninoaren, pigmentuaren edo aminoazidoaren) deskonposizioz sortzen dira⁷, eta horien aitzindariak baino egonkorragoak dira⁸. Kolore ilunekoak dira ikatza, leonardita eta zohikatza bezala. Urtetan horien deposizio eta sedimentazioaren ondorioz, C/H molekula horien guztien azken konposatua kerogenoa da⁷.



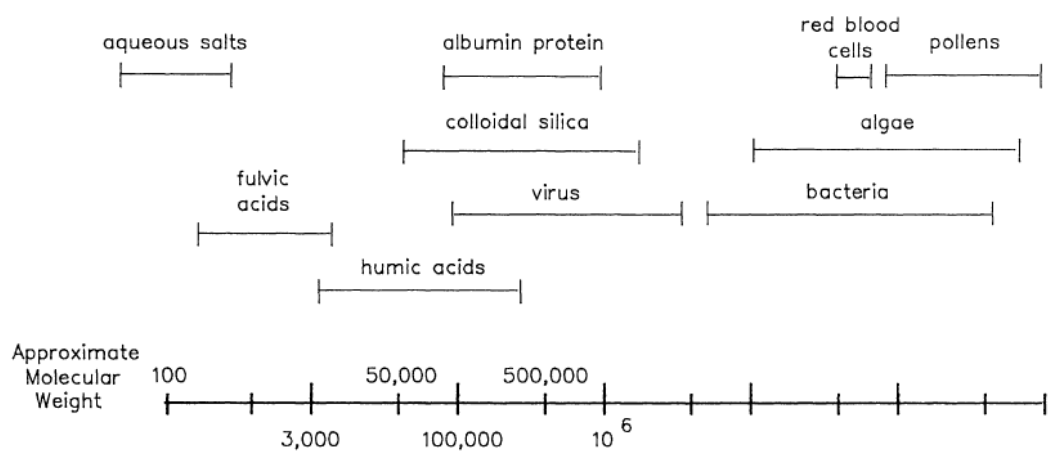
6. Irudia: Lurzorua horizonten ezberdinak⁹.

Substantzia humikoak ezin dira beste edozien konposatu kimiko bezala sailkatu (adibidez, polisakaridoak, proteinak...) ⁸. Tradizioz disolbagarritasunaren arabera sailkatzen dira^{7,8} eta hiru multzotan banatzen dira multzo bakoitza heterogeneoa izan arren:

- Azido humikoak (HA): ez dira disolbagarriak ingurune azidoan (pH<2), baina disolbagarriak dira pH balio altuagoetan. Askotan, pisu molekular altuena (10.000-100.000 Da gutxi gorabehera¹⁰) duten frakzio bezala izendatzen dira⁷, 7. irudian ikus daitekeen bezala. Azido organiko ahul alifatiko eta aromatikoz osatuta daude. Hiru dimentsioko egitura dute eta polimero lineal malgutzat kontsideratzen dira. Batez beste, bere

egituraren % 35a molekula aromatikoek osatzen dute eta gainerakoak molekula alifatikoak dira. Azido humiko polimeroek buztin mineralak erraz lotzen dituzte buztin organiko konplexu egonkorrek osatzeko. Ioi trukaketa eta metalen konplexaketa dira azido humikoen funtzio nagusiak. Azido humikoak gai dira mineral inorganiko arrastoei gatzak eratzeko. Horrez gain, hainbat organismo bizirik erabil dezaketen oligoelementuekin lotzeko joera dute ¹⁰.

- **Azido fulbikoak (FA):** uretan disolbatzen dira edozein pH baldintzatan, funtzio-talde azidoagoak dituzte ⁷, eta pisu molekularra 1.000 eta 10.000 Da-etakoa da gutxi gorabehera (7. irudia). Azido organiko ahul alifatiko eta aromatiko osatuta daude ere. Konposizioa eta egitura nahiko aldakorra da. Azido humikoak baino txikiagoak dira eta aromatikotasun gutxiago dute. Oxigeno kantitate bikoitza dute azido humikoekin konparatuta, azido karboxiliko eta hidroxilo talde asko dituzte, horregatik, erreaktiboagoak dira. Ioi-trukaketarako gaitasuna azido humikoekin konparatuta bikoitza baino gehiago da. Ioi-trukaketarako ahalmen handia azido karboxiliko taldeek ematen diote. Izatez, azido fulbikoak dira karbonodun konposatu kelatatzaileraginkorrenak, mineralekin ere kelatoak eratzen dituzte. ¹⁰.



7. Irudia: HA eta FA-ren pisu molekularren konparaketa ⁸.

Molekulen tamaina txikia denez, erraz sar daitezke landareen sustrai, zurtoin eta hostoetara. Landareetan sartu ahala mineralak garraiatzen dituzte sustraietatik landare-ehunetara. Hori dela eta, ongarrien osagai garrantzitsua dira. Azido fulbikoak mineral kelatuak dituzten aerosolak erabiltzen dira landareen tamaina handitzeko. Hostoei aplikatzen zaizkienean, azido fulbikoek mineralak landare-zeluletako gune metabolikoetara garraiatzen dituzte zuzenean ¹⁰.

- Humina (HN): uretan edozein pH baldintzatan disolbatzen ez den frakzio organikoari deritzo. Depositatzeko, metatzeko eta sedimentatzeko joera dela eta, kerogenoaren aitzindari nagusia da. Huminaren pisu molekularra gainerakoak baino askoz handiagoa da ⁷, 100.000-10.000.000 Da bitartekoa da, horregatik, makromolekula organikoa kontsideratzen da. Huminaren propietate kimiko eta fisikoak zati batean bakarrik ulertzen dira. Substantzia humiko guztien artean deskonposizioarekiko erresistenteena da. Huminak lurzoruan duen funtzio nagusien artean lurzoruaren ura eusteko ahalmena da, lurzoruaren egitura hobetzea, lurzoruaren egonkortasuna mantentzea eta katioi trukatzailerik bezala jokatzeko. Funtzio horien garrantzia dela eta lurzoru emankorren funtsezko konposatua da ¹⁰. Zenbait ikerketek erakutsi dute humina azido humikoen antzekoa dela, hala ere, huminak metalei eta buztinei gogorki lotuta egoten dira, horregatik, disolbaezin bihurtzen dira ¹¹.

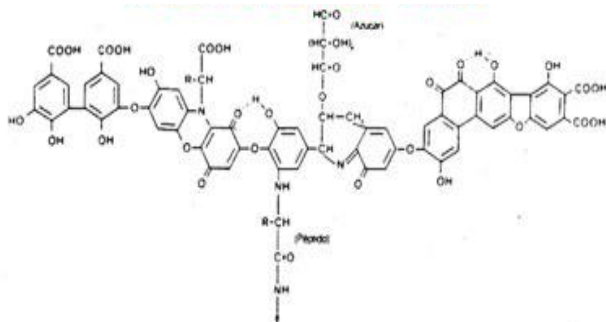
1.2.1- Materia humikoaren egitura, konposizioa eta propietateak

Denboran zehar materia humikoa asko aztertu den arren egitura eta propietateei dagokionez kontzeptu asko ezezagunak dira. Substantzia humikoen tamaina, pisu molekularra, oinarriko konposizioa, egitura eta talde funtzionalen kopurua eta kokapena aldatu egiten dira materiaren jatorriaren eta denboraren arabera. Pisu molekularrari dagokionez, 100-10.000.000 Da bitartekoak izan daitezke, eta lurzurutik deribatutako materia humikoak uretatik deribatutako sedimentuek baino pisu molekular handiagoa izaten du ^{6,12}.

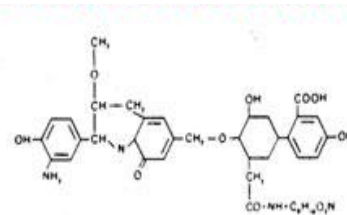
Substantzia humikoen edukia lurzoruetan % 0tik % 10era alda daiteke. Konposizioari dagokionez, esan bezala iturriaren eta kokapenaren arabera aldatu egiten da konposizioa, hala ere, haien arteko antzekotasunak handiagoak dira desberdintasunak baino. Gutxi gorabehera konposizioa honakoa izaten da: % 40-60 karbonoa, % 30 oxigenoa, % 4-5 hidrogenoa, % 1-4 nitrogenoa, % 1-2 sufrea eta % 0-0,3 fosforoa ¹³.

Pisuzko ebidentzia dago materia humikoak nagusiki alkil/aromatiko unitateez osatuta daudela. Alkil/aromatiko unitateak oxigeno eta nitrogenodun talde funtzionalekin elkar gurutzatuak egoten dira. Oxigeno eta nitrogenodun talde funtzional nagusiak: azido karboxilikoak, hidroxilo fenolikoak, zetona eta kinona dira. *Azido fulbikoen* egitura alifatikoagoa da eta ez hain aromatikoak azido humikoekin konparatuz (8. Irudia, proportzioan HA aromatikoagoa da). Horrez gain, *azido fulbikoak* proportzioan azido karboxiliko, fenol eta zetona taldean aberatsagoak dira, horregatik dute disolbagarritasun handiagoa uretan edozein pH baliotan. *Azido humikoak* aromatikoagoak izanik, disolbaezinak bihurtzen dira pH balio baxuetan karboxilato taldeak protonatzen direnean ⁸.

AZIDO HUMIKO MOLEKULA



AZIDO FULBIKO MOLEKULA



8. Irudia: Azido humiko eta azido fulbikoen egitura orokorrak.

Egitura horrek ahalbidetzen die surfaktante gisa jokatzea, material hidrofiliiko zein hidrofobikoei lotzeko gaitasuna emanaz azido humikoei eta azido fulbikoei. Substantzia humiko horiek material hidrofiliiko eta hidrofobikoei lotzeko gaitasuna dutenez (molekula arteko indarren bitartez), surfaktante edo emulsiotzaile bezala jokatu dezakete emulsiotzaile sortuz. Azido humikoen eta azido fulbikoen presentziak konposatu hidrofobiko apolarren solubilizazioa (kutsatzaileak) bultzatzen du, ahalmen hori dela eta, substantzia hidrofobiko apolarrek lur edo sedimentuekiko sortzioa murriztu eta beraz, substantzia hidrofobiko apolarren mugikortasunean eragin dezakete. Elkarrean eragin horrek kutsatzaile horien (substantzia hidrofobiko apolarren) bizitza luzatzea eta ingurumenean kutsatzaileen distantzia handiagoak garrantzitsuak eragin dezake⁸. Horrez gain, azido humikoen eta azido fulbikoen propietate koloidalak ere badituzte beraien tamaina dela eta.⁶

Aurretik aipatutako bi funtzioak konbinatuta, surfaktantea eta koloidala, azido humikoak eta fulbikoak agente eraginkorrak dira kutsatzaile organiko zein inorganikoen garraioan. Ohiko substantzia humikoen egitura zehaztasunez zehaztu ezin den arren, onartuta dago azido humikoen eta fulbikoen eragina dutela metalen eta isotopo erradioaktiboen portaera geokimikoan. Metalekin eta isotopo erradioaktiboekin ahalmen konplexatzaile handia dute, horiekin lotzeko joera dute baldintza naturaletan⁸. Propietate hori oxigenodun talde funtzionalek ematen diote, hala nola talde karboxilikoak, fenolikoak eta karbonilikoak⁷, baina batez ere talde karboxilikoak⁸. Talde horiek sedimentuetan edo lurzoruetan dauden metal ioiak solubilizatu ditzakete, eta ondorioz, mobilizazioan eragin. Hori dela eta, kutsatutako lekuaren benetako arriskua zehaztasun handiagoz ebaluatu ahal izateko, kutsatzaileen presentzia kuantifikatzeaz gain, horien eskuragarritasunean eragina duten azido fulbikoen eta humikoen kontzentrazioa jakitea ere garrantzitsua da⁷.

