

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**IZOTOPU ATTIECĪBU MASSPEKTROMETRIJAS
METODES PIELIETOJUMS HIBRĪDAPSES (*Populus
Tremula L. × P. Tremuloides Michx*)
DENDROĶĪMISKAJOS PĒTĪJUMOS**

BAKALaura DARBS

Autors: **Signija Zaķe**
Studenta apliecības Nr.: sz17028
Darba vadītājs: Ķīm. mag. Māris Bērtiņš

RĪGA
2020

ANOTĀCIJA

Izotopu attiecību masspektrometrijas metodes pielietojums hibrīdapses (*Populus Tremula L. × P. Tremuloides Michx*) dendroķīmiskajos pētījumos. Zaķe S., zinātniskā darba vadītājs Ķīm. mag., Bērtiņš M. Bakalaura darbs, 43 lpp., 28 attēli, 8 tabulas, 37 literatūras avoti, 2 pielikumi. Latviešu valodā.

Darbā apkopota informācija par izotopu attiecībām masspektrometrijā un hibrīdapšu dendroķīmiju, lai izpētītu gaisa piesārņojumu pagātnē. Tika pētīti koka paraugi, kas auguši dažādi mēsļotos parauglaukumos. Koka paraugs iegūts no hibrīdapses (*Populus Tremula L. × P. Tremuloides Michx*). Bakalaura darba ietvaros tika analizētas C un N izotopu attiecības. Iegūtie rezultāti tika izvērtēti un pētītas likumsakarības par izotopu attiecībām.

HIBRĪDAPSE, IZOTOPU ATTIECĪBU MASSPEKTROMETRIJA, DETEKTĒŠANAS ROBEŽA, KVANTIFICĒŠANAS ROBEŽA

ABSTRACT

Application of isotope ratio mass spectrometry for dendrochemical analysis of hybrid aspen (*Populus Tremula L. × P. Tremuloides Michx*). Zaķe S., research project supervisor Mg.Chem. Bērtiņš M. Bachelor's thesis, 43 pages, 28 figures, 8 tables, 37 literature references, 2 attachments. In Latvian.

The work summarises information about the isotope ratio mass spectrometry and hybrid aspen dendrochemistry to investigate air pollution in the past. Wood samples who has grown in various fertilised plots were studied. The wooden samples were derived from hybrid aspen (*Populus Tremula L. × P. Tremuloides Michx*). C and N isotopes were analyzed in the Bachelor's work. Regularities on isotopic ratio were searched and developed.

HYBRID ASPEN, ISOTOPE RATIO MASS SPECTROMETRY, LIMIT OF DETECTION, LIMIT OF QUANTIFICATION

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	5
IEVADS	6
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	7
1.1. Hibrīdapse	7
1.2. Dendroķīmija	8
1.3. Slāpekļa aprite dabā	8
1.4. Izotopu attiecības masspektrometrija.....	9
1.5. IRMS metodes izmantošana	10
1.6. Metodes parametri	13
1.7. Dispersijas analīze	14
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	16
2.1. Izmantotie materiāli	16
2.2. Izmantotie piederumi un aparatūra	16
2.3. Paraugu sagatavošana	16
2.4. Paraugu analīze ar vieglo stabilo izotopu attiecību masspektrometru	19
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	20
3.1. Oglekļa un slāpekļa stabilo izotopu attiecības izvērtējums koksnes paraugos	20
3.2. Slāpekļa daudzuma satura izvērtējums koksnes paraugos no dažādi mēslojiem parauglaukumiem.....	25
3.3. Oglekļa masu daļu attiecības izvērtējums koksnes paraugos	29
3.4. Kvantitatīvās un detektēšanas robežas noteikšana.....	33
3.5. Rezultātu dispersijas analīze	34
SECINĀJUMI	36
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	37
PIELIKUMI.....	40

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

IRMS	vieglo stabilo izotopu attiecību masspektrometrija (<i>Isotope ratio mass spectrometry</i>);
m/z	masas un lādiņa attiecība (<i>mass-to-charge ratio</i>);
EA-IRMS	elementu analizatora izotopu attiecības masspektrometrs (<i>Elemental Analyzer/Isotope Ratio Mass Spectrometry</i>);
δ	izotopu ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, u.c.) attiecība, ‰;
LoD	detektēšanas robeža (<i>limit of detection</i>);
LoQ	kvantitatīvās noteikšanas robeža (<i>limit of quantification</i>);
LoQ 10%	kvantitatīvās noteikšanas robeža, pie kuras noteikšanas kļūda nepārsniedz 10%;
ANOVA	dispersijas analīze (<i>Analysis of Variance</i>)
SS	kvadrātu summa (<i>sum of squares</i>)
MS	vidējie kvadrāti (<i>mean squares</i>)
df	brīvības pakāpe (<i>degree of freedom</i>)

IEVADS

Dabas ekosistēmas nodrošina dzīvajiem organismiem, izdzīvošanai nepieciešamo vidi un apstākļus. Kā jau labi zināms, tad cilvēka darbības rezultātā notikusi ekosistēmu degradācija visā pasaulē, kas atstāj negatīvu ietekmi arī uz cilvēka nākotni. Koksnei piemīt daudz un dažādu pielietojumu, jau no seniem laikiem, koks, būdams ekosistēmas produkts, tiek izmantots dažādās nozarēs, vispopulārākās no tām ir būvniecība, mēbeļu ražošana, kā arī tas tiek izmantots kā kurināmais materiāls.

Kopējais koksnes patēriņš pasaulē ar katru gadu aug, 2019.gadā Latvijā tika izcirsti 13,34 milj. kubikmetru [36].

Hibrīdapses ir ātraudzīgais kokaugs, tieši šīs īpašības dēļ tas arī nes lielu potenciālu biomasas ražošanai. Taču tas nav vienīgais hibrīdapses labums, tai piemīt arī vides kvalitātes uzlabojoši aspekti, piemēram, virszemes un gruntsūdeņu kvalitātes uzabošana [1]. Turklāt šis kokaugs var tikt izmantots kā bioindikators, respektīvi tā gadskārtu ķīmiskais sastāvs var sniegt informāciju par koka augšanas apstākļiem konkrētajā gadskārtā.

Hibrīdapses ātraudzīgums nosaka to, ka tām veidojas platas gadskārtas, kā rezultātā tās ir ļoti piemērotas dendroķīmiskajiem pētījumiem. Ir salīdzinoši viegli veikt hibrīdapses gadskārtu analīzi, izmantojot dažādas elementāranalīzes metodes, kā viena no tām ir vieglo izotopu attiecību masspektometrija (IRMS).

Darba mērķis: novērtēt vieglo stabilo elementu (C un N) masas daļas un izotopu attiecību izmaiņas hibrīdapses gadskārtās, paraudziņos, kas ņemti no hibrīdapses, kas augušas dažāda mēslojuma apstākļos.

Darba uzdevumi:

1. Iepazīties ar vieglo stabilo izotopu masspektometriju.
2. Noteikt $\delta^{15}\text{N}$ un $\delta^{13}\text{C}$ vērtības un to masas daļu koksnes paraugā, izmantojot vieglo stabilo izotopu masspektometriju.
3. Aprēķināt metodes izpildījuma parametrus – detektēšanas robežu un kvantificēšanas robežu un novērtēt optimālo parauga iesvara daudzumu.
4. Salīdzināt $\delta^{15}\text{N}$ un $\delta^{13}\text{C}$ vērtības un to masas daļas savā starpā, ņemot paraugus no dažādām gadskārtām.
5. Salīdzināt $\delta^{15}\text{N}$ un $\delta^{13}\text{C}$ vērtības un to masas daļas savā starpā, ņemot paraugus no dažādām gadskārtām hibrīdapsē, kas augušas dažādi mēslos parauglaukumos.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Hibrīdapse

Latvijā audzētā hibrīdapse ir Amerikas apses (*Populus tremuloides*) un parastās apses (*Populus tremula*) krustojums. Lai iegūtu pēcnācējus ar labu stumbra kvalitāti, augstu produktivitāti un augstu piemērotību rūpnieciskai pavairošanai, hibrīdizācijā tiek izmantotas ļoti kvalitatīvas apses [2]. Hibrīdapšu lapas ir ļoti mīkstas, bet rūgtas, līdz ar to pārnodžu iecienītas. Hibrīdapses pēc pirmās plantācijas ataug no sakņu atvasēm, tādējādi tās nav jāatjaunina pēc ražas ievākšanas [3, 4]. Tas ir viens no iemesliem kāpēc šīs apses ir pieprasītas enerģētikas izmantošanā un audzēšanā. Šos lielumus var apskatīt 1.1.tabulā [2]. Apses aug strauji, kas dod iespēju saražot daudz koksnes īsā laika periodā, tādēļ tiek pieņemts, ka Latvijā papīrmalkai tās jau var cirst 20 gadu vecumā. Šajā vecumā plantācijas vidējie rādītāji ir: koka augstums 25 m, koku caurmērs 25 cm un krāja¹ 300-450 m³/ha. Apses koksne ir piemērota papīra ražošanai, jo tai ir samērā maza diametra šķiedras ar plānām sienām [3, 4].

1.1.tabula

Enerģētiskā koksnes kvalitāte un pārrēķinu koeficienti [2]

Hibrīdās apses koksne	Raksturīgie rādītāji
Ogleklis (C)	47-51 %
Ūdeņraids (H)	5,8-6,7 %
Skābeklis (O)	40-46 %
Slāpeklis (N)	0,2-0,6 %
Hlors (Cl)	<0,01-0,05 %
Kalcijs (Ca)	4000-6000 mg·kg ⁻¹ sausnas ²
Kālijs (K)	2000-4000 mg·kg ⁻¹ sausnas
Magnijs (Mg)	200-800 mg·kg ⁻¹ sausnas
Fosfors (P)	800-1100 mg·kg ⁻¹ sausnas

¹ Krāja - viss kokaudzes saražotais koksnes tilpums 1 hektārā

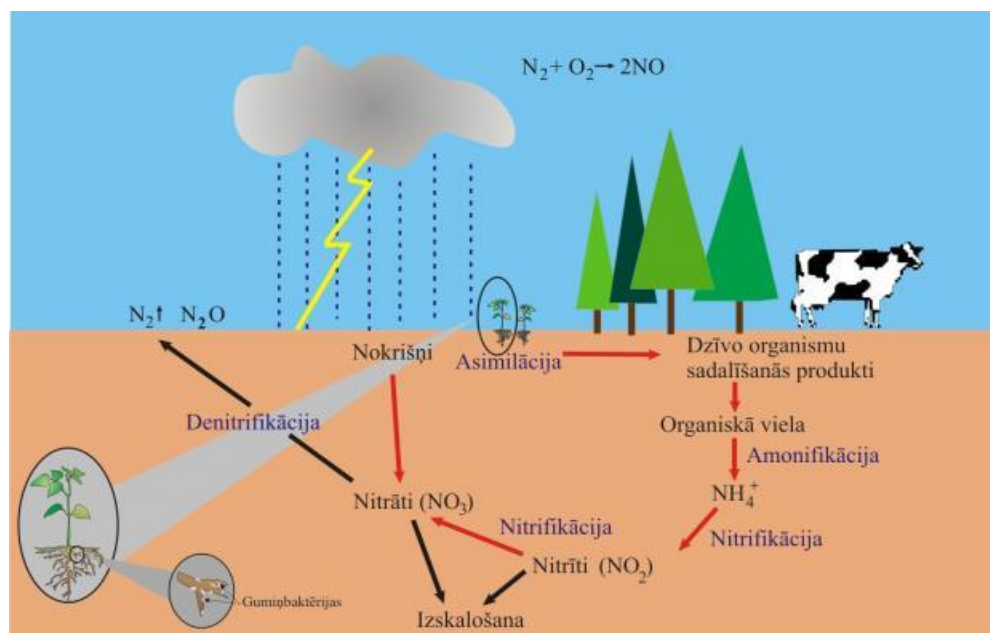
² Sausna - bezūdens vielas daudzums

1.2. Dendroķīmija

Dendroķīmija ir ķīmijas zinātne, kas izmanto minerālu daudzuma analīzi koku gadskārtās, lai noteiktu gaisa un arī augsnes piesārņojumu koka augšanas laikā [5, 6, 7]. Kā arī šī nozare tiek izmantota, lai novērtētu mēneša nokrišņu un temperatūras ietekmi uz koku gadskārtām [8]. Lai gan dendroķīmija spēj sniegt noderīgu informāciju par vidi, lai spētu izmantot dendroķīmisko uzskaiti, ir nepieciešama izpratne par koku bioloģiju [5, 6, 7]. Bioloģiskās izpausmes detaļas atšķiras atkarībā no sugas, kas joprojām ir slikti izpētītas [9]. Koka gadskārtu ķīmiskais sastāvs daļēji ir atkarīgs no koka spējas uzņemt minerālvielas. Minerālvielu uzņemšanas apjoms var atspoguļot elementu pieejamību koka tuvumā, esošajā vidē [10, 11]. Tas ir radījis ideju izmantot koka gadskārtas mikroelementu piesārņojuma biomonitoringam [12]. Viena no biomonitoringa priekšrocībām ir tāda, ka koksni ir viegli ņemt un analizēt ar parastajām metodēm [13]. Tomēr, izvēloties konkrētu koka sugu analīzei, būtu jāizvairās no tādiem kokiem, kuriem ir bijušas infekcijas vai mehāniski bojājumi, jo tie var sniegt nepatiesus rezultātus pētījumos [5, 14].