Azido humikoen eta fulbikoen presentziak eragin nabarmena du metalen, isotopo erradioaktibo eta ingurumeneko kutsatzaile organikoen garraioan eta helmugan. Azido organiko natural horiek kutsatzaileak garraiatu edo immobilizatu ditzakete ingurumen-baldintzen arabera. Horrez gain, azido humikoen eta fulbikoen pestiziden edo substantzia organiko toxikoen

deskonposizio fotokimikoa atzeratu edo areagotu dezakete. Hori dela eta, edozein eliminazio estrategia aurrera eramateko, kontuan hartu behar dira material humikoen efektuak. Izan ere, modu egokian erabiltzen badira, portaera hori kutsatzaileen disolbagarritasuna manipulatzeko erabili daiteke eta ingurune kutsatua eusten edo garbitzen laguntzeko ⁸.

Horrez gain, matrize mineraletan dauden metalak eta isotopo erradioaktiboak kendu ditzakete ⁸. Portaera hori kontrolatzen duten faktoreak ez dira ondo ulertzen; hala ere, zuzeneko eragina dute hondakinen biltegitratzean eta eusteko estrategian. Jakina da kutsatzaile organikok eta ez-organikok azido humikoekin eta fulbikoekin lotzeak aldatu egiten duela horien bioerabilgarritasuna ¹⁴.

1.2.2- Materia humikoak lurzoruan duen eragina

Substantzia humiko eta ez humikoek energia eta mineral asko ematen diote lurzoruan bizi diren mikroorganismo eta animaliei. Substantzia humikoak energia-iturria dira lurzoruan bizi diren organismo onuragarrientzat. Organismo onuragarriek, ez dute eguzkitik energia lortzeko aparatu fotosintesikorik, ondorioz, lurzoruko karbonodun substantziekin lortzen dute energia. Karbono loturen artean dagoen energia erabiltzen dute organismo horiek haien barnean ematen diren erreakzio metabolikoetarako. Lurzoruko organismo onuragarriak (algak, legamiak, bakterioak, onddo-nematodoak, mikorrizak eta animalia txikiak) lurzoruaren emankortasunean eta landare-osasunean eragin onuragarri asko betetzen dituzte ¹⁰.

Horrez gain, lurzoruak ura atxikitze duen gaitasuna hobetzen dute substantzia humikoek. Substantzia humikoen funtzio garrantzitsua lurlean ura eusteko ahalmena da. Ikuspegi kuantitatibotik, lurzoruarentzat ura da landareetatik eratorritako substantzia garrantzitsuena. Substantzia humikoek lurzoru egitura egoki bat sortzen laguntzen dute ura errazago filtratzeko eta sustrai-eremuaren barruan mantentzen laguntzeko. Azalera handia eta barnekarga elektrikoak direnez, ura atxikitze gai dira. Beraien bolumena zazpi aldiz duen ur bolumena eusteko gai dira, eta buztinak baino gaitasun handiagoa dute ura eusteko. Ur eskuragarria da, lur emankor baten osagaririk garrantzitsuena. Substantzia humikoen kontzentrazio handiak dituzten lurzoruak ura eusteko gaitasuna dute lehorre garaiak ematen direnerako. Horregatik, substantzia humikoetan oinarritutako ongarriak erabiltzen dituzten ekoizleek, maiz eguraldi lehorretan ere uzta jasotzen dute ¹⁰.

Bestalde, lurzoru hauskor edo solteko egituraren funtsezko osagaiak dira, lurzoru osatzen duten agregatuen osagaiak baitira. Bakterioak sintetizatutako karbohidrato konplexuen, substantzia humikoen eta buztinen

sedimentazioaren ondorioz, lurzorian agregatuak sortzen dira. Substantzia humikoak frakzio mineralarekin berehala lotzen direnez, humus-buztin eta humus-sedimentu agregatuaren konplexu koloidalak sortzen dira. Agregatu horiek erakarpen elektriko osatuta daude, erakarpen horiek lurzorian partikula finen eta buztin osagaien arteko kohesio-indarrak handitzen dituzte. Agregatu horiekin lurzori agregatuak lortzen dira, eta horrela lurzoria hauskorragoa edo solteagoa lortzen da. Egitura solteko lurzoriak porotsuagoak izaten dira, eta poro horiei esker, atmosferarekin gasa trukatu eta ura gehiago iragaz daiteke ¹⁰.

Horrez gain, substantzia humikoek lurzorian pH-a neutralizatzen dute eta karbono dioxidoa askatzen dute. Lurzori azido zein alkalinoak neutralizatzeko gai dira. Baldintza alkalino edo azidoen ondorioz lurrian lotuta dauden eta landareen sustraientzat eskuragarri ez dauden oligoelementu asko, eskuragarri bihurtzen dira lurzoria neutralizatu ondoren. Substantzia humikoek karbono dioxidoa askatzen dute lurzorian dagoen kaltzio karbonatetik. Askatutako karbono dioxidoa landareak har dezake edo azido karbonikoa sor daiteke. Azido karbonikoak lurzuruko mineraletan eragiten du eta landare-elikagaiak askatzen dira ¹⁰.

Horrez gain, lurzorian tenperatura eta uraren lurruntze-tasa substantzia humikoen bidez egonkortzen da. Substantzia humikoen propietate isolatzaileak lurzori-tenperatura uniformeagoa izaten laguntzen dute, batez ere klima-aldaketa azkarrak gertatzen direnean. Ura substantzia humikoei lotzen denez eta substantzia humikoek lurrian tenperaturaren fluktuazioak murrizten dituztenez, lurzorian hezetasuna atmosferara askatzeko probabilitatea jaisten da ¹⁰.

1.3- HA eta FA erauzteko metodoak

Metodo ugari erabili dira substantzia humikoak isolatu eta karakterizatzeko, baina kuantifikaziorako ez horrenbeste. Karakterizazioari dagokionez, konposatu hauen heterogeneotasuna dela eta, ikerketa-lan asko egin dira selektibotasuna eta sentikortasuna hobetzeko, horrela, substantzia humikoen propietate konplexuak argitzeko. Orain arte ez dago estandarizatutako metodorik substantzia humikoen egiturari buruzko informazio zehatza ematen duenik, eta beraz, ahalegin handiak egiten ari dira horretarako. HA eta FA-ren karakterizaziorako neurtu izan diren parametro orokorrak oinarritzeko konposizioa, talde funtzional azidoen edukia eta batezbesteko pisu molekularra dira. Gaur egun proposamen gehiago daude espektroskopia, elektroforesi bidezko banaketa teknikak eta baita konputazio analitikoa konbinatuz. Erresonantzia Magnetiko Nuklearra (EMN) ¹⁵, Infragorri Espektroskopia (IR) ¹⁶, Raman Espektroskopia (SERS) ¹⁷, Fluoreszentzia

espektroskopia ¹⁸, Pirolisi-Gas Kromatografia Masa-espektrometriarekin (Py-GC-MS) ¹⁹ eta Infragorri detektagailuarekin (Py-GC-IR) ^{20,21} erabili dira substantzia humikoak karakterizatu eta zenbait kasutan kuantifikatzeko ⁷.

Azido humikoak eta fulbikoak kuantifikatzeko erabili izan diren metodoek, detekzio aurretik konposatu horiek lurzorutik disoluzio batera erazteak inplikatu dute. Argitaratutako metodo askotan urrats gogaikarri eta ugari erabili behar dira, disoluzio asko erabiliz eta bukaeran purifikazio zutabe (Amberlita XAD-8 adibidez) bat erabiliz, azido humiko eta azido fulbiko puruak lortzeko (begiratu 1. taula). Lan honetan garatuko den metodoaren bitartez azido humikoak eta fulbikoak kuantifikatu nahi izan dira konparaketa espazial bat egiteko. Hau da, lan honen helburua ez da FA eta HA puruak lortzea, beraz, ez da erretxinarik erabiliko. Izan ere, eluzio denbora handiegia erabiltzen ez bada azido humikoen eta fulbikoen desortzio osoa ez ematea gerta daiteke ²², eta beraz, bidean azido humiko eta azido fulbiko kantitate bat gal daiteke, eta hau kaltegarria litzake kuantifikaziorako.

Azido humikoak eta fulbikoak disoluziora pasatzeko, eta huminatik banatzeko, metodo gehienak sodio/potasio hidroxido edo/eta sodio pirofosfato ur disoluzioak erabiltzen dituzte erazketa-disoluzio gisa, baina beste gatz-disoluzio batzuk, agente kelatatzaileak eta disolbatzaile organikoak ere erabili dira (adibidez, Na₂B₄O₇ 1. taulako 35 erreferentzian) ²³. Beste zenbait lanetan erazketa bi urratsetan eman da, NaOH eta piro-sulfatoa (1. taulan, 38 eta 40 erreferentziak) edota HCl eta NaOH konbinatuz (1. taulan 30 eta 33 erreferentziak).

Aipatutako eraztearen artean, sodio hidroxidozko disoluzioa gomendatzen du "International Humic Substances Society"-k (IHSS) sedimentu organikoetatik eta lurzoruetatik substantzia humikoak erazteko (1. taulan 33 erreferentzia) ²⁴.

Erazketa mekanismoari dagokionez irabiatze mekanikoa eta agitazio gailuak dira gehien erabiltzen diren mekanismoak, hala ere, erazte denborak handiak (sarritan 24 ordukoak) dira eta errepikakortasuna baxua da ²⁵. Hori dela eta, Romaris-Hortas et al.-ek ²⁷ (2007) mikrouhin-energian oinarritutako erazketa-metodo bat garatu zuten erazketa prozesua azkartzeko, horrela aldi berean hainbat laginen erazketa ahalbidetuz. Hala ere, erazketa-prozesuan substantzia humikoen egonkortasuna ezin izan zuten bermatu ⁷.

Alternatiba garrantzitsu gisa, ultrasoinu bidezko energia erabili da. Ultrasoinuak (US) uhin mekanikoak dira eta hedatzeko ingurune elastikoa behar dute. USen maiztasuna 20 kHz-10 MHz bitartekoa da, eta prozesuari sonikazio deritzo. Ultrasoinuen ezaugarrien artean hauek hartzen dira kontuan: potentzia (W), intentsitatea (W/m₂) eta energia-intentsitatea (W/m₃). Oro har, bi motatako ultrasoinuak bereizten dira: intentsitate baxuko uhinak (maiztasun altukoak, 100 kHz-1 MHz) eta intentsitate altukoak (maiztasun baxukoak, 16-100 kHz).

Lehenengoa analisi ez-suntsikorra egiteko erabiltzen da, eta bigarrena, ordea, erauzketak bizkortu eta hobetzeko erabiltzen da, eta lagina suntsitzen du.