1.3. Slāpekļa aprīte dabā

Slāpekļis ir ceturtais vissastopamākais elements šūnu biomasā, un tas veido lielāko daļu Zemes atmosfēras [15]. Tas veido metabolisma (aminoskābes un proteīni), iedzimtības (nukleotīdi un nukleīnskābes) un citas nozīmīgas bioloģiskās funkcijas [16]. Kopš industriālās revolūcijas, cilvēku darbības aizvien vairāk ietekmē slāpekļa ciklu mežu ekosistēmās. Slāpekļa ciklu ietekmē ražošanas procesi, automobiļu izplūdes gāzes, mēslošanas līdzekļu plašāka izmantošana, mežu izciršana. Mežu ekosistēmās, kur slāpekļis visbiežāk ir ierobežota barības viela, palielināta nitrāta slāpekļa un amonija slāpekļa nogulsnešanās var negatīvi ietekmēt meža stāvokli. $\delta^{15}\text{N}$ slāpekļa vērtība, kas ir pieejama kokam, var tikt ietekmēta ieviešot izotopiski atšķirīgu slāpekļa avotu. Pastiprināta denitrifikācija palielina bioloģiski pieejamā nitrātu slāpekļa $\delta^{15}\text{N}$ vērtību augsnē, izdalot $\delta^{14}\text{N}$ atmosfērā (skatīt 1.1.att.) [17].



1.1.att. Slāpekļa aprīte dabā [18]

1.4. Izotopu attiecības masspektrometrija

Vieglo stabilo izotopu attiecību masspektrometrija (IRMS) ir metode, kuru izmanto, lai spētu noteikt izotopisko attiecību vai daudzumu materiālā, mērot stabilo izotopu attiecības starp tādiem vieglajiem elementiem kā $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ un $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Šo elementu izotopiskais sastāvs ir nostabilizējies (fiksēts), kad veidojās Zeme un kopš tā laika nav mainījies. Lai gan,niecīgas, tomēr ir novērojamas, tās var novērot bioloģiskos, ķīmiskos vai fizikālos procesos [19].

Ar IRMS metodi var noteikt izotopu attiecību dažādos paraugos. Tāpēc šai metodei ir plašs pielietojumu klāsts. Metode tiek pielietota dažādās nozarēs, piemēram:

- Bioloģijā – dzīvnieku un augu fizioloģija, toksikoloģija, ekoloģija, u.c.;
- Arheoloģijā;
- Vides zinātnē un monitoringā – piesārņojuma avotu identifikācija, ūdens cikla pētniecība, u.c.;
- Kriminālistikā – atšķirt viltotu produktu no oriģināla (piem., farmācijā zāles), salīdzināt dažādu ķīmisko vielu izcelšanās avotu (piem., narkotiskās vielas, šķiedras, sprāgstvielas, u.c) [20]

Stabilo izotopu dabiskā daudzuma variācijas izsaka, izmantojot deltu (δ) kā tas parādīts vienādojumos (1.1. un 1.2.):

$$(R) = \frac{\text{smagākais izotops}}{\text{vieglākais izotops}}, \text{ kur} \quad (1.1.)$$

R – Izotopu attiecība

$$\delta = \left(\frac{R_{\text{paraugs}}}{R_{\text{standartviela}}} - 1 \right) \cdot 1000, \text{ kur} \quad (1.2.)$$

R_{paraugs} – Izotopu attiecība paraugā

$R_{\text{standartviela}}$ – Izotopu attiecība standartvielā

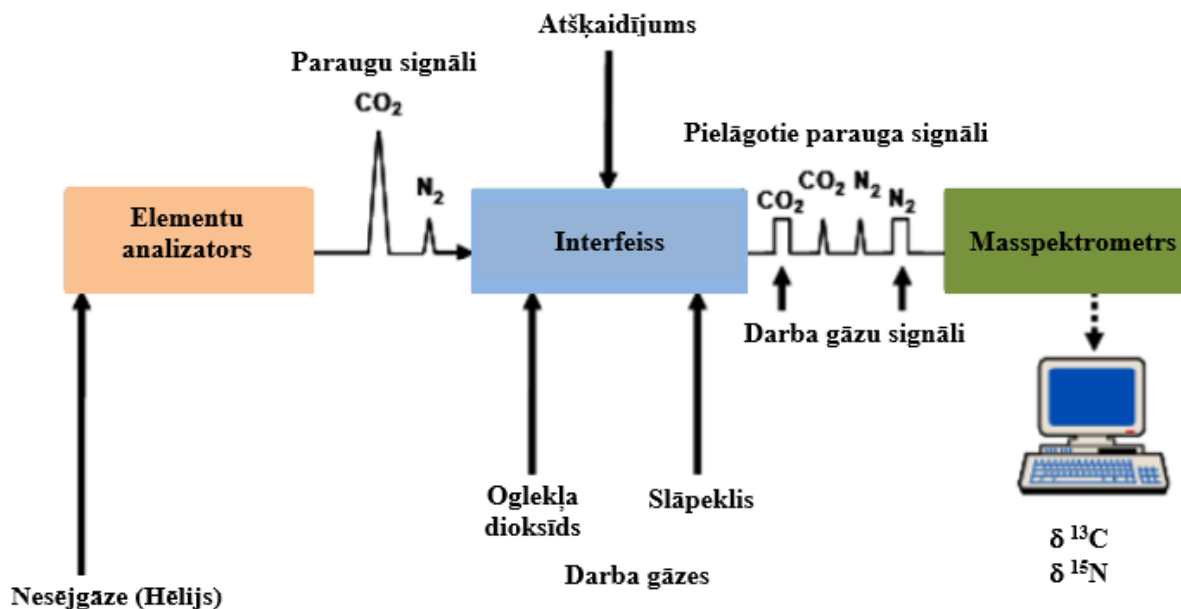
δ - parasti reizina ar 1000, lai tās uzrādītu daļās uz tūkstoti (% vai milj.) vai reizina ar 1 000 000, lai iegūtu rezultātus miljonos (ppm) [20].

1.5. IRMS metodes izmantošana

No sākuma iekārtā paraugs tiek ievietots automātiskajā paraugu ievades sistēmā un pirms izotopu attiecību analīzes veikšanas paraugi speciālos reaktoros tiek pārvērsti vienkāršās gāzēs atkarībā no tā, kādi elementu izotopi eksperimenta laikā tiks pētīti (CO, CO₂, N₂, u.c) [20].

Pirmajā - kvarca reaktorā notiek degšanas process, kas notiek, pievadot skābekli, veidojas trīs produkti: CO₂, NO_x un H₂O. Sadegšanas reaktorā temperatūras ir ļoti augstas, tās sasniedz 1030°C un pat augstāk [20, 21].

Nākamajā reaktorā noris no iepriekšējā posma pārpalikušā skābekļa atdalīšana un NO_x reducēšana līdz N₂. Šis reducēšanas reaktors ir pildīts ar ļoti tīru Cu un tā darba temperatūra ir aptuveni 650°C. Dažreiz šie abi reaktori mēdz būt apvienoti kopā. Pēc reducēšanas reaktora kameras, saražotā CO₂ un N₂ gāze tiek atdalīta hromatogrāfiskajā kolonnā. Izmantojot magnija perhlorātu, notiek ūdens uztveršana un tas tiek atdalīts no plūstošajām paraugu gāzēm. Pēc hromatogrāfijas kolonnas gāzes tiek atšķaidītas ar nesējgāzi, hēliju, tā, lai to stiprums būtu savstarpēji līdzīgs, taču, lai tie nepārslogotu detektoru. Atšķaidītās gāzes tiek ievadītas masspektometra jonu avotā pa vienai, kur tās ar elektronu kūļa palīdzību tiek jonizētas. Nosaka ¹³C un ¹⁵N izotopu attiecības. Piemēram, analizējot oglekļa izotopu attiecību, masasspektometrs monitorē (atdala) jonus, kuru masas un lādiņu attiecības ir 44, 45 vai 46, kas atbilst joniem, kuri iegūti no CO₂ molekulām un satur ¹³C, ¹²C, ¹⁸O, ¹⁷O, ¹⁶O. Izotopiem ir vairākas kombinācijas, kas atbilst dažādām masas un lādiņu attiecību vērtībām [20, 21, 22].



1.2.att. EA-IRMS shēma, $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ noteikšanai [20]

Pastāv divu veidu elementu analizatori:

- 1) Oglekļa un slāpekļa analīzē paraugs tiek sadedzināts skābekļa atmosfērā (EA-IRMS).
- 2) Ūdeņraža un skābekļa analīzē paraugs tiek pakļauts augsttemperatūras termiskajai konversijai (TC/EA-IRMS) [20].

EA-IRMS vispārīgā shēma aplūkojama 1.2.attēlā, TC/EA-IRMS shēma ir tieši tāda pati, taču vienīgā atšķirība ir tāda, ka tiek lietots augsttemperatūras konversijas elementu analizators, kā arī ar to, ka CO_2 un N_2 vietā ir CO un H_2 gan pie parauga signāliem, gan parauga signāliem un darba gāzēm [20].

Analīzi var iedalīt 4 posmos:

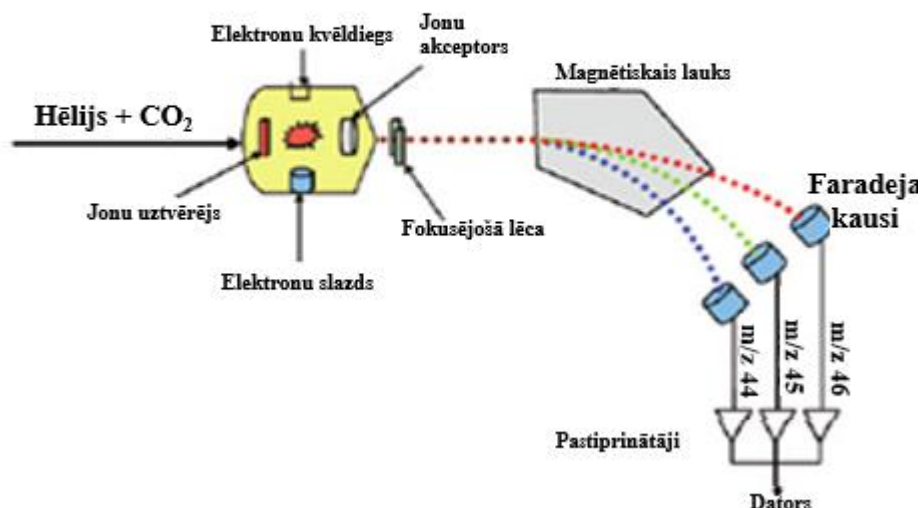
- 1) Parauga materiāla sadedzināšana vai termiska pārveidošana, izmantojot elementu analizatoru;
- 2) Izdalīto gāzu ievadīšana masspektrometra jonu avotā caur interfeisu;
- 3) Gāzu molekulu jonizācija, kam seko jonu atdalīšana un noteikšana masas spektrā;
- 4) Apstrādāto datu izvērtējums [20].

Elementu analizatoru sistēmas. EA-IRMS ir piemērojams plašam materiālu klāstam. Cietās vielas un negaistošos šķidrums var ievadīt elementu analizatora sistēmā, izmantojot alvas (C/N analīzei) vai sudraba (O/H analīzei) kapsulas, savukārt šķidrums ar ierobežotu viskozitāti var tieši injicēt, izmantojot šķidrās ieplūdes sistēmu [20].

Interfeiss. Lai savienotu masspektrometru ar elementu analizatoru, ir nepieciešams interfeiss. Tas ierobežo ievadītās gāzes tilpumu masspektrometrā un nepieciešamības gadījumā atšķaida parauga gāzi ar hēliju. Tāpēc ir iespējams veikt gan $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, gan $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ izotopu attiecības mērījumus paraugā vienlaicīgi [20].

Masspektrometrs. Jonu avotā masspektrometra gāzes molekulas tiek jonizētas, mijiedarbojoties ar elektronu staru kūli (elektronu jonizācija) [21]. Atšķirībā no parastajiem masspektrometriem, kuros tiek lietots tikai viens detektors, IRMS metodē slāpekļa un oglekļa attiecību mērījumiem izmanto trīs Faradeja kausu detektorus [20, 23]. Joni, pirms sasniedz Faradeja kausu detektorus, šķērso magnētisko lauku (skat.1.3.att.). Magnētiskā lauka stiprumu nosaka jonu plūsmas trajektorija un līdz ar to, arī to, kuri joni ieies Faradeja kausos. Analizējot slāpekļa un oglekļa attiecības, ir nepieciešami trīs Faradeja detektori, kas var būt divi specifiskos attālumos novietoti komplekti tieši m/z 28 un 29 vai m/z 44, 45 un 46 molekulāro jonu savākšanai. Vai arī ir iespējams universāls trīskāršs detektors, kura ārējie kausi ir plati attiecībā pret jonu stara dispersiju [20].

Izotopu attiecību masas spektrometrija



1.3.att. Izotopu attiecības masspektrometra shēma [21]

Gāzveida paraugi tiek ievadīti masspektrometra jonizācijas šūnā. Paraugs sadurās ar elektronu kūli, kura rezultātā molekulas zaudē elektronus un tādējādi rodas pozitīvie joni. Šie pozitīvie joni tiek izvadīti no šūnas un tiek sadalīti magnētiskajā laukā, atkarībā no masas un lādiņa (m/z) attiecības. Tālāk atdalītie joni nonāk kolektorā, kas sastāv no 3-8 Faradeja kausiņiem. Tiek pastiprināts analītiskais signāls un dati tālāk tiek nosūtīti uz datoru. Datorā šos datus apstrādā, integrējot pīķus un rēķinot izotopu attiecības [24, 25].

1.6. Metodes parametri

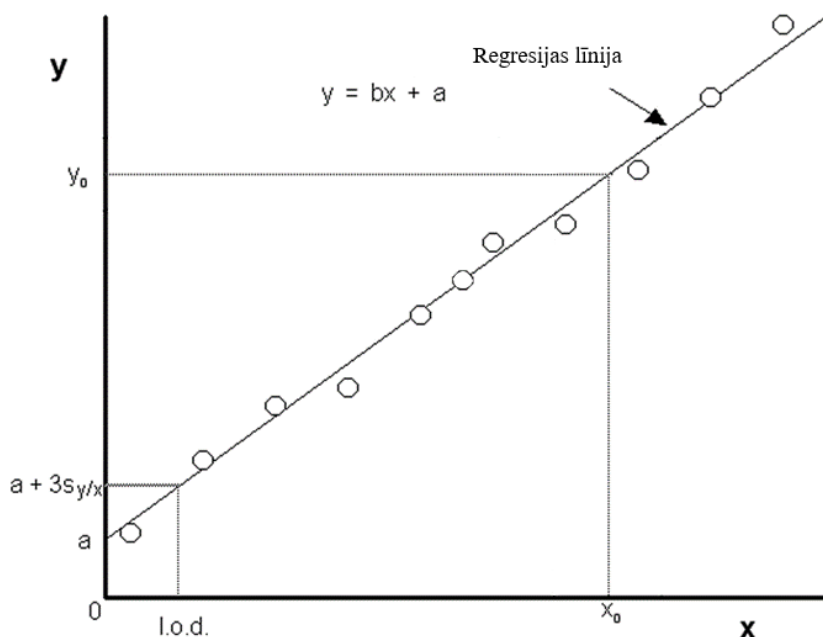
Mazākā nosakāmā koncentrācija

Metodes noteikšanas robežas detektēšanas robeža (LoD vai DL) un kvantitatīvās noteikšanas robeža (LoQ vai QL) ir termini, ko izmanto, lai aprakstītu analīta mazāko koncentrāciju, kuru var ticami izmērīt ar konkrēto mērīšanas procedūru [26]. Noteikšanas robeža un kvantitatīvās robežas parametri ir saistīti, bet tiem ir atšķirīgas definīcijas, un tos nedrīkst sajaukt [27].

LoD nozīmīgums. Detektēšanas robežu uzskata par analizējamās vielas zemāko koncentrāciju paraugā, ko var noteikt attiecīgajam paraugam, instrumentam un metodes tipam [27]. Ja tiek mērīts tāds paraugs, kura koncentrācija ir mazāka par šo lielumu (vai ja nolasījums nav

atšķirams no bāzes līnijas), tad nevar apgalvot, ka paraugā nav attiecīgās analizējamās vielas, jo vienmēr pastāv iespēja, ka tā ir, bet nav nosakāmā daudzumā [28].

Šo daudzumu var nosakaidrot, piemēram, izmantojot kalibrēšanas taisnes metodi. Ne vienmēr ir praktiski veikt vairākas tukšas noteikšanas. Tāpēc alternatīva procedūra ir tieši izmantot kalibrēšanas datus un regresijas līniju. Šajā gadījumā mazāko uztveramo signālu aprēķina no regresijas līnijas krustpunkta ar ordinātu asi un standarta kļūdas [28].



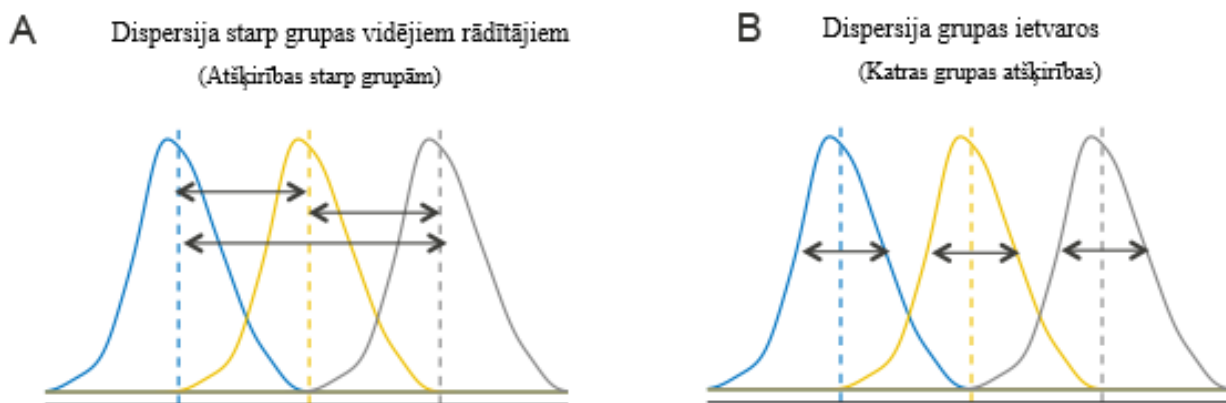
1.4.att. Noteikšanas robežas aprēķināšanas grafiskais attēlojums no regresijas līnijas [28]

LoQ nozīmīgums. Kvantificēšanas robeža ir mazākā analizējamās vielas koncentrācija paraugā, ko var noteikt ar pieņemamu precizitāti [27, 29]. No šīs zemākās analīzes koncentrācijas var izrēķināt mazāko parauga masu, kura ir nepieciešama, lai varētu izanalizēt gan iegūtos rezultātus, gan paredzēt nepieciešamo masu, lai būtu precīzāks rezultāts. Par šīs metodes precizitāti var spriest pēc relatīvās kļūdas [28].

1.7. Dispersijas analīze

Dispersijas analīze (ANOVA) ir viena no visbiežāk izmantojamām statistiskajām analīzēm ekoloģiskajos pētījumos. Daudzi zinātnieki ekoloģijas jomā izmanto ANOVA, lai pārbaudītu, vai vidējie rādītāji vairāk nekā divām grupām ir vienādi vai nē [30, 31, 32].

Tas ir t-testa pagarinājums, kurā tiek pārbaudīts, vai divu grupu vidējie rādītāji ir vienādi. Apskatot 1.5.att., var redzēt trīs dažādu grupu vidējos rādītājus. Attēlā novērojams piemērs, kad visu triju grupu vidējie rādītāji nav tik atšķirīgi, dispersija starp grupām (visu triju vidējo vērtību dispersija) būtu ļoti maza. Tomēr, jāņem vērā arī atšķirības grupas ietvaros (katra datu dispersija no grupas vidējās vērtības) [30, 31, 32].



1.5.att. Dispersijas analīzes koncepcija [33]

Ja starp grupu dispersija ir lielāka salīdzinājumā ar vienas grupas ietvaru dispersiju, tad var teikt, ka šo trīs grupu vidējie rādītāji ir ievērojami atšķirīgi. Lai pārbaudītu nulles hipotēzi (“Visu triju vidējie rādītāji ir vienādi”), ir jāreķina attiecība starp grupas dispersiju un dispersiju grupas ietvaros, iegūstot lieluma F vērtību. Tālāk var pārliicināties par to, vai F vērtība ir pietiekami liela, lai noraidītu nulles hipotēzi ar 95 % ticamības pakāpi. Lai to izdarītu, no sākuma ir jāaprēķina kvadrātu summa (SS), kas parāda atšķirības starp grupām un grupu ietvaros. Katru kvadrāta summu iedala pēc tā brīvības pakāpes (df). Savukārt zinot šo lielumu, ir iespēja aprēķināt vidējos kvadrātus (MS) starp grupām un grupu ietvaros, tas parādīts vienādojumos (1.3. un 1.4.) [30, 31, 32]:

$$MS_{\text{starp grupām}} = \frac{SS_{\text{starp grupām}}}{df_{\text{starp grupām}}} \quad (1.3.)$$

$$MS_{\text{grupu ietvaros}} = \frac{SS_{\text{grupu ietvaros}}}{df_{\text{grupu ietvaros}}} \quad (1.4.)$$

Lielumu F aprēķina kā attiecību MS starp grupām pret MS grupu ietvaros [30, 31, 32].