USen hedapen-zikloek presio negatiboa sortzen dute likidoetan molekulak bata bestearengandik aldentzean. USen intentsitatea nahiko altua izanez gero, hedapen-zikloak burbuilak edota barrunbeak sor ditzake eta burbuila horien sorkuntzari, hedapenari eta leherketari kabitazio deritzo. Kabitazioari esker, presioa eta tenperatura igo egiten dira eta lixibiazioa errazten eta azkartzen da.

Sonikazioa bi modutara aplika daiteke: laginari zuzenean (punta baten bidez, FUSLE) edota zeharka, non lagina ur-bainu batean dagoen eta ultrasoinua bainuaren hormetatik abiatzen den. Azken hori eskuragarriena eta erabiliena da, merkeena delako. Modurik eraginkorrena, aldiz, ultrasoinu-punta erabiltzea da, disoluzioan murgilduta, bainuarekin lor daitekeen indarra baino 100 aldiz sendoagoa baita ²⁷.

HA eta FA-ak erauzteko bainuan (USB, *Ultrasonic bath*) oinarritutako pretratamendua erabili izan da, erauzketa-prozesu eraginkorragoa ahalbidetzen baitu denbora laburragoan. Metodologia segurua, kostu txikikoa eta ekologikoa delarik. Gainera, aurretratamenduan zehar analittoa gutxiago degradatzen dela behatu da ²⁸. Substantzia humikoak erauzteko ultrasoinu-bainuan oinarritutako lehenengo lana Mecozzi et al.-ek ²⁸ (2002) burutu zuten erauzketa itsas sedimentuetan eginez, ondoren, Moreida-Piñeiro et al.-ek (2004) hobetu zuten, horretarako, azido humikoen eta azido fulbikoen erauzketa alkalinoaren aldagai ezberdin guztiak aztertu eta optimizatuz ²⁹. Hala ere, zenbait aplikaziotan ultrasoinu bainua, ultrasoinu fokalizatutako bidezko erauzketa sistemarengatik (FUSLE, *Focused ultrasound solid liquid extraction*) ordezkatzeko da, errepikakortasun, eraginkortasun eta sonikazio indar (USB baino 100 aldiz handiagoa) handiagoa duelako ⁷. Hala ere, FUSLE erabiliz, erauzketak banan-banan egin behar dira, eta USBrekin aldi berean zenbait erauzketa buru daitezke, beti ere bainuaren tamainaren arabera.

Azido humikoak eta fulbikoak lurzoru eta sedimentuetan erauzteko erabili izan diren hainbat teknika 1. taulan adierazten direnak dira:

1. Taula: Azido humikoak eta azido fulbikoak lurzoruetan erauzteko erabili izan diren hainbat metodo.

Erreferentzia	Pisatutako gramoak	Erauzlea	Energia	Detekziorako teknika	Garbiketa metodoa (HA eta FA-ren purifikazioa)
7	0,1 g sedimentu	15 mL NaOH 1,0 M	FUSLE (% 95 potentziako ultrasoinua): 29 minutu	UV-Vis espektrofotom-: -FA → 271 nm -HA → 273 nm	Ez
29	3,0 g sedimentu	30 mL NaOH 0,5 M (3 aldiz)	Ultrasoinu bainua (35 kHz): 30 minutu	UV-Vis espektrofotom.: 230-210 nm	Ez
30	0,75 g sedimentu	-1.urratsa: 10 mL HCl 6 M - 2.urratsa: 5 mL NaOH 0,5 M (3 aldiz)	Ultrasoinu bainua eta beroa: -1.urratsa: 17 kHz 15 minutu (giro tenperaturan) -2.urratsa: 35 kHz 10 minutu (60 °C) (3 aldiz)	UV-Vis espektrofotom.	Amberlita XAD-8 erretxina
31	0,8 g lurzoru	NaOH 0,5 M edo NaOH + Na ₄ P ₂ O ₇ 0,1 M (prozesua errepikatu laginak kolore hori argia lortu arte)	Irabiaketa gau osoz (prozesua errepikatu laginak kolore hori argia lortu arte)	Ez da kuantifikatzen	Ez
32	Ikatz/erauzle 1:10 proporzioa	NaOH 0,5 M	Agitazioa 3 orduz	Ez da kuantifikatzen	HCl/HF disoluzioa
8	Ez da zehazten	NaOH	Agitazioa	Ez da kuantifikatzen	Erretxina hidrofobikoa
33 (IHSS)	1-2 Kg lurzoru	-1.urratsa: 1:10 (m lagin : V HCl) HCl 0,1 M -2.urratsa: 1:10 (m lagin : V NaOH) NaOH 0,1 M	-1.urratsa: agitazioa 1 orduz -2.urratsa: agitazioa 4 orduz	Ez da kuantifikatzen	HA: HCl eta HF disoluzioa + dialisia

34	2,00 g lurzoru	-1.urratsa: 200 mL Na ₂ B ₄ O ₇ 0,005 M (3 aldiz) -2.urratsa: 200 mL NaOH 0,1 M (2 aldiz)	Agitazioa 1 orduz (5 aldiz, 3 aldiz 1. urratsa + 2 aldiz 2. urratsa)	Ez da kuantifikatzen	HCl-HF disoluzioa + dialisia
35	Ez da zehazten	Na ₂ B ₄ O ₇ 0,1 M + Na ₄ P ₂ O ₇ 0,1 M + NaOH 0,1 M	Agitazioa (180 rpm) 2 orduz	Ez da kuantifikatzen	HA: HCl-HF + dialisia FA: Amberlita XAD-16 erretxina + dialisia
36	Lurzoru/erauzle 1:10 proportzioa	NaOH 0,1 M	Agitazioa	Ez da kuantifikatzen	HA: dialisia FA: Amberlita XAD-8 erretxina
37	20 g lurzoru	500 mL Na ₄ P ₂ O ₇ 0,1 M (pH=12)	Agitazioa 24 orduz	Ez da kuantifikatzen	Ez
38	Lurzoru 10-50 g-ko 200 mL erauzle	-1.urratsa: Na ₄ P ₂ O ₇ ·H ₂ O 0,1 M -2.urratsa: NaOH 0,1 M (2 urratsak etengabe errepikatu laginaren kolorea joan arte)	-1.urratsa: agitazioa 5-6 orduz -2. urratsa: agitazioa 4 orduz (2 urratsak etengabe errepikatu laginaren kolorea joan arte)	Ez da kuantifikatzen	HA: dialisia
39	5 g leonardita	100 mL KOH 1M	Bainu marian 60 °C-tan berotu 2 orduz	K ₄ MnO ₇ -arekin atzeranzko balorazioa	Ez
40	10 g lurzoru	-1. urratsa: 150 mL Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O 0,1 M (3 aldiz) -2.urratsa: 150 mL NaOH 0,1 M	-1. urratsa: agitazioa 5 orduz (3 aldiz) -2.urratsa: agitazioa 3 orduz	Ez da kuantifikatzen	HA: dialisia

2- HELBURUAK

Lan honen helburu nagusia lurzoruetan azido humikoen eta azido fulbikoen determinaziorako jadanik existitzen den metodo bat moldatzea izan da. Horretarako honako urrats hauek finkatu ziren:

- Azido humikoak eta azido fulbikoak erauzteko metodo bat garatzea, ultrasoinu bainua erabiliz. Sedimentuetan aplikatzen den eta FUSLE (ultrasoinu fokalizatua) erabiliz garatutako metodoan oinarrituz ⁷, metodoa ultrasoinu bainura moldatu eta lurzoruetan aplikatu nahi izan da. Horretarako, erauzketa denbora optimizatu da.
- Diseinatutako metodo analitikoa balidatzea. Horretarako ondorengo parametroak aztertu dira: prezisioa, linealtasuna, detekzio-muga eta kuantifikazio-muga.
- Gipuzkoako herri desberdinetan lurzoru-lagin desberdinak hartzea.
- Gipuzkoako lurzoruetako laginei garatutako metodoa aplikatzea, laginen azido humikoen eta azido fulbikoen kontzentrazioak determinatzeko.
- Gipuzkoako lurzoruetan lortutako azido humiko eta azido fulbiko kontzentrazioak, beste toki batzuetako lurzoruetan aurkitutako kontzentrazioarekin konparatzea.

3- ATAL ESPERIMENTALA

Jarraian lan honetan erabilitako errektiboak eta instrumentazioa adieraziko dira, eta jarraitutako prozedura esperimentalak nola egin den azalduko da. Horretarako, laginketa, laginaren aurretratatamendua eta laginen analisia nola egin den deskribatuko da.

3.1- Erreaktiboak eta instrumentazioa

Azido fulbikoen eta azido humikoen erauzketa eta determinaziorako honako errektibo hauek erabili dira:

- Erauzketarako NaOH 1 M desoxigenatua erabili da. Erabiltzen den NaOH desoxigenatua da substantzia humikoen oxidazioa ekiditeko. Desoxigenazio prozesurako, 2,0 g MnSO_4 ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Panreac, Food grade) disolbatzen dira 1 L NaOH 1 M-tan N_2 atmosferapean, eta 4 orduz mantendu (9. irudia) ostean disoluzioa iragazi egiten da (guztia N_2 atmosferapean) ⁴¹.



9. Irudia: NaOHren desoxigenazioa N_2 atmosferapean burutzeko erabilitako muntaia.

- Azido humikoak eta azido fulbikoak banatzeko HCl (37%, Panreac, for analysis) 6,0 M erabili da.
- Azido humikoak birdisolbatzeko $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ pH=9,5 tanpoia erabili da.
- Patroi disoluzioak eta beren kalibratuak prestatzeko, Azido humikoen 162,4 mg/L-ko ama-disoluzioa prestatu da 100 mL-tan disolbatzaile gisa ura erabiliz. Horretarako, HA (Fluka, N^o 53680) patroia erabili da. Azido fulbikoen 158 mg/L-ko ama-disoluzioa prestatu da 100 mL-tan disolbatzaile gisa $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (pH=9,5) tanpoi disoluzioa erabiliz. Horretarako IHSS 1S101F (International Humic Substance Society

isolated humic acid standard from Suwannee River in southeastern Georgia) patroi disoluzioa erabili da.

Instrumentazioari dagokionez honakoa da erabilitako materiala:

- Bahea (n° R72, Cisa). 2mm-ko partikulatik beherako frakzio fina pasarazten duen bahea erabili da, laginetik harriak eta bestelako partikula handiak bereizteko.
- Erauzketarako ultrasoinu bainua (Nahita model 610/3) erabili da (10. irudia). Bainuak 120 W-tako potentzia du eta 40/50 kHz-tako uhinak eratzten ditu.



10. Irudia: Erabilitako ultrasoinu bainua.

- Azido humiko eta azido fulbiko disoluziotik humina solidoa bereizteko, eta aurrerago, azido fulbiko disoluziotik azido humiko solidoa bereizteko zentrifugatzailea (P Selecta, Bartzelona) erabili da.
- Disoluziotik partikula solidoak kentzeko 0,45 µm-ko nylonezko filtroak eta xiringak erabili dira.
- Azido humiko eta azido fulbiko disoluzioen absorbantziak neurtzeko UV-Vis espektrofotometroa (T92 x UV spectrophotometer pG) erabili da (11. irudia). Azido humikoak 273 nm-tan determinatu dira eta azido fulbikoak 271 nm-tan.