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Izmantotie materiāli

- Izotopu references materiāls USGS-40; L-glutamīnskābe (analītiskas tīrības, Sigma-Aldrich);
- Nesējgāze He (Hēlijs) (99,999 %, izplatītājs AGA);
- oksidētājgāze O₂ (skābeklis) (99,999 %, izplatītājs AGA);
- References/darba gāze CO₂ (oglekļa dioksīds) (99,995 %, izplatītājs AGA);
- References/darba gāze N₂ (slāpeklis) (99,999 %, izplatītājs AGA);

Drošības lapa par izmantotajiem reaģentiem apskatāma 1.pielikuma 1.tabulā.

2.2. Izmantotie piederumi un aparatūra

- Analītiskie sviri “SARTORIUS MICRO PRO 11 ULTRA PRECISION”, precizitāte ±0,0001 g;
- Alvas kapsulas (5x9 mm, EuroVector);
- Skalpelis
- Pincetes (2x)
- Masspektrometrs “Nu-HORIZON”. (Spriegums C un N elementu analīzei 5 kV, masu diapazons no 2 līdz 100 Da)
- Elementanalizators “EURO EA3024-IRMS” (sadeģšanas reaktora temperatūra ir 1030°C, reducēšanas reaktora temperatūra ir 650°C)

2.3. Paraugu sagatavošana

Parauga vākšana. Paraugus ievāca no sešus gadus veciem hibrīdapses kokiem, kas audzēti Latvijas centrālajā daļā, Ziemeļaukos, Skrīveru novadā (koordinātes - 56°41 N un 25°08 E).

Darbā analizēja 4 hibrīdapšu paraugus no dažādiem parauglaukumiem, paraugs nr. 9 izmantots kā kontrole (nemēslots), paraugs nr. 8 mēslots ar notekūdeņu dūņām, paraugs nr. 7 mēslots ar stabilizētiem koksnes pelniem, savukārt paraugs nr. 6 mēslots ar digestātu [34] (skatīt 2.1.att.).

Hibrīdapses augsnes struktūra sastāv no dominējošā māla (0-20 cm dziļumā) un no smilšmāla (20-80 cm dziļumā) [34].

Pamatmēslojuma raksturojums [34]

Pamatmēslojums	Izcelsme	Deva	Izkliedes veida	Ar mēslojumu ienestais barības elementu daudzums		
				N _{kop} , kg·ha ⁻¹	P _{kop} , kg·ha ⁻¹	K _{kop} , kg·ha ⁻¹
Stabilizēti koksnes pelni	Siguldas katlu māja	6 t sausna ha ⁻¹	mehāniska izkliede	2,6	65	190
Digestāts	Metāna reaktors Vecaucē	30 t ha ⁻¹	punktveida	69	1,2	99
Notekūdeņu attīrīšanas dūņas	SIA "Aizkraukles ūdens"	10 t sausna ha ⁻¹	mehāniska izkliede	259	163	22

Kā hibrīdapses augsnes pamatmēslojums tika izmantots notekūdeņu attīrīšanas dūņas, stabilizēti koksnes pelni un digestāts. Kā arī paralēli šiem parauglaukumiem tika izveidots kontroles parauglaukumi, kuros netika ienests pamatmēslojums (2.1.tabula) [34].

Apšu hibrīdu paraugkoku raksturojums [34]

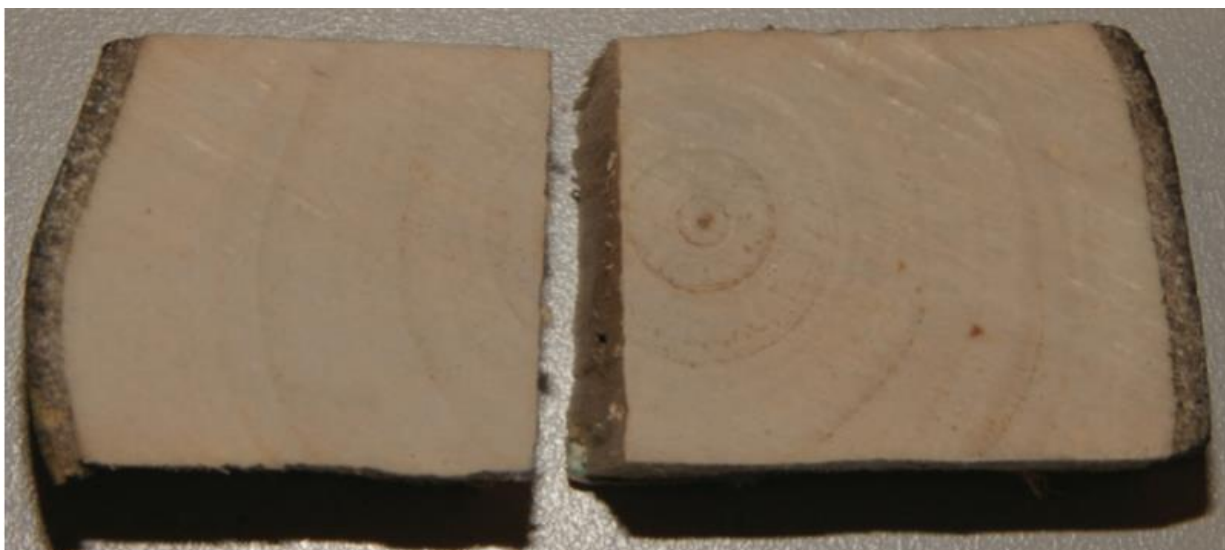
Pamatmēslojuma veids	Paraugkoka Nr.	Koka augstums, m	Dabiskā nitrāta stumbra biomasa, kg	Dabiski mitra zaru biomasa, kg	Krūšaugstuma caurmērs, mm
Kontrole	A 1	8,25	12,10	2,95	63
	A 5	9,14	17,10	4,10	71
	A 9	9,82	17,52	4,88	75
Dūņas	A 2	9,16	16,26	3,88	76
	A 8	9,81	23,10	7,42	89
	A 11	8,91	20,22	7,86	86
Digestāts	A 3	9,70	20,94	8,52	83
	A 6	11,20	32,58	11,66	95
	A 10	10,83	29,84	8,50	94
Pelni	A 4	7,25	12,22	5,18	65
	A 7	8,93	17,82	8,34	81
	A 12	6,53	5,82	1,50	52

Bakalaura darbam atlasīja paraugus, kas auguši dažāda mēslojuma apstākļos. No katra parauglaukuma atlasīja trīs koka paraugus (2.2.tabula) [34].

Koksnes diskus zāgēja 0,20 m augstumā, lai paraugs attēlotu visus koku gadskārtas (kopā sešas), bet koku disku biezums ir ~ 2 cm. Diskus žāvēja 70°C temperatūrā un slīpēja ar smilšpapīru. Tālāk tos sadalīja gabalos ar maksimālo diametru 4,0 cm (skatīt 2.2.att.) [34].



2.1.att. Koksnes parauga ievākšanas vieta [35]



2.2.att. Hibrīdapses koka stumbra paraugs [34]

2.4. Paraugu analīze ar vieglo stabilo izotopu attiecību masspektrometru

Oglekļa un slāpekļa izotopu attiecības noteikšana. Uz analītiskajiem svāriem (precizitāte $\pm 0,0001$ g) alvas kapsulās iesvēra $\sim 4,0$ mg parauga. Alvas kapsulas uzmanīgi aizlocīja ciet ar pincesu palīdzību, lai iesvērtie iesvari neizbirtu ārā un, lai kapsulas iekšpusē nebūtu iekļuvis slāpeklis. Tā sagatavoja 24 paraugus no katra koksnes diska, kur paraugi ņemti no katras gadskārtas pa 3 paraugiem (kopā 6 gadskārtas + miza).

Līdzīgi kā paraugiem, sagatavoja L-glutamīnskābes standartus kalibrēšanas grafika izveidei, attiecīgi tika iesvērti 220 μg , 410 μg , 580 μg , 800 μg , 1220 μg , 1420 $\mu\text{g} \pm 50$ μg . Pēc paraugu sagatavošanas, nosvērtās L-glutamīnskābes paraugus ievietoja iekārtas automātiskajā paraugu ievades sistēmā un analizēja. Ar EA-IRMS palīdzību mērīja C un N stabilo izotopu attiecības. Iegūtos datus apstrādāja. Ik pēc desmit koksnes paraugu analīzēm ievadīja vienu L-glutamīnskābes standarta kontroles paraugu, lai sekotu iegūto vērtību stabilitātei.

Aprēķināja L-glutamīnskābes standarta sastāva C un N procentuālo daļu (skat. 2.3.tabula).

2.3.tabula

L-glutamīnskābes standarta C un N procentuālais sastāvs

$W_N, \%$	10
$W_C, \%$	41

Procentuālais sastāvs tika aprēķināts pēc formulas:

$$W_N = \frac{n \cdot M_N}{M_{C_5H_9NO_4}} \cdot 100 \rightarrow \frac{1 \cdot 14,01 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}}{147,13 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \cdot 100 = 10 \%,$$

$$W_C = \frac{n \cdot M_C}{M_{C_5H_9NO_4}} \cdot 100 \rightarrow \frac{5 \cdot 12,01 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}}{147,13 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \cdot 100 = 41 \%, \text{ kur}$$

n – Oglekļu skaits L-glutamīnskābē ($C_5H_9NO_4$);

M_C – Oglekļa atommasa, $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$;

$M_{C_5H_9NO_4}$ – L-glutamīnskābes molmasa, $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Bakalaura darba ietvaros hibrīdapses koksnes paraugos, kas tika iegūti no dažādi mēslojiem parauglaukumiem, izmantojot IRMS metodi, noteikta C un N stabilo izotopu attiecība hibrīdapses šķērs griezuma dažādās gadskārtās.

3.1. Oglekļa un slāpekļa stabilo izotopu attiecības izvērtējums koksnes paraugos

Pētot N izotopu attiecību hibrīdapses paraugu gadskārtās, novērojams, ka korelācija ir diezgan maza. Taču ir novērota salīdzinoši liela atšķirība starp $\delta^{15}\text{N}$ vērtībām gadskārtās un mizā, kas būtu skaidrojams ar dažādiem hibrīdapses fizioloģiskiem procesiem, kas norit mizā un gadskārtās. Savukārt, aplūkojot C izotopisko saturu, var redzēt, ka arī tas ir mainīgs, taču $\delta^{13}\text{C}$ vērtības variē mazākā intervālā salīdzinot ar N (-26 līdz -30 ‰).

3.1. tabula

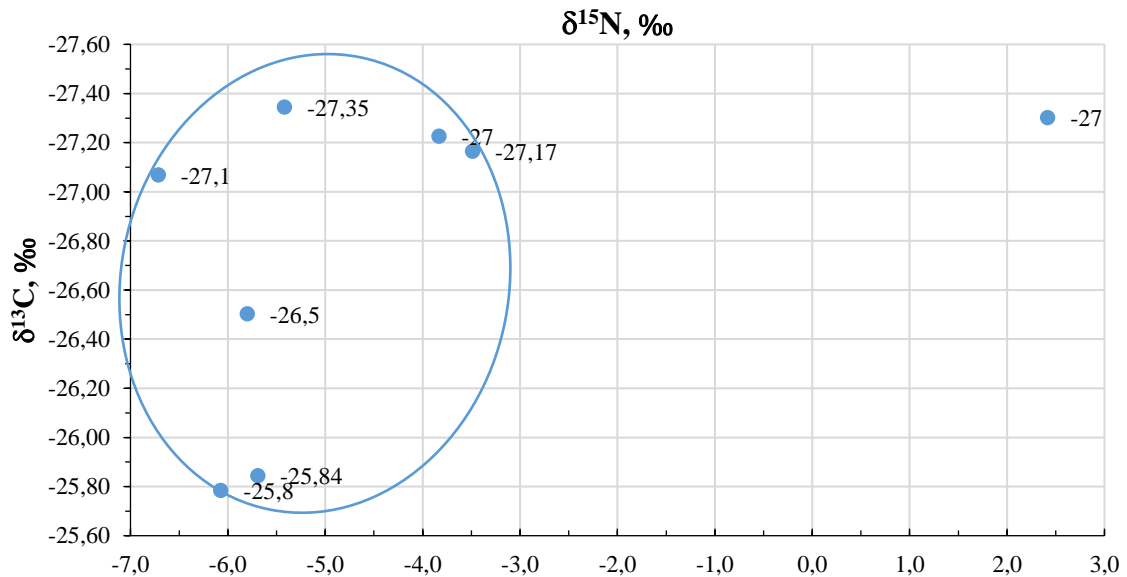
Izotopu $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ vidējās vērtības atkarībā no gadskārtām pirmajā koksnes paraugā

Pamat-mēslojuma veids	Parauga nr.	Vieta koksnes diskā	$\delta^{15}\text{N}$, ‰	$\delta^{13}\text{C}$, ‰	W_N , %	W_C , %
Mēslojums ar digestātu	6	Kodols	$-3,5 \pm 0,8$	$-27,17 \pm 0,06$	$0,185 \pm 0,005$	$48,0 \pm 0,4$
		1.gadskārta	$-5,4 \pm 1,1$	$-27,35 \pm 0,03$	$0,174 \pm 0,004$	$47,45 \pm 0,10$
		2.gadskārta	$-6,7 \pm 1,2$	$-27,1 \pm 0,5$	$0,1608 \pm 0,0014$	$47,7 \pm 0,9$
		3.gadskārta	$-5,7 \pm 0,2$	$-25,84 \pm 0,06$	$0,1777 \pm 0,0012$	$47,319 \pm 0,012$
		4.gadskārta	-6 ± 2	$-25,8 \pm 0,4$	$0,157 \pm 0,004$	46 ± 2
		5.gadskārta	-6 ± 2	$-26,5 \pm 0,3$	$0,171 \pm 0,013$	43 ± 5
		6.gadskārta	$-4 \pm 0,4$	$-27 \pm 0,2$	$0,18 \pm 0,005$	$46,2 \pm 2$
		Miza	$2 \pm 0,4$	$-27 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,005$	$46,6 \pm 2$
Mēslojums ar notekūdeņu dūņām	8	Kodols	-4 ± 0	$-26,5 \pm 0,3$	$0,169 \pm 0,004$	47 ± 2
		1.gadskārta	-4 ± 1	$-27,5 \pm 0,4$	$0,159 \pm 0,010$	$47,2 \pm 0,6$
		2.gadskārta	$-4,1 \pm 0,5$	$-26,4 \pm 0,2$	$0,163 \pm 0,005$	46 ± 2
		3.gadskārta	-5 ± 0	$-25,3 \pm 0,2$	$0,1563 \pm 0,0010$	$46,4 \pm 0,7$
		4.gadskārta	-7 ± 4	$-27,59 \pm 0,13$	$0,166 \pm 0,006$	$46,6 \pm 0,6$
		5.gadskārta	$-6 \pm 0,4$	$-28 \pm 0,2$	$0,16 \pm 0,005$	$46,6 \pm 2$
		6.gadskārta	$-6,5 \pm 0,3$	$-28,50 \pm 0,12$	$0,175 \pm 0,006$	$46,3 \pm 0,3$
		Miza	$-0,3 \pm 0,2$	$-30,8 \pm 0,2$	$0,61 \pm 0,05$	$47,8 \pm 0,3$

3.1.tabulas turpinājums

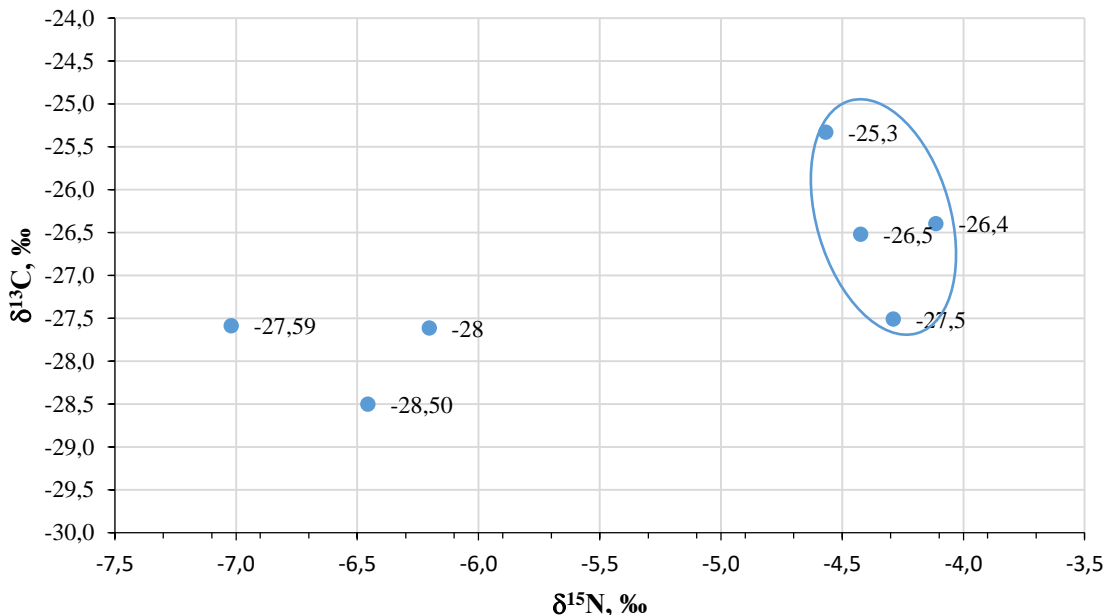
Mēslojums ar stabilizētiem koksnes pelniem	7	Kodols	-6 ± 1	$-26,5 \pm 0,2$	$0,148 \pm 0,012$	$45,9 \pm 0,8$
		1.gadskārta	-7 ± 1	$-26,7 \pm 0,2$	$0,130 \pm 0,008$	$46,6 \pm 0,9$
		2.gadskārta	-7 ± 0	$-26,4 \pm 0,2$	$0,162 \pm 0,004$	$46,5 \pm 0,8$
		3.gadskārta	$-7,3 \pm 1,4$	$-25,95 \pm 0,13$	$0,149 \pm 0,002$	$46,8 \pm 0,5$
		4.gadskārta	$-10,8 \pm 0,8$	$-26,2 \pm 0,2$	$0,143 \pm 0,002$	$46,9 \pm 0,4$
		5.gadskārta	-9 ± 3	$-26,8 \pm 0,7$	$0,147 \pm 0,004$	$46,4 \pm 0,6$
		6.gadskārta	-7 ± 1	$-28,07 \pm 0,03$	$0,163 \pm 0,005$	$46,0 \pm 0,4$
		Miza	$-0,6 \pm 0,3$	$-29,2 \pm 0,2$	$0,43 \pm 0,04$	$47,4 \pm 0,2$
Nemēslojums (kontrola)	9	Kodols	$-3 \pm 0,4$	$-30 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,04$	$48,2 \pm 0,4$
		1.gadskārta	$-4 \pm 0,4$	$-29 \pm 0,2$	$0,22 \pm 0,04$	$47,4 \pm 0,4$
		2.gadskārta	$-3,5 \pm 1,2$	$-28,14 \pm 0,12$	$0,215 \pm 0,006$	$47,0 \pm 0,3$
		3.gadskārta	$-4,1 \pm 0,6$	$-27,85 \pm 0,09$	$0,224 \pm 0,005$	$46,6 \pm 0,4$
		4.gadskārta	$-4,1 \pm 0,6$	$-26,89 \pm 0,10$	$0,244 \pm 0,007$	$46,7 \pm 0,2$
		5.gadskārta	$-3,8 \pm 0,4$	$-26,81 \pm 0,10$	$0,236 \pm 0,004$	$46,5 \pm 0,3$
		6.gadskārta	$-0,3 \pm 0,4$	$-31 \pm 0,2$	$0,84 \pm 0,04$	$47,6 \pm 0,4$
		Miza	$-0,02 \pm 0,03$	$-30,1 \pm 0,5$	$0,95 \pm 0,03$	$48,0 \pm 1,4$

Iegūtie rezultāti tika attēloti grafiski $\delta^{15}\text{N}$ pret $\delta^{13}\text{C}$, lai vizuāli varētu novērot iegūto rezultātu korelāciju starp gadskārtām dažādos koka paraugos (skat. 3.1.-3.5.att.).



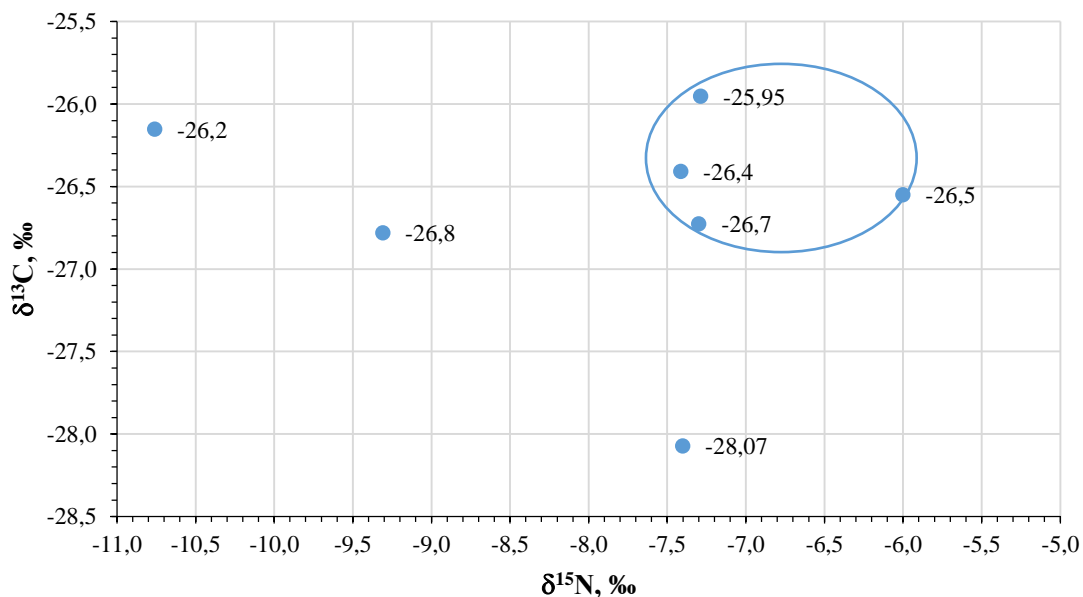
3.1.att. Izotopu $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ vidējās vērtības atkarībā no gadskārtām ar digestātu mēslotajā koksnes paraugā

Kā redzams 3.1.attēlā, tad nav būtisku atšķirību starp $\delta^{13}\text{C}$ vērtībām. Attēlā redzams, ka paraugā, kas mēslots ar digestātu, visaugstākās $\delta^{15}\text{N}$ vērtības ir novērojamas tieši mizas apvidū, kur tas sasniedz līdz pat 2 ‰. Savukārt viszemākās $\delta^{15}\text{N}$ vērtības ir novērojamas 2.gadskārtā, kur tā vērtība sasniedz -6,7 ‰.