11. Irudia: Erabilitako UV-Vis espektrofotometroa.

3.2- Prozedura esperimentalak

3.2.1- Laginketa

Lurzoruetan azido humikoak eta azido fulbikoak determinatzeko, hainbat herritan laginak hartu dira, zehazki Lasarten (5 lagin), Hernanin (4 lagin), Donostian (lagin 1), Orion (2 lagin) eta Astigarragan (4 lagin). Laginketa puntu gehienak parkeetan eta aisialdirako (paseorako) zonaldeetan hartu dira.

Lan honetan garatutako metodologia diseinatzeko Hernaniko L6 eta Astigarrako L16 laginak erabili dira. Lagin horien laginketari buruzko informazioa 2. taulan eta 12. irudian adierazi da.

Gainontzeko 14 laginen laginketari buruzko informazioa eranskinen atalean (7. atala) bildu da. Aipatu beharra dago, nahiz eta lagin hauen analisia ezin izan den burutu, laginen bilketa eta aurretratamendua (lehortu eta bahetu) bai burutu dela.

2. Taula: L6 eta L16 laginen laginketari buruzko datuak.

Lagina	Eguna eta ordua	Tokia	Berezitasunak	Koordenatuak
L6 (Hernani)	2019ko azaroaren 20an, 10:45tan	Umeentzako parke ondoan	Zuhaitzen azpian	43°26'69.14"N 1°97'33.73"W
L16 (Astigarraga)	2019ko azaroaren 27an, 10:55tan	Umeentzako parke ondoan	Zuhaitzen azpian	43°28'13.49"N 1°94'96.04"W



L6



L16

12. Irudia: L6 eta L16 lur-laginen kokapena.

Laginak aitzur txiki bat erabiliz hartu dira. Lurzoruaren lehen 2 cm-ko gainazala kendu eta 5-10 cm-ko sakoneran dagoen lurzoria hartu da. Ondoren, laginak plastikozko poltsa hermetiko indibidualetan gorde dira.

3.2.2- Laginaren aurretratamendua

Laginketaren ondoren, laginak laborategira eraman dira. Laginak gas kanpian giro tenperaturara lehortzen utzi dira (lehorketa erabatekoa izateko aste batez utzi dira). Lehortu ondoren, mortairuaren laguntzaz laginak banan-banan txikitu (lehortzean lurra oso trinko gelditzen baita) eta bahetu egin dira laginetik frakzio lodia bereizteko. 2 mm baino txikiagoko frakzio fina gorde da analisirako, eta plastikozko poltsa hermetiko indibidualetan gorde dira.

3.2.3- Laginen analisia

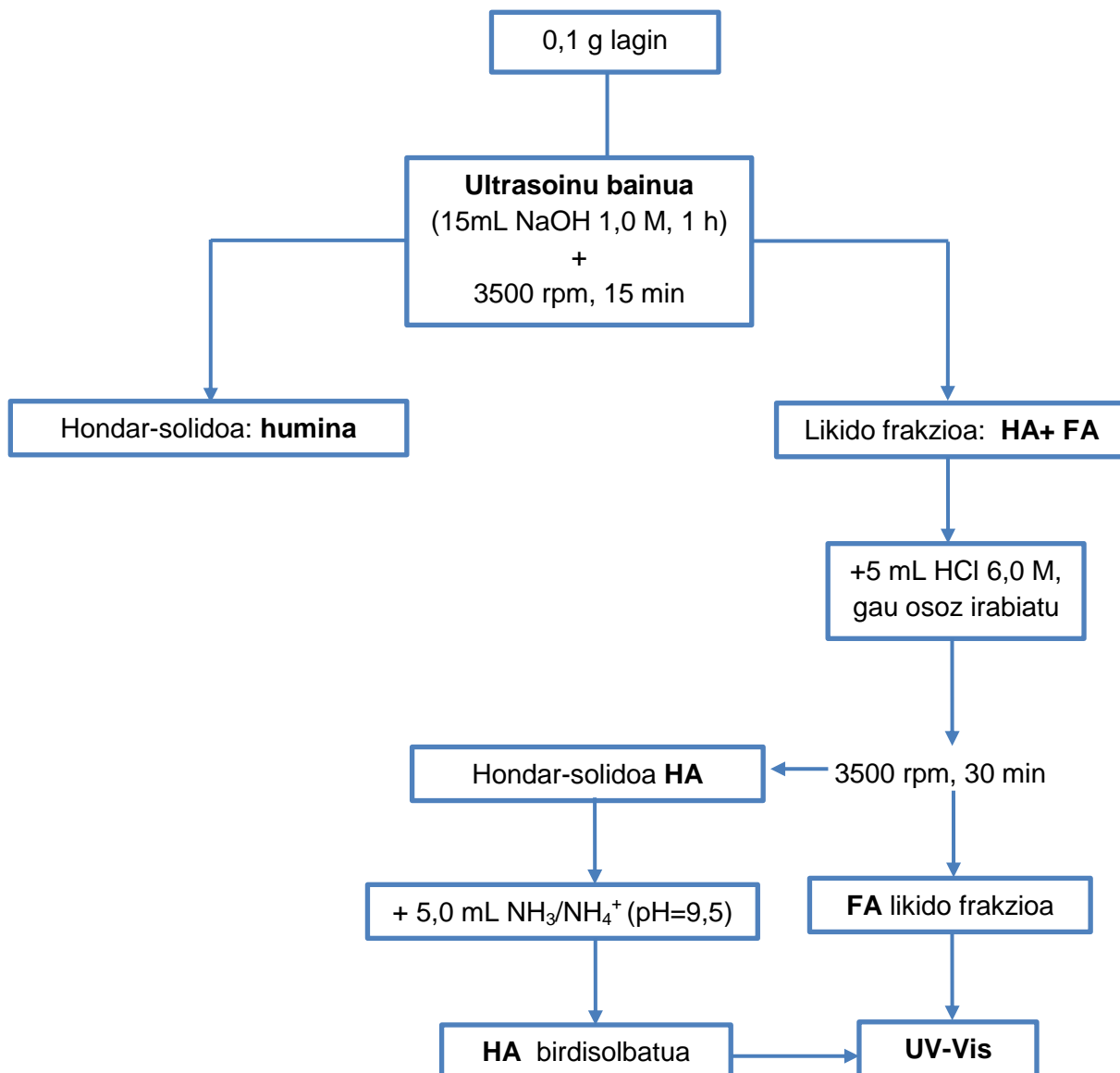
Laginetatik azido humikoak (HA) eta azido fulbikoak (FA) erauzteko 13. irudiko eskema jarraitu da. Erauzketa metodoa Raposo, et. al.-ek (2016)⁷ garatutako metodoaren moldaketa da. Lan honetan USFE (Ultrasoinu fokalizatuaren bidezko erauzketa) erabili beharrean, ultrasoinu bainuak lagundutako erauzketa erabili da.

Horretarako, 13. irudian adierazitako prozedura jarraitu da, non polietilenoazko bial batean 0,1 g sedimentu pisatu eta 15 mL NaOH 1 M gehitzen diren N₂ atmosferapean. Ondoren, ultrasoinu bainuan ordu batez mantentzen da giro tenperaturan.

Sonikatu ondoren, HA eta FA duen likido frakzioa (biak disolbagarriak dira pH>9,5 denean) hondar-solidotik (humina frakziotik) bereizten da 15 minutuz zentrifugatuz (3500 rpm). Lortzen den likido frakzioa 0,45 µm-ko filtroa erabiliz filtratzen da (partikula solidorik ez dagoela ziurtatzeko). Filtratutako likidoari 5 mL HCl 6,0 M gehitu eta gau osoz irabiatzen uzten da giro tenperaturan.

Ingurune azidoan irabiatu ostean, HA prezipitatu egiten da eta FA disoluzioan mantentzen da. HA eta FA banatu aurretik nahastea 30 minutuz zentrifugatzen da (3500 rpm) banaketa kuantitatiboa izateko. HA 5 mL NH₃/NH₄⁺ pH=9,5 tanpoi disoluzioan birdisolbatzen da.

Azkenik, HA eta FA disoluzioen absorbantzia neurtzen da UV-Vis espektrofotometroan, HA-aren kasuan 273 nm-tan eta FA-ren kasuan 271 nm-tan⁷



13. Irudia: Laginetik HA eta FA erazteko jarraitutako prozeduraren eskema.

4- EMAITZAK

Jarraian metodo analitikoaren diseinuari buruz hitz egingo da, hau da, definitutako kalibrazio kurbari eta erauzketa denboraren optimizazioari buruz. Ondoren, metodo analitikoaren balidazioa adieraziko da, tarte lineala, prezisioa eta detekzio- eta kuantifikazio-mugak zeintzuk diren adieraziz. Azkenik, laginen analisiaren emaitzak azalduko dira eta lurzoru desberdinetan lortutako emaitzen arteko konparaketa egingo da.

4.1- Metodo analitikoaren diseinua

4.1.1- Kalibrazio kurben azterketa

Kalibrazio kurbaren diseinurako hainbat proba egin dira, kasu bakoitzean determinazio-koefizienterik onena lortzeko. FA-ren patroi disoluziorako ura erabili da disolbatzaile bezala eta HA-ren patroi disoluziorako $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (pH=9,5).

FA-ren kalibrazio kurbarako 0-50 ppm (mg/L)-tarteko patroiak erabili dira eta HA-ren kalibrazio kurbarako 0-35 ppm bitarteko kontzentrazioak. FA-ren kasuan disoluzio zuri bezala ura erabili da eta HA-ren kasuan $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (pH=9,5) tanpoi disoluzioa.

Prestaturiko patroiak denboran zehar egonkorak diren ikusteko hainbat egunetan neurtu dira kalibratuak: disoluzioak prestatutako egun berean (0. eguna), egun 1 beranduago, 7 egun beranduago, 8 egun beranduago eta 28 egun beranduago (3. eta 4. taulak).

3. Taula: FA patroiei disoluzioen absorbantzia neurketak egun desberdinetan.

	0. eguna	1. eguna	7. eguna	8. eguna	28. eguna
[FA] esp. (ppm)	A (271nm)	A (271nm)	A (271nm)	A (271nm)	A (271nm)
0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
9,48	0,163	0,155	0,153	0,159	0,156
18,96	0,321	0,309	0,310	0,310	0,309
31,60	0,514	0,510	0,511	0,513	0,507
41,08	0,676	0,665	0,666	0,669	0,665
47,40	0,769	0,759	0,760	0,761	0,758

4. Taula: HA patroi disoluzioen absorbantzia neurketak egun desberdinetan.

	0. eguna	1. eguna	7. eguna	8. eguna	28. eguna
[HA] esp. (ppm)	A (273nm)	A (273nm)	A (273nm)	A (273nm)	A (273nm)
0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
9,74	0,172	0,174	0,169	0,177	0,179
16,24	0,291	0,291	0,285	0,291	0,292
19,49	0,346	0,348	0,344	0,352	0,352
25,98	0,450	0,460	0,458	0,462	0,464
32,48	0,566	0,582	0,580	0,583	0,582

Egun desberdinetan lortutako absorbantzia neurketa horiekin lortzen diren zuzenaren ekuazioak 5. taulan adierazten direnak dira.