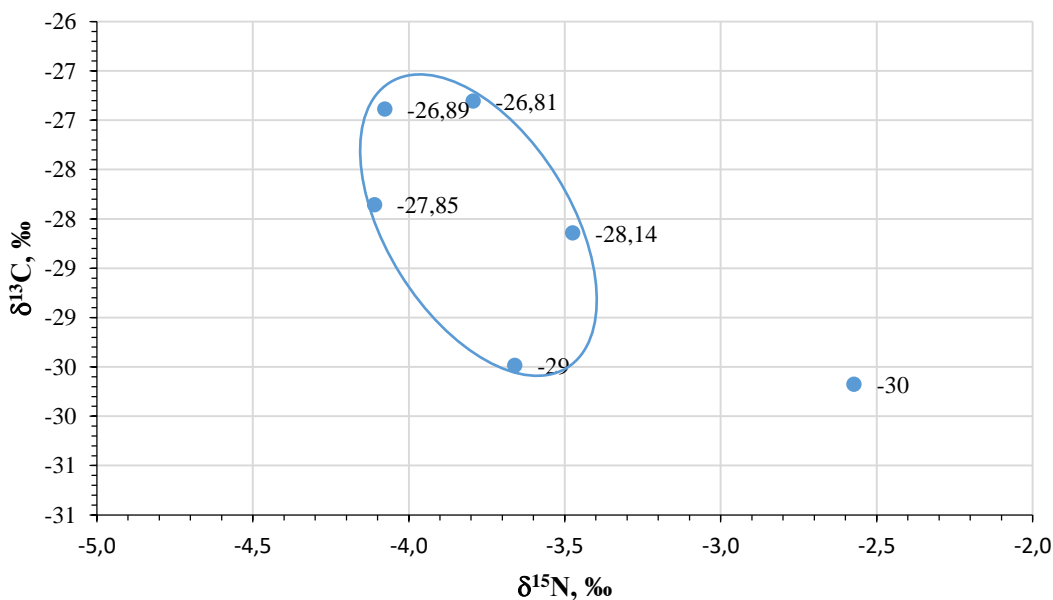
3.2.att. Izotopu $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ vidējās vērtības atkarībā no gadskārtām ar notekūdeņu dūņām mēslotajā koksnes paraugā

Paraugā, kas mēslots ar notekūdeņu dūņām, (3.2.att.) redzama liela rezultātu izkliede starp gadskārtām. Šeit ir novērojamas atšķirības ne tikai starp $\delta^{15}\text{N}$ vērtībām, bet arī starp $\delta^{13}\text{C}$ vērtībām. Viens no iemesliem, kāpēc oglekļa attiecību daudzumi ir tik atšķirīgi, varētu būt uzņemta ūdens daudzuma ietekme. Arī šeit augstākās $\delta^{15}\text{N}$ vērtības novērojamas mizā.



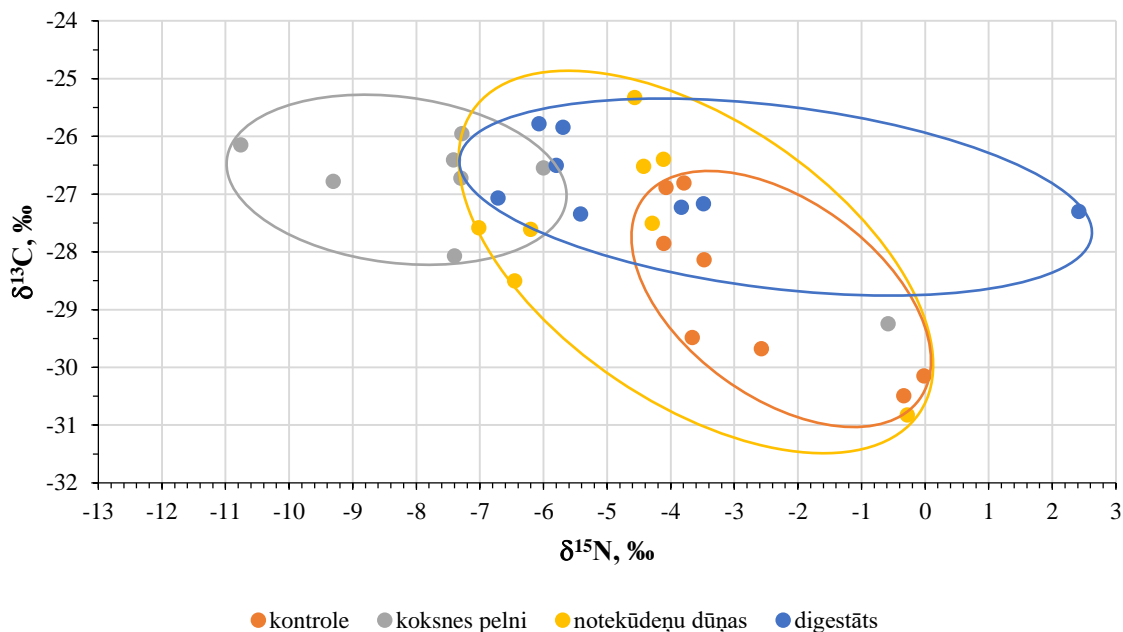
3.3.att. Izotopu $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ vidējās vērtības atkarībā no gadskārtām ar stabilizētiem koksnes pelniem mēslotajā koksnes paraugā

Līdzīgi kā paraugā, kas mēslots ar notekūdeņu dūņām, 3.3.attēlā, novērojama liela rezultātu izkliede. Tā kā katrs paraugs ir audzis dažādi mēslotos parauglaukumos, to rezultāti var atšķirties. Lai gan aplūkojot 3.3.attēlu, redzams, ka nav nekādu būtisku atšķirīgu starp $\delta^{13}\text{C}$ vērtībām, tās vairāk novērojamas starp $\delta^{15}\text{N}$ vērtībām. Tieši tāpat kā iepriekšējos divos paraugos, respektīvi paraugā, kas mēslots ar digestātu un paraugā, kas mēslots ar notekūdeņu dūņām, lielākās novērotās $\delta^{15}\text{N}$ vērtības ir hibrīdapses mizā.



3.4.att. Izotopu $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ vidējās vērtības atkarībā no gadskārtām nemēslotajā koksnes paraugā

Kontroles paraugā jeb nemēslotajā paraugā nav novērojamas būtiskas atšķirības starp $\delta^{13}\text{C}$ vērtībām (3.4.att.). Līdzīgi kā paraugā, kurš mēslots ar digestātu, kontroles paraugā nav novērojama liela izkliede starp iegūtajiem rezultātiem. Tieši tāpat kā visos iepriekšējos paraugos, arī šim paraugam lielākās novērotās $\delta^{15}\text{N}$ vērtības ir hibrīdapses mizā

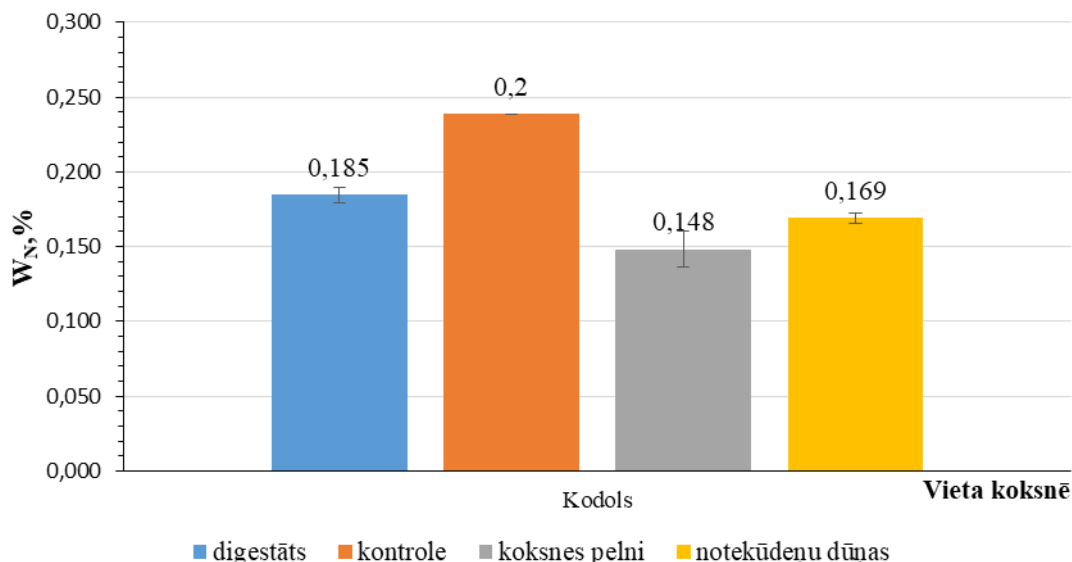


3.5.att. Izotopu $\delta^{13}\text{C}$ un $\delta^{15}\text{N}$ vidējās vērtības atkarībā no gadskārtām visos koksnes paraugos

Kā redzams 3.5.attēlā, iegūto rezultātu izkliede visos paraugos nav pārāk liela. Ja salīdzina izkliedi starp koka gadskārtām katrā paraugā, tad visaugstākā $\delta^{15}\text{N}$ vērtību izkliede novērota paraugā, kurš audzis ar notekūdeņu dūņām mēslotajā parauglaukumā..

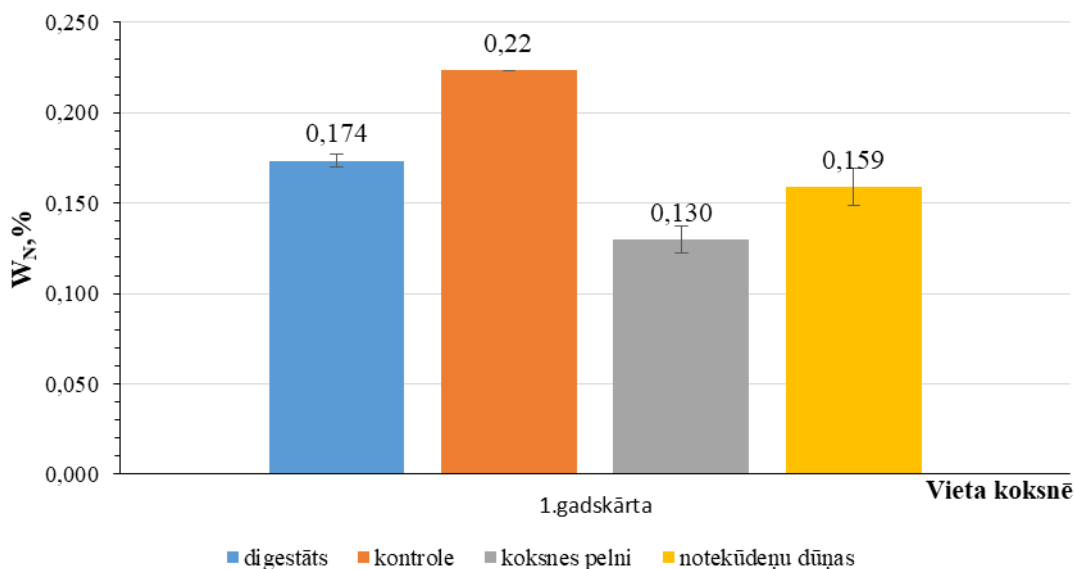
Pēc šo nobīžu rezultātiem var spriest par to, cik labi ir bijis mēslots koks un to, cik daudz minerālvielu viņš ir uzņēmis konkrētajās gadskārtās. Ja tās viena no otras krasi atšķiras, tad tas liecina par to, ka kādā gadā koks uzņēmis vairāk minerālvielu, nekā citā. Kā arī to, vai ir atšķirība starp koksni, ja koki auguši dažādi mēslošanos parauglaukumos. Apskatot visus rezultātus, var secināt, ka lielākās novērotās $\delta^{15}\text{N}$ vērtības ir hibrīdapses mizā. Savukārt $\delta^{13}\text{C}$ vērtība visos paraugos savstarpēji ir līdzīga un starp tiem nav novērojama būtiska atšķirība.

3.2. Slāpekļa daudzuma saturs izvērtējums koksnē paraugos no dažādi mēslotiem parauglaukumiem



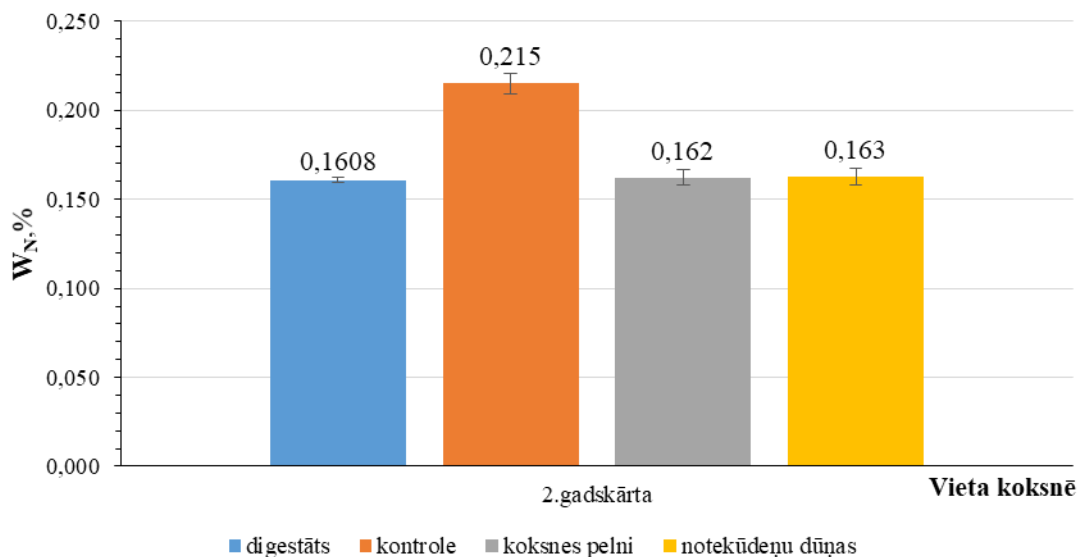
3.6.att. N vidējā masas daļas koksnē kodolā visos paraugos

Kā redzams 3.6.attēlā, tad kodolā slāpekļa masas daļas paraugā, kas mēslojts ar digestātu un kontroles paraugā ir aptuveni vienādas, tas ir ~0,2 %, bet paraugā, kas mēslojts ar koksnē pelniem un paraugu, kas mēslojts ar notekūdeņu dūņām skaitliskās vērtības ir ~0,15 un ~0,17 %.



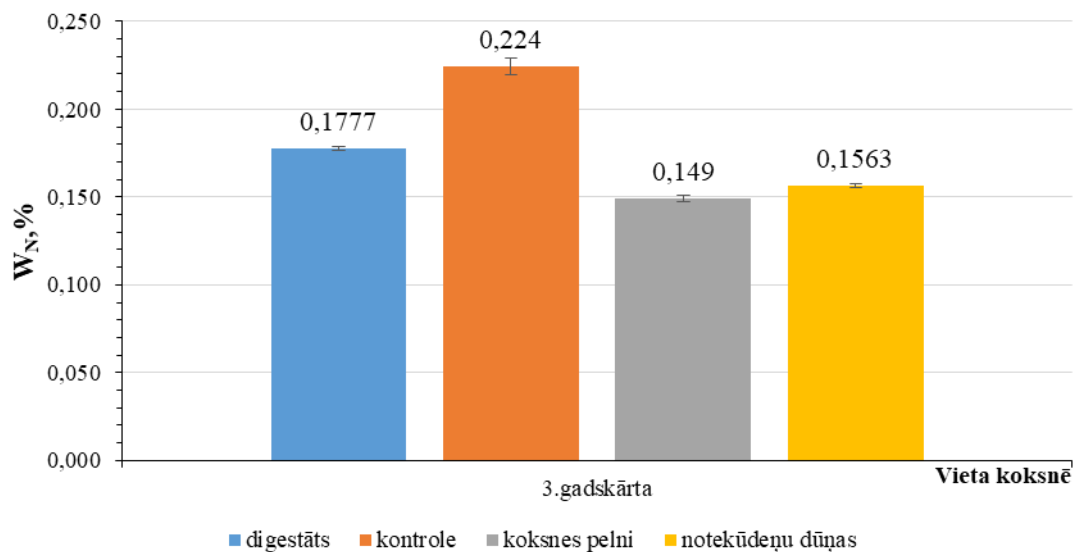
3.7.att. N vidējā masas daļas koksnē 1.gadskārtā visos paraugos

Hibrīdapšu paraugu 1.gadskārtā ir novērojama rezultātu izkliede, to var redzēt 3.7.attēlā, vislielākā slāpekļa masas daļa ir novērojama nemēslotajā (kontrolē) paraugā, tā sniedzas līdz 0,22%.



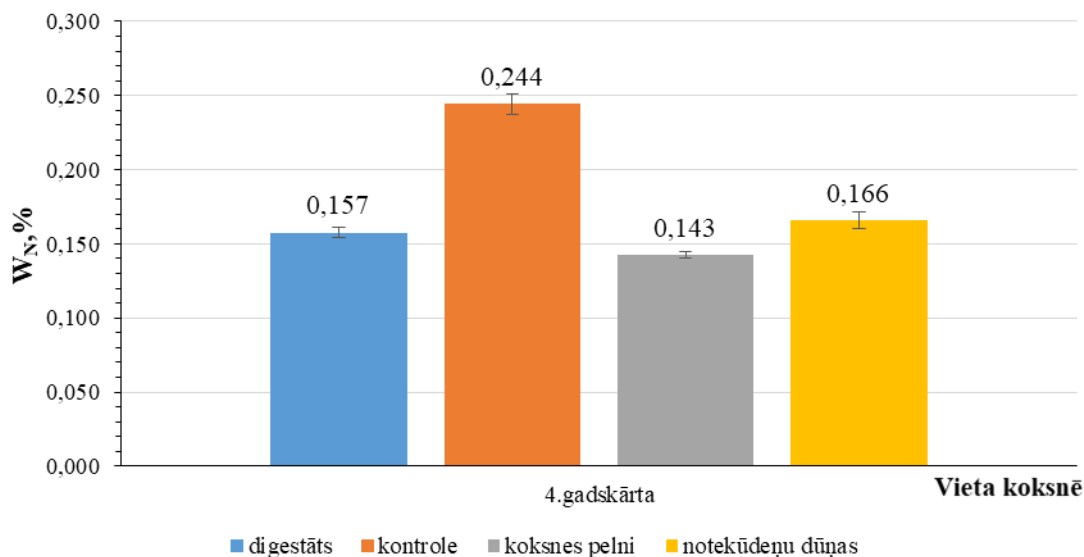
3.8.att. N vidējā masas daļas koksnē 2.gadskārtā visos paraugos

3.8.attēlā rezultātus varētu iedalīt divās grupās, viena, kur iegūtie slāpekļa masas daļas dati ir ~0,16 %, tie ir paraugi, kas mēsloti ar digestātu, stabilizētiem koksnē pelniem un notekūdeņu dūņām un otra, kur ~0,2 %, paraugi, kas nav mēsloti.



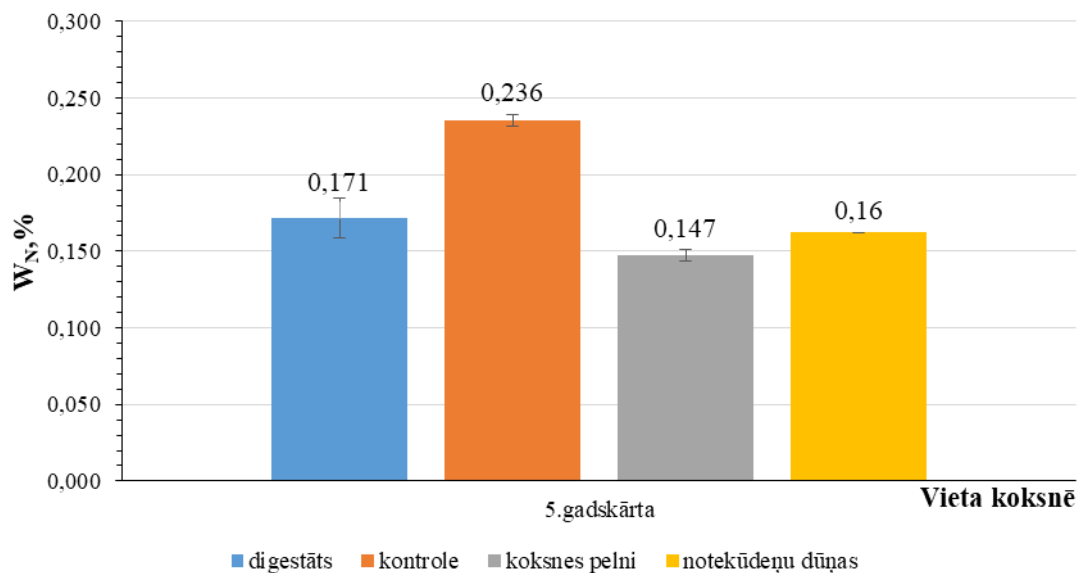
3.9.att. N vidējā masas daļas koksnē 3.gadskārtā visos paraugos

Visu paraugu 3.gadskārtā iegūtās slāpekļa masas daļas vērtības ir robežās no 0,15 % līdz 0,2%. Vismazākā vērtība novērojama tieši paraugam, kurš ticis mēslots ar stabilizētiem koksnē pelniem.



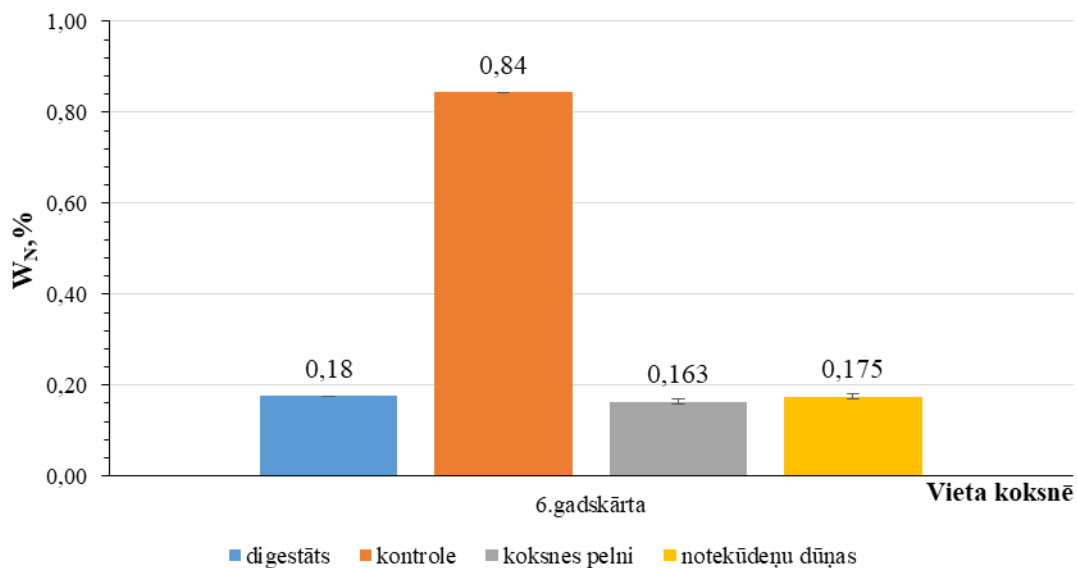
3.10.att. N vidējā masas daļa koksnes 4.gadskārtā visos paraugos

Koksnes 4.gadskārtā trijiem paraugiem vērtības svārstās no 0,14 līdz 0,17 % (skat. 3.10.att.). Vienīgais paraugs, kuru rezultāti ļoti izceļas ir paraugs, kurš nav mēslots, tā skaitliskā vērtība ir 0,24 %.