5. Taula: FA eta HA-ren egun desberdinetan lortutako kalibratio ekuazioak.

Konposatua	Kalibratio-tartea	Eguna	R ²	Ekuazioa
FA	0-50 ppm	0	0,9996	$y = 0,01619x + 0,00635$
		1	0,9999	$y = 0,01605x + 0,00236$
		7	0,9999	$y = 0,01609x + 0,00167$
		8	0,9998	$y = 0,01609x + 0,00376$
		28	0,9999	$y = 0,01602x + 0,00271$
HA	0-35 ppm	0	0,9996	$y = 0,01737x + 0,00323$
		1	0,9999	$y = 0,01785x - 0,00003$
		7	0,9998	$y = 0,01783x - 0,00288$
		8	0,9999	$y = 0,01788x + 0,00116$
		28	0,9999	$y = 0,01786x + 0,00220$

3. eta 4. taulan ikus daitezke patroiaren absorbantziak egonkor mantendu direla egunetan zehar. Patroiaren kostu handia kontuan hartuta, patroiak egunero prestatu behar izana konfirmatu da. 5. taulan ikusten den bezala, lortu diren kalibratio ekuazioak oso onak dira, determinazio-koefizientearen (R²) balioak onak dira bai FA eta HA-ren kasuan eta denboran zehar ez dira esanguratsuki aldatzen. Laginen analisisa egiteko, egunean bertan neurtutako kalibratio-zuzenaren ekuazioa erabiltzea erabaki da (egunean bertan patroi disoluzioak neurtu, zuzenaren ekuazioa lortu eta ekuazio hori laginen kalkuletarako erabiltzea), ekipoiaren sentsibilitatea egunaren arabera alda daitekeelako.

4.1.2- Erauzketa denboraren optimizazioa

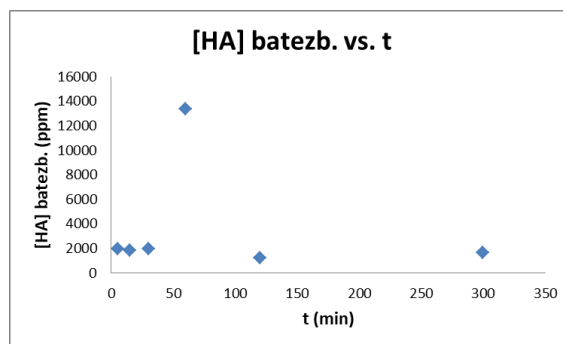
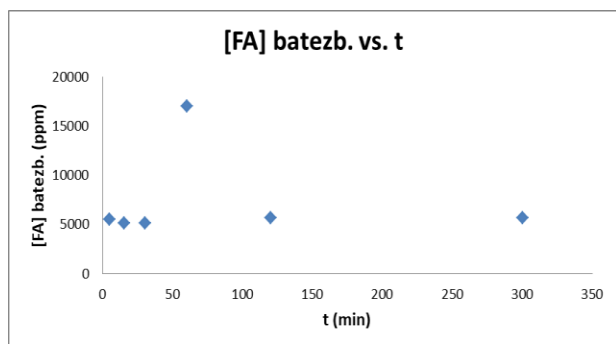
Laginetik HA eta FA erauzteko, NaOH eta ultrasoinu bainua erabiliz, denbora optimoa zein den jakiteko ondorengo analisia burutu da.

Erauzketa burutzeko lagin aleatorioa bat hautatu da: L16 lagina (Astigarraga). Kasu guztietan zehazki 0,1 g lagin pisatu dira 6. taulan ikusten den bezala, eta aurretik azaldutako prozedura jarraitu da: NaOH erabiliz HA eta FA erauzi dira ultrasoinu bainuan denbora desberdinak erabiliz (ultrasoinu bainuan giro tenperaturan mantentzen dela ziurtatuz), eta jarraian 13. irudian HA eta FA bereizteko adierazi den prozedura jarraitu da. Amaieran absorbantzia neurtuz, lagin bakoitzean HA eta FA kontzentrazioa kalkulatu da. Ultrasoinu bidezko erauzketan oinarritutako lanak aztertu ondoren ^{7,29,30} honako denbora tarteak hautatu dira: 5 minutu, 15 minutu, 30 minutu, 1 ordu, 2 ordu eta 5 ordu. Aztertutako denbora guztietarako prozedura birritan aplikatu da.

6. Taula: Ultrasoinu bainuaren bidezko erauzketa denboraren optimizaziorako buruturiko analisiak.

Lagina	Ultrasoinu bainu	Masa (g)
	denbora	
L 16	5 min	0,1060
	5 min	0,1058
	15 min	0,1286
	15 min	0,1249
	30 min	0,1273
	30 min	0,1211
	1 h	0,1032
	1 h	0,1036
	2 h	0,1197
	2 h	0,1107
	5 h	0,1034
	5 h	0,1054

Lagin horiekin erauzketa burutu ostean erauzketa denbora desberdinetarako lortzen diren [FA] eta [HA] kontzentrazioen batezbestekoa 14. irudian adierazten direnak dira.



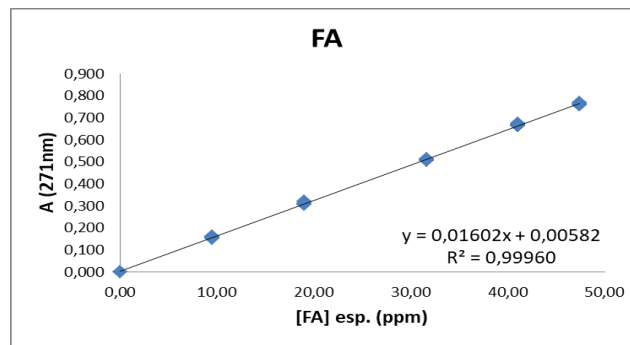
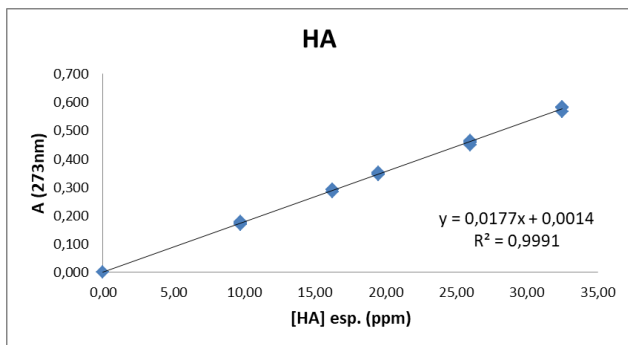
14. Irudia: Erauzketa denbora desberdinetan lortutako [FA] eta [HA] kontzentrazioen batezbestekoa (ppm, mg/kg kasu honetan) L16 laginean.

14. irudian ikusten den bezala, erauzitako kantitateak ia konstante mantentzen dira 1 h-tan izan ezik. 1 h-tan kontzentrazio maximoa lortzen da bai FA zein HA kasuan. Horren arrazoa honakoa izan daiteke. Hasieran, erauzketa denbora txikietan ez da lortzen FA eta HA askorik erauztea, hori dela eta, lortzen den kontzentrazioa txikia da. Baina erauzketa denbora gehiegizkoa bada (2h eta 5h) honako hipotesia eman daiteke: HA eta FA deskonposatu egin daitezke (denbora gehiegiz sonikatzea kaltegarria izan daiteke HA eta FA-rentzat) eta ondorioz lortzen den kontzentrazioa txikiagoa da. Hori guztia kontuan hartuz ultrasoinu bainua eta NaOH erabiliz HA eta FA lurzoru laginetatik erauzteko denborarik optimoena 1-hkoa dela erabaki da.

4.2- Metodo analitikoaren balidazioa

4.2.1- Tarte lineala

Linealtasuna kontzentrazio tarte jakin batean metodo analitiko batek analito kontzentrazioarekiko erantzun zuzenki proportzionala emateko duen gaitasuna da. R^2 balioa, korrelazio-koefizientearen karratua, linealtasunarekin lotuta egoten da, R^2 balioa 1 denean zuzena guztiz lineala da eta 1etik urruntzean linealtasuna galtzen da⁴². Linealtasuna aztertzeko stock disoluzioak prestatu dira lehenik HA (162,4 mg/L-ko stock disoluzioa) eta FA-rako (158 mg/L-ko stock disoluzioa), eta ondoren, disoluzio-ama horretatik beharrezko diluzioak eginez prestatu dira patroi-disoluzioak. Kontuan hartuta espezie bakoitzaren presentzia oso ezberdina izan daitekeela, osagai bakoitzarentzat prestatutako kontzentrazio-tarteak ezberdinak izan dira (3. eta 4. tauletan ikusten direnak), HA-ren kasuan 0-35 ppm-ko (mg/L) kontzentrazio tarte erabili da, eta FA-ren kasuan 0-50 ppm-ko kontzentrazio tarte. 15. irudian HA eta FA-ren kalibrazio kurbak adierazten dira. Hauek diseinatzeke egun desberdinetan neurtutako patroi guztiak hartu dira kontuan.



15. Irudia: HA eta FA-rako prestatutako patroiaren absorbantzia kontzentrazioaren aurrean.

Elementu bakoitzarentzat lorturiko kalibrazio zuzenaren zenbait datu 7. taulan adierazi dira:

7. Taula: HA eta FA-ren kalibratu zuzenaren datu estatistikoak.

Konposatua	HA	FA
Kontzentrazio tartea (mg/L)	0-35	0-50
S _{xy}	0,005	0,005
n	26	26
Korrelazio koefizientea (r)	0,9996	0,9998

S_{xy}: Kalibratuaren desbideratze estandarren erresiduala

n: Neurketa kopurua

Lortutako korrelazio-koefizienteen balioak, bai HA zein FA-ren kasuan, 1etik oso gertu daude, eta lortutako erresiduala txikia da. Beraz, kontzentrazio tarte horietan kalibrazio kurbek joera lineala dutela kontsideratzen da.

4.2.2- Prezisioa

Prezisioa edo doitasuna, neurketa errepikatuen arteko dispersioari esaten zaio. Metodoaren doitasuna neurtzeko errepikakortasuna aztertu da. Errepikakortasunerako lagin baten analisi errepikatua burutu da denbora tarte laburrean (egun berdinean kasu honetan) eta baldintza guztiak berdin mantenduz. Horretarako neurtutako kontzentrazioen batezbestekoa (\bar{X}) eta desbideratze estandarra (S) kalkulatu dira, eta ondoren desbideratze estandar erlatiboa (RSD %) kalkulatu da ⁴².

Errepikakortasunari dagokionez, L16 laginaren neurketa errepikatuak egin ondoren lortzen diren emaitzak 8. taulan adierazten dira.

8. Taula: HA eta FA kontzentrazioak (ppm=mg/kg) L16 laginaren analisi errepikatua burutu ondoren.

Espezia	Kontzentrazioa (ppm)	Analito (%)	\bar{X}	S	RSD (%)
HA	14270	1,3	13359	1287	9,6
	12449				
FA	17296	1,7	17056	340	2,0
	16815				

Errepikakortasunari dagokionez, lortzen diren balioak onak dira orokorrean, RSD (%) balioak bai HA zein FA-ren kasuan % 10aren azpitik daude.

Lortutako RSD (%) balioak AOAC (Association of Official Analytical Chemists) elkarteak errepikakortasunaren balioak onargarriak diren edo ez ondorioztatu ahal izateko definitutako erreferentziazko balioekin konparatu dira. 9. taulan AOAC-ren (*Association of Official Analytical Chemist*) berreskurapen tarte eta doitasun onargarrien balioak datoz laburbilduta analito kontzentrazioaren arabera ⁴³. Analito kontzentrazio jakin baterako taulan adierazten den RSD (%) balioa baino balio txikiagoa lortzen bada metodoa egokia dela ondoriozta daiteke.

9. Taula: AOAC elkarteak analito kontzentrazio desberdinetarako definitutako berreskurapen eta doitasun onargarrien balioak.

Analito (%)	Analito frakzioa	Unitatea	Berreskurapen tarte (%)	RSD (%)
100	1	% 100	98-102	1,3
10	10 - 1	% 10	98-102	2,8
1	10 - 2	% 1	97-103	2,7
0,1	10 - 3	% 0,1	95-105	3,7
0,01	10 - 4	100 ppm	90-107	5,3
0,001	10 - 5	10 ppm	80-110	7,3
0,0001	10 - 6	1 ppm	80-110	11
0,00001	10 - 7	100 ppb	80-110	15
0,000001	10 - 8	10 ppb	60-115	21
0,0000001	10 - 9	1 ppb	40-120	30

L16rako lortutako HA kontzentrazioa %tan 1,3-koa da, eta FA-ren kasuan % 1,7-koa. Beraz, bai HA zein FA-rentzat RSD (%) balio onargarria % 2,7-koa da. FA-ren kasuan gure RSDa % 2,0-koa da, beraz, lortzen den doitasuna onargarria da. HA-ren kasuan ostera, lortzen den balioa % 9,6-koa da, beraz, ez du 9. taulan adierazitakoa betetzen. Hala ere, aurretik aipatu bezala, HA-ren kasuan lortzen den RSD (%) balioa % 10-ren azpitik dago. Beraz, metodoaren prezisioa nahiko ona dela esan daiteke errepikakortasunari dagokionez. Izatez, ingurumeneko lagin naturaletan ohiko izaten da RSD (%) balioak altuagoak behatzea lagin sintetikoetan baino.

4.2.3- Detekzio- eta kuantifikazio-mugak

Detekzio-muga (LOD, Limit of Detection) metodo analitiko jakin baten bidez fidagarritasunez detekta daitekeen substantzia baten kantitate edo kontzentrazio minimoa da. Kuantifikazio-muga (LOQ, Limit of Quantification) berriz, metodo analitiko jakin baten bidez fidagarritasunez kuantifika daitekeen substantzia baten kantitate edo kontzentrazio minimoa da ⁴².

Kuantifikazio-muga detekzio-mugatik kalkulatu da, eta detekzio muga kalkulatzeko bi modu daude: kalibrazio-zuzenaren ekuazioaren bidez kalkuluak eginez edo zuriaren seinalea neurtu eta kalkuluak eginez ⁴². Lan honetan, kalibrazio-zuzenaren ekuazioarekin egin dira kalkuluak ($LOD=3,3 \cdot S_{xy}/m$ eta $LOQ=3 \cdot LOD$) izan ere, ez da zuriaren seinalerik detektatu lagin zuriak prestatu direnean. Horretarako, FA eta HA-ren kalibratuen desbideratze estandarren erresiduala (S_{xy}) eta malda hartu dira kontuan. FA eta HA-ren kalibrazio zuzen globalarentzat lortzen diren LOD eta LOQ balioak 10. taulan adierazten direnak dira.

10. Taula: Kalibrazio-zuzenetatik lortutako LOD eta LOQ (ppm, mg/L) balioak.

Espezia	S_{xy}	Ekuazioa	m	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
FA	0,005	$y = 0,0160x + 0,0058$	0,016	1,0	3,1
HA	0,005	$y = 0,0177x + 0,0014$	0,018	0,89	2,7

Metodoa baliagarria izateko 11. Taulan adierazten diren baldintzak bete behar dira ⁴⁴:

11. Taula: Metodoa baliagarria izateko bete behar diren baldintzak.

1. baldintza	$10 \cdot LOD > K_{min}$
2. baldintza	$LOD < K_{min}$

K_{min} analisis erabilitako kontzentrazio baxueneko patroia da. FA-ren kasuan kontzentrazio txikieneko patroia 9,48 ppm-koa da. Ikusten da, bi baldintzak betetzen direla, 1. baldintzan $31 \text{ ppm} (10 \cdot LOD) > 9,48 \text{ ppm} (K_{min})$ baita, eta 2. baldintzan $3,1 \text{ ppm} (LOD) < 9,48 \text{ ppm} (K_{min})$ da. HA-ren kasuan kontzentrazio txikieneko patroia 9,74 ppm-koa da. Ikusten da hemen ere bi baldintzak betetzen direla, 1. baldintzan $27 \text{ ppm} (10 \cdot LOD) > 9,74 \text{ ppm} (K_{min})$ baita, eta 2. baldintzan $2,7 \text{ ppm} (LOD) < 9,74 \text{ ppm} (K_{min})$ da. Beraz, metodoaren LOD eta LOQ balioak egokiak direla ondoriozta daiteke.

4.3- Laginen analisisia

4.3.1- Laginen HA eta FA kontzentrazioak

Behin metodoa analitikoaren egokitasuna bermatuta gainontzeko laginetan aplikatzea da helburua, laginen HA eta FA kontzentrazioak determinatu ahal izateko. Gure kasuan, soilik L6 (Hernani) eta L16 (Astigarraga) laginen datuak lortu dira 12. taulan adierazten den bezala.

12. Taula: L6 eta L16 laginentzat lortutako FA eta HA kontzentrazioa (mg/kg) konfiantza tarte bezala .

Herria	Lagina	Espezia	\bar{X} (mg/kg)	S	Emaitza
Hernani	L6	FA	16130	568	16.130 ± 570 ppm
		HA	12649	1707	12.649 ± 1.700 ppm
Astigarraga	L16	FA	17056	340	17.056 ± 340 ppm
		HA	13359	1287	13.359 ± 1.290 ppm

L6 eta L16 laginetan lortutako kontzentrazioak antzekoak dira bai FA zein HA kontzentrazioari dagokionez. Hori logikoa da, izan ere, biak lurzoru mota antzekoak dira. Laginen jatorria ere berdintsua da, umeen aisialdirako zonaldeak zuhaitzez babestuta. Hala ere, L16 laginean lortzen diren kontzentrazioak pixka bat handiagoak dira. Bestalde, ikus daiteke bai Astigarragako zein Hernaniko laginetan FA kontzentrazioak HA kontzentrazioak baino handiagoak direla.

4.3.2- Munduko beste lurzoruetan lortutako HA eta FA kontzentrazioen konparaketa

Lortutako emaitzak beste toki batzuetan metodo desberdinekin ^{7,39,40,45-49} lortutako HA eta FA kontzentrazioekin konparatu nahi izan dira. Metodo desberdinekin leku desberdinetan lortu diren FA eta HA kontzentrazioak 13. taulan adierazten direnak dira.

13. Taula: Lurzoru desberdinetan lortutako FA eta HA kontzentrazioak.

Herria	FA (ppm)	HA (ppm)	Erauzlea
Hernani	16.130 ± 568	12.649 ± 1.707	NaOH
Astigarraga	17.056 ± 340	13.359 ± 1.287	NaOH
Galindo (sedimentua; Nerbioi-Ibaizabal itsasadarra) ⁷	7.450 ± 220	675 ± 20	NaOH
Gobela (sedimentua; Nerbioi-Ibaizabal itsasadarra) ⁷	7.115 ± 175	475 ± 15	NaOH
Arriluze (sedimentua; Nerbioi-Ibaizabal itsasadarra) ⁷	4.320 ± 120	540 ± 15	NaOH
Ibri (lurzoru areatsua; Oman) ⁴⁵	3.200	7.500	NaOH
Presidio (Leonardita; Texas, AEB) ³⁹	320.000	160.000	KOH
Caldas behealdean (Kolombia) ⁴⁰	1.040 ± 1.010	40	Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O + NaOH
Caldas goialdean (Kolombia) ⁴⁰	7.370 ± 71	3.575 ± 2.213	Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O + NaOH
Trentino iparraldea (Alpeak, Italia) ⁴⁶	15.900 ± 16.600	31.500 ± 25.200	Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O + NaOH
Trentino hegoaldea (Alpeak, Italia) ⁴⁶	15.300 ± 6.600	15.100 ± 11.200	Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O + NaOH
Hassan basoa (India) ⁴⁷	5.800	3.900	Na ₄ P ₂ O ₇ + NaOH
Ontario Hegoaldeko larreak (AEB) ⁴⁸	1.500	2.700	NaOH
Petrolina (Pernambuco, Brasil) ⁴⁹	6.414 ± 1157	7.162 ± 604	NaOH

Metodoarekin Astigarran eta Hernaniko lurzoruetan lortutako FA eta HA kontzentrazioak Euskal Herriko sedimentuetako kontzentrazioekin konparatzen badira, ikus daiteke, FA kontzentrazioak HA kontzentrazioak baino handiagoak direla kasu guztietan, eta sedimentuetan ageriagoa da fenomeno hori. Bestalde, Hernanin eta Astigarragan lortutako balioak Galindon, Gobelan eta eta Arriluzen lortutakoak baino handiagoak dira. Galindo, Gobela eta Arriluzeko laginak itsasadar batekoak dira (lurzoru hezea eta partzialki gazia), ez dira lehorreko lurzoru batetik hartutakoak Hernani eta Astigarragaren kasuan bezala. Horrek eragina izan dezake FA eta HA kontzentrazioan, horregatik, agian itsasadarrean lortu diren kontzentrazioak baxuagoak dira besteekin konparatuz.

Bestalde, Euskal Herriko lurzoruko balioak, munduko beste toki batzuetako lurzoruekin konparatzen badira: Ibrin (Oman), Caldasen (Kolombia) (mendi behealdean zein mendi goialdean), Hassanen (India), Ontario hegoaldean (AEB) eta Petrolinan (Brasil) Astigarragan eta Hernanin baino FA eta HA kontzentrazio baxuagoak lortu dira. Ibriko kasua hartzen baldin bada,

lbriko lurzorua areatsua da, beraz, ez da hain aberatsa izango materia organikoan. Ondorioz, FA eta HA kontzentrazioak ere txikiagoak izango dira. Horrek justifikatu dezakete FA eta HA kontzentrazioak Euskal Herriko lurzoruetako kontzentrazioa baino txikiagoa izatea.

Presidion (AEB) ostera, Astigarragan eta Hernanin baino FA eta HA kontzentrazio handiagoak lortu dira. Presidioko lurzorua leonardita da ³⁹. Leonardita lignitoarekin (ikatz arrea) lotuta dagoen materia organikoa da, ikatzerako transformazio-prozesua oraindik amaitu ez duena. Leonardita erabiltzen da azido humikodun eta azido fulbikodun ongarriak egiteko, izan ere, leonardita substantzia humiko gehien dituen lehengaia da. Hori dela eta, Presidioko FA eta HA kontzentrazioak oso handiak dira.

Trentino (Italia) iparralde eta hegoaldean lortutako balioak Euskal Herriko lurzoruetan lortutako FA eta HA kontzentrazioen antzekoenak dira.

Aipatu beharra dago humus portzentajea nabarmen aldatzen dela lurzoru mota batetik bestera. Baso-lurzoruak azido fulbikoan ugariak izaten dira, eta belardietako lurzoruak, berriz, azido humiko asko izaten dute ⁵⁰. Astigarragako zein Hernaniko lurzoruak zuhaitzen azpiko lurzoruak dira, beraz, basoetako lurzoruaren ezaugarriak dituzte, eta horrela da, Astigarragan eta Hernanin bietan azido fulbiko kontzentrazioak azido humiko kontzentrazioak baino handiagoak dira. Hassaneko lurzorua, baso lurzorua da, eta hemen ere betetzen da azido fulbiko kontzentrazioak azido humiko kontzentrazioak baino handiagoak izatea. Ontario hegoaldeko lurzorua, ostera, larre bateko lurzorua da, eta kasu honetan azido humikoan aberatsagoa dela ikus daiteke.

5- ONDORIOAK

Azido humikoak eta azido fulbikoak sedimentuetan edo lurzoruan dauden metal ioiak (eta bestelako kutsatzaileak) disolbatu ditzakete, eta ondorioz, horien mobilizazioan eragin. Hori dela eta, kutsatutako lekuaren benetako arriskua zehaztasun handiagoz ebaluatu ahal izateko, kutsatzaileen presentzia kuantifikatzeaz gain, kutsatzaile horien eskuragarritasunean eragina duten substantzia humikoen kontzentrazioa jakitea era garrantzitsua da ⁷.

Hori dela eta, lan honen bitartez lurzoruen azido humikoak eta azido fulbikoak erauzteko prozedura bat garatu da ultrasoinu bainua erabiliz, eta Hernani eta Astigarragako laginetan probatu ahal izan da. Horretarako, metodo analitikoaren optimizazioa burutu da, ultrasoinu bainuaren denbora optimoena zein den aztertuz. Ultrasoinu erauzketa denbora optimoena 1 h-koa dela ondorioztatu da, NaOH erauzle bezala erabiltzen delarik.

Horrez gain, metodoaren balidaziorako honako kalitate parametro hauek aztertu dira: tarte lineala, prezisioa eta detekzio- eta kuantifikazio-mugak besteak beste. Tarte linealari dagokionez, hautatutako kontzentrazio tartean kontzentrazio eta seinalearen arteko erlazioa lineala dela ikusi da. Prezisiori dagokionez, errepikakortasuna neurtu da eta lortu diren RSD (%) balio guztiak % 10aren azpitik daudela behatu da. Bestalde, detekzio- eta kuantifikazio-mugak metodoa baliagarria izateko beharrezkoak diren bi baldintzak betetzen dituztela ikusi da bai HA zein FA-ren kasuan.

Metodoaren kalitatea aztertu ondoren, metodoa Gipuzkoako 2 herrietan hartutako laginak analizatzeko erabili da, eta lortutako balioak munduko beste tokietan lortutako HA eta FA kontzentrazioekin alderatu da. Lortutako balioak aztertuz ondoriozta daiteke lurzoru mota (baso zein belardi, lurzoru zein sedimentu) faktore garrantzitsua dela HA eta FA kantitateetan, eta hauen arteko erlazioan.

Bukatzeko esan daiteke lortutako metodoa, ona eta kuantitatibo izateaz gain, metodo merke eta sinplea dela. Izatez, erabiltzen den material eta instrumentazioa ohiko laborategietan aurkitzen dena da eta erabilerraza da.

CONCLUSIONS

Humic acids and fulvic acids can solubilize metal ions (and other pollutants) present in sediments or in soils, and thus influence their mobilization. Therefore, in order to assess more accurately the real risk of the contaminated soils, in addition to quantifying the presence of contaminants, it is important to know the concentration of humic substances that affect pollutants availability.

For this reason, through this work, a procedure has been developed for the extraction of humic and fulvic acids by means of an ultrasonic bath, which has been tested on samples from Hernani and Astigarraga (Gipuzkoa). For this purpose, the analytical method has been optimized, analysing the optimal time for the ultrasonic bath. It has been concluded that the optimal ultrasound extracting time is 1 h, using NaOH as extractant.

In addition, method validation has been studied by analysing quality parameters such as linear range, precision and limit of detection and limit of quantification. Regarding the linear range, it has been seen that the relationship between concentration and signal is linear within the selected concentration range. In terms of precision, the repeatability has been calculated and it is noted that all RSD (%) values are below 10 %. Besides, the detection and quantification limits for HA and FA meet the two requirements necessary for the method to be valid.

After analysing the quality of the method, the method has been used for the analysis of samples taken in 2 locations in Gipuzkoa, and the values obtained have been compared with concentrations of HA and FA obtained in soils from other parts of the world. Analysing the values obtained, it can be concluded that the type of soil (both forest and grassland, soils or sediments) is an important factor in the amounts of HA and FA, and in their relationship.

Finally, it can be concluded that the method obtained, apart from being good and quantitative, it is a cheap and simple method. In fact, the material and instrumentation used can be found in normal laboratories and it is easy to handle.

6- GERORAKO LANAK

COVID-19-ren egoera dela eta, lanaren garapenerako finkatutako zenbait helburu ezin izan dira burutu: metodoaren balidazioari dagokionez zehaztasuna ezin izan da aztertu, eta bestalde, laginketan hartutako 16 laginetan ezin izan da garatutako metodoa aplikatu.

Zehaztasuna determinatzea lanaren helburuetako bat zen. Metodoaren zehaztasunak lortutako balioa eta benetako edo erreferentziazko balioaren arteko adostasuna ematen du ⁴². Metodoaren zehaztasuna determinatzeko hainbat aukera posible pentsatu ziren. HA eta FA-ren erreferentziazko materialik ez zegoen laborategian, eta oso garestiak zirenez aukera hau baztertu egin zen. Beste aukera bat, metodoa beste metodo batekin konparatzea zen. Horretarako, HA eta FA erauzteko metodo ezberdinen azterketa egin zen, baina aurkitutako metodo guztietan ^{7,8,30,51,52} laborategian eskuragarri ez zegoen materiala edo ekipamendua erabiltzen zuten, beraz, aukera hau ere baztertu egin zen. Horren aurrean, beste aukera bat pentsatu zen, HA eta FA kontzentrazioak etiketan adierazita zituen ongari batean metodoa aplikatu eta berreskurapen portzentajea neurtzea. Hau ezin izan zen burutu, eta gerorako lanen zerrendan geratzen da, noizbait posible bada egiteko.

Lanaren beste helburuetako bat, Gipuzkoako herri desberdinetan (Lasarte, Hernani, Donostia, Orio eta Astigarraga) hartutako laginetan garatutako metodoa aplikatzea zen, eta lortutako HA eta FA kontzentrazioak elkarren artean konparatzea. Lagin horien laginketaren informazioa eranskinen atalean, 7. atalean adierazita dago. Laginen artean Zubietako auzoan hartutako L4 eta L5 laginetatik hasia gomendagarriagoa izango litzake. Bi lagin hauek Zubietan dagoen erraustegitik oso gertu hartu ziren, justu erraustegia martxan jarri aurretik. Beraz, erraustegiak inguruko lurzoruetan izan dezakeen eragina ebaluatu ahal izateko, oso interesgarria litzateke lurzoru hauen HA eta FA edukiak determinatzea (beste zenbait kutsatzaileekin batera), erreferentziazko balio bezala erabili ahal izateko.

7- ERANSKINAK

Aztertu gabe gelditu diren gainontzeko laginak 14., 15., 16., 17. eta 18. tauletan eta 16., 17., 18., 19. eta 20. irudietan adierazten direnak dira.

Lasarte:

14. Taula: Lasarten burututako laginketaren deskripzioa eta laginketa puntuak.

Lagina	Eguna eta ordua	Tokia	Berezitasunak	Koordenatuak
L1	2019ko urriaren 3an, 15:05etan	Umeen parkea	Zuhaitzik gabeko lekua (lagina areatsua)	43°26'87.11"N 2°01'85.20"W
L2	2019ko urriaren 3an, 15:05etan	Umeen parkea	Zuhaitzik gabeko lekua	43°26'87.11"N 2°01'85.20"W
L3	2019ko urriaren 3an, 15:30etan	Parkea	Gainean ez, baina inguruan zuhaitzak	43°27'47.76"N 2°02'89.17"W
L4	2019ko urriaren 3an, 15:55etan	Zubietako erraustegitik gertu	Zuhaitzik gabeko lekua	43°25'97.69"N 2°03'77.80"W
L5	2019ko urriaren 3an, 16:15etan	Zubietako erraustegitik gertu	Zuhaitzik gabeko lekua	43°26'21.76"N 2°02'60.55"W



L1 eta L2



L1



L2



L3



L4



L5

16. Irudia: 14. taulan azaldutako laginen laginketa (Lasarte).

Hernani:

15. Taula: Hernanin burututako laginketaren deskripzioa eta laginketa puntuak.

Lagina	Eguna eta ordua	Tokia	Berezitasunak	Koordenatuak
L7	2019ko azaroaren 20an, 10:50tan	Umeen parketik urrutiago	Gainean ez, baina inguruan zuhaitzak. Lagina konpost etxolaren azpian hartu da	43°26'72.95"N 1°97'35.56"W
L8	2019ko azaroaren 20an, 11:00etan	Merendero ondoan	Zuhaitzak inguruan	43°27'07.74"N 1°97'73.10"W
L9	2019ko azaroaren 20an, 11:15etan	Atletismo pistaren ondoan	Zuhaitzak inguruan	43°27'13.39"N 1°97'42.56"W



L7



L8



L9

17. Irudia: 15. taulan azaldutako laginen laginketa (Hernani).

Donostia:

16. Taula: Donostian burututako laginketaren deskripzioa eta laginketa puntua.

Lagina	Eguna eta ordua	Tokia	Berezitasunak	Koordenatuak
L10	2019ko azaroaren 20an, 12:00etan	Kimika fakultate ondoan	Zuhaitzak inguruan	43°30'63.58"N 2°00'92.84"W



L10

18. Irudia: 16. taulan azaldutako laginaren laginketa (Donostia).

Orio (Igeldorako bidea):

17. Taula: Orion burututako laginketaren deskripzioa eta laginketa puntuak (lagin hauek Ane Bordagaray-irakasleak hartu zituen).

Lagina	Eguna eta ordua	Tokia	Berezitasunak	Koordenatuak
L11	2019ko azaroaren 21ean, 17:00ak inguruan	Baratzean	Zuhaitzik ez	43°28'48.35"N 2°10'81.82"W
L12	2019ko azaroaren 21ean, 17:00ak inguruan	Oilategian	Zuhaitzak inguruan	43°28'42.33"N 2°10'66.05"W



L11



L12

19. Irudia: 17. taulan azaldutako laginen laginketa (Orio).

Astigarraga:

18. Taula: Astigarragan burututako laginketaren deskripzioa eta laginketa puntuak.

Lagina	Eguna eta ordua	Tokia	Berezitasunak	Koordenatuak
L13	2019ko azaroaren 27an, 10:30etan	Umeen parke ondoan	Historik gabeko zuhaitzaren azpian	43°28'19.97"N 1°94'70.01"W
L14	2019ko azaroaren 27an, 10:35tan	Umeen parke ondoan	Zuhaitzen azpian	43°28'32.52"N 1°94'79.38"W
L15	2019ko azaroaren 27an, 10:40tan	Kirola egiteko aparatuen ondoan	Historik gabeko zuhaitzaren azpian	43°28'47.44"N 1°94'84.34"W
L16	2019ko azaroaren 27an, 10:55tan	Parkean eta umeen parke ondoan	Zuhaitzen azpian	43°28'13.49"N 1°94'96.04"W



L13



L14



L15

20. Irudia: 18. taulan azaldutako laginen laginketa (Astigarraga).

8- BIBLIOGRAFIA

- (1) Manahan, S. E. *Environmental Chemistry*, 9th ed.; CRC Press: Boca Raton, 2010.
- (2) Bohn, H. L.; McNeal, B. L.; O'Connor, G. A.; Sánchez Orozco, M. *Química del suelo*; Limusa: México, 1993.
- (3) McBride, M. B. *Environmental Chemistry of Soils*; Oxford University Press: New York, 1994.
- (4) Porta Casanellas, J.; López-Acevedo Reguerín, M.; Poch Claret, R. M. *Introducción a la edafología: uso y protección del suelo*; Mundi-Prensa: Madrid, 2008.
- (5) Wild, A. *Soils and the Environment: An Introduction*; Cambridge University Press: Cambridge, New York, USA, 1993.
- (6) Stevenson, F. J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*; John Wiley & Sons: New York, 1994.
- (7) Raposo, J. C.; Villanueva, U.; Olivares, M.; Madariaga, J. M. Determination of Humic Substances in Sediments by Focused Ultrasound Extraction and Ultraviolet Visible Spectroscopy. *Microchem. J.* 128, 26–33, 2016.
- (8) Gaffney, J.; Marley, N.; Clark, S. B. Humic/Fulvic Acids and Organic Colloidal Materials in the Environment. *ACS Symposium Series* 651, 2–17, 1996.
- (9) Gobierno de Canarias. Consejería de Transición Ecológica, Lucha contra el Cambio Climático y Planificación Territorial, Calidad del suelo. https://www.gobiernodecanarias.org/medioambiente/temas/calidad-del-suelo/el_suelo_en_canarias/que_es_el_suelo/formacion_y_estructura_del_suelo/ (kontsulta 2020ko ekainaren 13an egin zen).
- (10) Pettit, D. R. E. *Organic Matter, Humus, Humate, Humic Acid, Fulvic Acid and Humin: Their Importance in Soil Fertility and Plant Health*; A & M University: Texas, 2002.

- (11) Schnitzer, M.; Khan, S. U. *Humic Substances in the Environment*; Marcel Dekker: New York, 1972.
- (12) Freeman, A. J.; Lander, G. H.; Keller, C. *Handbook on the Physics and Chemistry of the Actinides*; Elsevier Science: North Holland, Amsterdam, 1984.
- (13) Suffet, I. H.; MacCarthy, P.; *Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants*; American Chemical Society: Washington, DC, 1989.
- (14) McCarthy, J. F.; Jimenez, B. D. Reduction in Bioavailability to Bluegills of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Bound to Dissolved Humic Material. *Environ. Toxicol. Chem.* 4, 511–521, 2004.
- (15) Hertkorn N.; Kettrup A. Molecular Level Structural Analysis of Natural Organic Matter and of Humic Substances by Multinuclear and Higher Dimensional NMR Spectroscopy. In: *Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice*; NATO Science Series 52. Springer: Dordrecht, 2005.
- (16) Tanaka, T.; Nagao, S.; Ogawa, H. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy of functional groups of humic acid dissolving in aqueous solution. *Anal. Sci.* 17, i1081–i1084, 2001.
- (17) Francioso, O.; Sánchez-Cortés, S.; Tugnoli, V.; Marzadori, C.; Ciavatta, C. Spectroscopic Study (DRIFT, SERS and ¹H NMR) of Peat, Leonardite and Lignite Humic Substances. *J. Mol. Struct.* 565–566, 481–485, 2001.
- (18) Senesi, N.; Miano, T. M.; Provenzano, M. R.; Brunetti, G. Characterization, Differentiation, and Classification of Humic Substances by Fluorescence Spectroscopy. *Soil Sci.* 152, 259–271, 1991.
- (19) Saiz-Jimenez, C. Analytical Pyrolysis of Humic Substances: Pitfalls, Limitations, and Possible Solutions. *Environ. Sci. Technol.* 28 (11), 1773–1780, 1994.
- (20) Kuckuk, R.; Hill, W.; Burba, P.; Davies, A. N. Pyrolysis-GC-FTIR for Structural Elucidation of Aquatic Humic Substances. *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (7), 528–532, 1994.

- (21) Mugo, S. M.; Bottaro, C. S. Characterization of Humic Substances by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (20), 2375–2382, 2004.
- (22) McDonald, S.; Bishop, A.; Prenzler, P.; Robards, K. Analytical Chemistry of Freshwater Humic Substances. *Anal. Chim. Acta* 527, 105–124, 2004.
- (23) Janoš, P. Separation Methods in the Chemistry of Humic Substances. *J. Chromatogr. A* 983 (1), 1–18, 2003.
- (24) Humic Substances Society (IHSS). What are Humic Substances? <http://humic-substances.org/> (kontsulta 2020ko ekainaren 15an egin zen).
- (25) Aiken, G. R.; McKnight, D. M.; Wershaw, R. L.; MacCarthy, P. *Humic Substances in Soil, Sediment and Water: Geochemistry, Isolation and Characterization*; Wiley: New York, USA, 1986.
- (26) Romarís-Hortas, V.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, P. Application of Microwave Energy to Speed up the Alkaline Extraction of Humic and Fulvic Acids from Marine Sediments. *Anal. Chim. Acta* 602 (2), 202–210, 2007.
- (27) Onaindia, J. O.; Ruiz, A. V.; Loizate, N. E. *Ingurumen-kutsaduraren analisia*; Udako Euskal Unibertsitatea, 2014.
- (28) Bendicho, C.; De La Calle, I.; Pena, F.; Costas, M.; Cabaleiro, N.; Lavilla, I. Ultrasound-Assisted Pretreatment of Solid Samples in the Context of Green Analytical Chemistry. *Trends Anal. Chem.* 31, 50–60, 2012.
- (29) Mecozzi, M.; Amici, M.; Pietrantonio, E.; Romanelli, G. An Ultrasound Assisted Extraction of the Available Humic Substance from Marine Sediments. *Ultrason. Sonochem.* 9 (1), 11–18, 2002.
- (30) Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, A.; Bermejo-Barrera, P. New Trends Involving the Use of Ultrasound Energy for the Extraction of Humic Substances from Marine Sediments. *Anal. Chim. Acta* 524, 97–107, 2004.
- (31) Prentice, A. J.; Webb, E. A. A Comparison of Extraction Techniques on the Stable Carbon-Isotope Composition of Soil Humic Substances. *Geoderma* 155, 1–9, 2010.

- (32) de Souza, F.; Bragança, S. R. Extraction and Characterization of Humic Acid from Coal for the Application as Dispersant of Ceramic Powders. *J. Mater. Res. Technol.* 7 (3), 254–260, 2018.
- (33) Wershaw, R. L.; Pinckney, D. J.; Llaguno, E. C.; Vicente-Beckett, V. NMR Characterization of Humic Acid Fractions from Different Philippine Soils and Sediments. *Anal. Chim. Acta* 232, 31–42, 1990.
- (34) Avellaneda, L. M.; Lozano de Yunda, A.; Zamudio, A. M. Effect of the Use and the Cover of the Soil on the Profile of Polydispersity of Humic Acids Extracted of an Andisol from the Department of Caldas, Colombia. *Rev. Colomb. Quím.* 34 (2), 189–200, 2015.
- (35) Flores, J. C. M.; Montoya, J. C.; Realpe, I. B. Fraccionamiento y cuantificación de la materia orgánica en Andisoles bajo diferentes sistemas de producción. *Acta Agronómica* 62 (4), 333–343, 2013.
- (36) Ruiz, M.; Elizalde, G.; Paolini, J. Caracterización de Las Sustancias Húmicas Presentes En Microagregados de Suelos de Dos Toposecuencias. *Agron. Trop.* 47, 381–395, 1997.
- (37) Benchekroun, A. *Cultivo de hortícolas: ensayo de variedades. Influencia del uso y manejo del suelo: Agregación, erosionabilidad y fracción orgánica* (Dokterego tesia); Universitat Politècnica de València, 2019.
- (38) Almendros, G.; González-Vila, F.; González-Pérez, J.; Knicker, H.; De la Rosa, J. *Protocolos y Técnicas Analíticas e Instrumentales Para Evaluar El Impacto Del Fuego Sobre La Materia Orgánica Del Suelo*; Universidad de Valencia, 2009.
- (39) López-Salazar, R.; González-Cervantes, G.; Vázquez-Alvarado, R.; Olivares-Sáenz, E.; Vidales, J.; Rosa, R.; Ortega-Escobar, M. Metodología Para Obtener Ácidos Húmicos y Fulvicos y Su Caracterización Mediante Espectrofotometría Infrarroja. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 1397–1407, 2018.
- (40) Díez Pérez, V.; Ramírez Zuluaga, M. J. *Fraccionamiento de la materia orgánica del suelo en la cuenca alta del Río Claro, Caldas* (Dokterego tesia); Universidad EIA, 2016.
- (41) Anđelković, D.; Perović, J. Decrease of Oxygen Interference on Humic Acid Structure Alteration during Isolation. *Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology* 2, 163–171, 2001.

- (42) Harris, D. C. *Análisis químico cuantitativo*; 3. ed. (6. ed. original), Reverté: Barcelona, 2007.
- (43) Rambla-Alegre, M.; Esteve-Romero, J.; Carda-Broch, S. Is It Really Necessary to Validate an Analytical Method or Not? That Is the Question. *J. Chromatogr. A* 1232, 101–109, 2012.
- (44) Konieczka, P.; Namieśnik, J. *Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory: A Practical Approach*; Analytical chemistry series; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, Florida, USA, 2009.
- (45) Helal, A. A.; Murad, G. A.; Helal, A. A. Characterization of Different Humic Materials by Various Analytical Techniques. *Arab. J. Chem.* 4 (1), 51–54, 2011.
- (46) Egli, M.; Sartori, G.; Mirabella, A.; Giaccari, D. The Effects of Exposure and Climate on the Weathering of Late Pleistocene and Holocene Alpine Soils. *Geomorphology* 114 (3), 466–482, 2010.
- (47) Bhoopal Reddy, S.; Nagaraja, M.S.; Punith Raj, T.S.; Dhumgond, P.; Vignesh, N.S. Soil Humic and Fulvic Acids from Different Land Use System. *Madras Agric. J.* 99, 507-510, 2012.
- (48) Whitby, L. M.; Schnitzer, M. Humic and Fulvic Acids in Sediments and Soils of Agricultural Watersheds. *Can. J. Soil Sci.* 58, 167–178, 1978.
- (49) Silva, J. R.; Silva, D. J.; Tuão Gava, C. A.; Tavares de Oliveira, T.C.; Conceição de Freitas, M. S. Carbon in Humic Fractions of Organic Matter in Soil Treated with Organic Composts under Mango Cultivation. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 40, 2016.
- (50) Silva, A. *La Materia Orgánica Del Suelo (Doktorego tesia)*. Universidad de la república de Uruguay, Facultad de Agronomía 2004
- (51) Hori, S.; Okuda, A. Purification of Humic Acid by the Use of Ion Exchange Resin. *Soil Sci. Plant Nutr.* 7 (1), 4, 1961.
- (52) Donisa, C.; Mocanu, R.; Steinnes, E. Distribution of Some Major and Minor Elements between Fulvic and Humic Acid Fractions in Natural Soils. *Geoderma* 111 (1), 75–84, 2003.