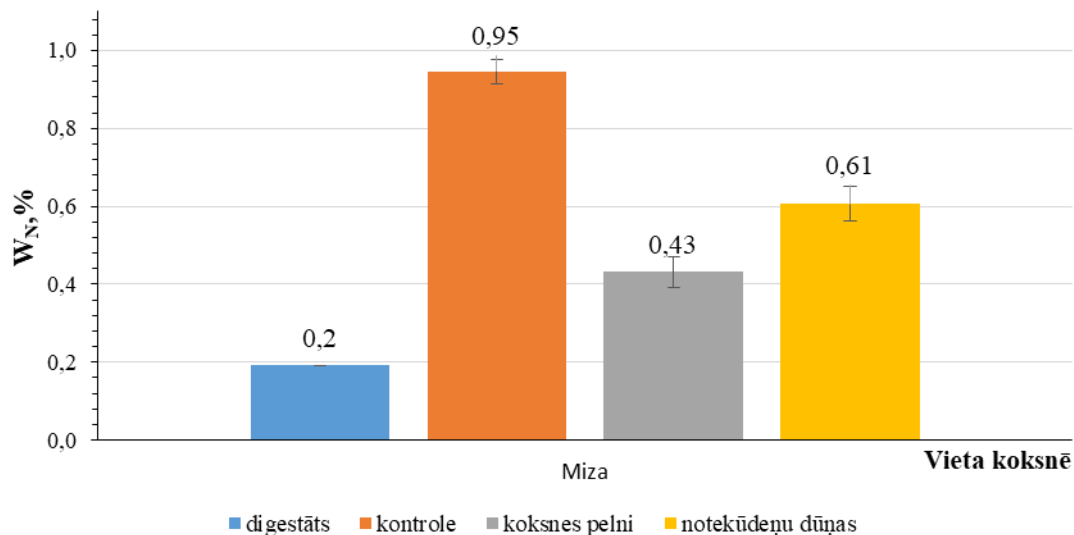
3.11.att. N vidējā masas daļa koksnes 5.gadskārtā visos paraugos

Iegūtie slāpekļa masas daļu rezultāti 5.gadskārtā visos paraugos ir no 0,15 % līdz pat 0,24% (skat. 3.11.att.).



3.12.att. N vidējā masas daļas koksnē 6.gadskārtā visos paraugos

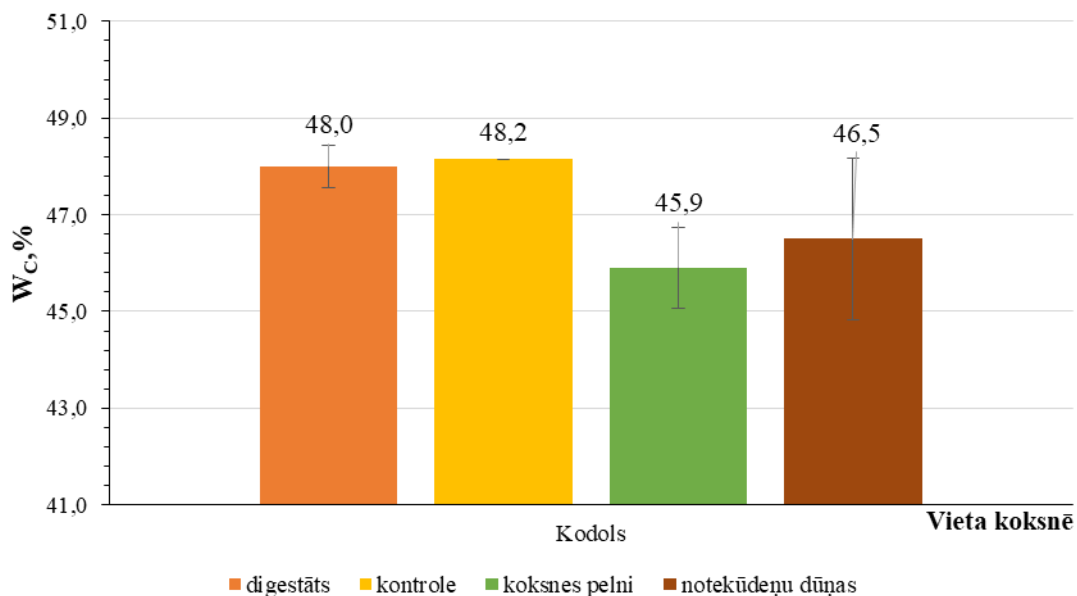
Slāpekļa masas daļas 6.gadskārtā trijos paraugos ir samērā mazas, tās sniedzas no 0,16 % līdz 0,18 % (skat. 3.12.att.). Savukārt kontroles paraugā slāpekļa masas daļa sniedzas līdz pat 0,84%.



3.13.att. N vidējā masas daļas koksnē mizā visos paraugos

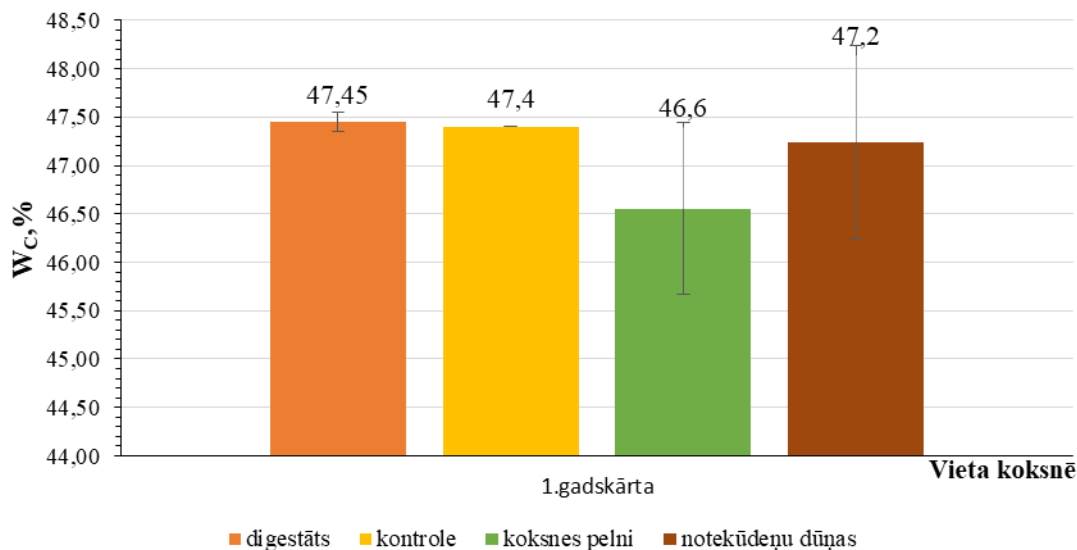
Apļūkojot 3.13.attēlu, redzamas lielas atšķirības starp paraugu rezultātiem. Paraugs, kurš ir nemēslojams, tā slāpekļa masas daļa sniedzas līdz pat 0,95 %, bet paraugi, kuri tikuši mēslojami ir zem 0,61 %. Kopumā novērots, ka mēslošana samazina slāpekļa daudzumu koksnē, kas būtu skaidrojams ar lielāku citu minerālvielu pieejamību un augšanas apstākļiem.

3.3. Oglekļa masu daļu attiecības izvērtējums koksnē paraugos



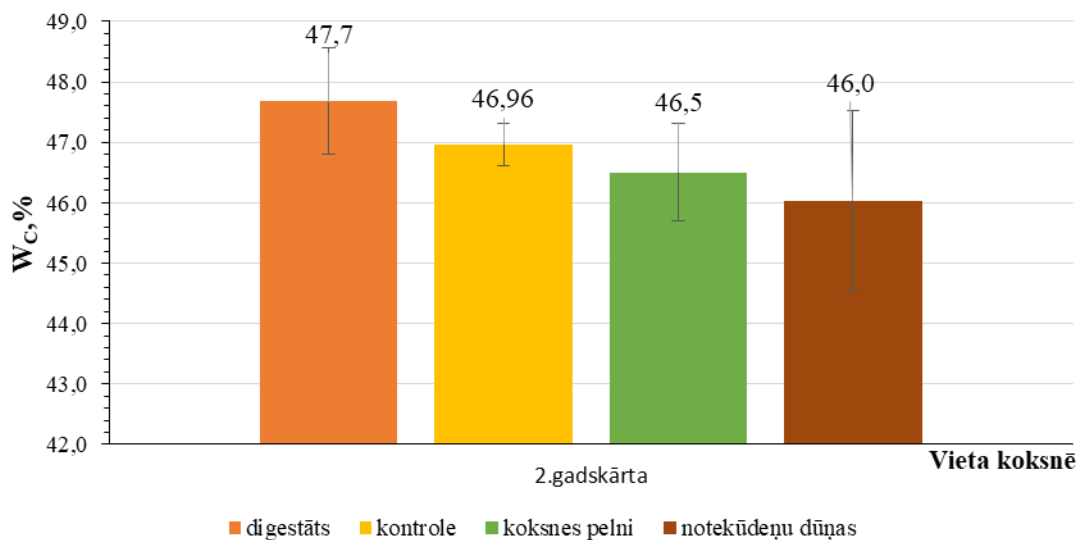
3.14.att. C vidējā masas daļas koksnē kodolā visos paraugos

Oglekļa masas daļas visos paraugos koksnē kodolā ir robežās no 46 % līdz 48 %.



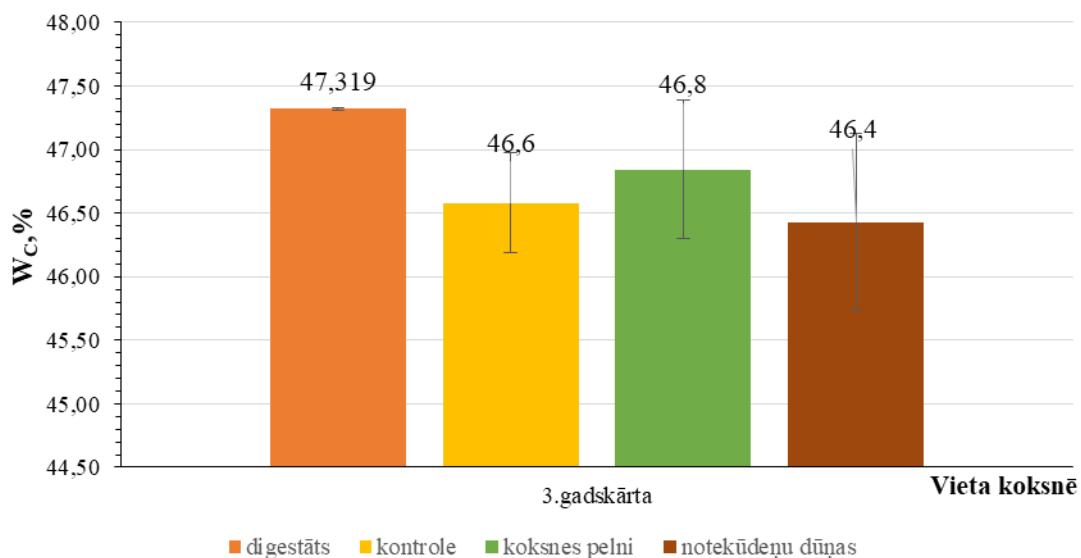
3.15.att. C vidējā masas daļas koksnē 1.gadskārtā visos paraugos

Kā redzams 3.15.attēlā, tad koksnē 1.gadskārtā oglekļa masas daļas ir gandrīz vienādas gan paraugā, kas mēslots ar digestātu, gan paraugā, kas mēslots ar notekūdeņu dūņu, gan paraugā, kas mēslots ar sterilizētiem koksnē pelniem, gan kontroles paraugā un to skaitliskā vērtība ir ~47%.



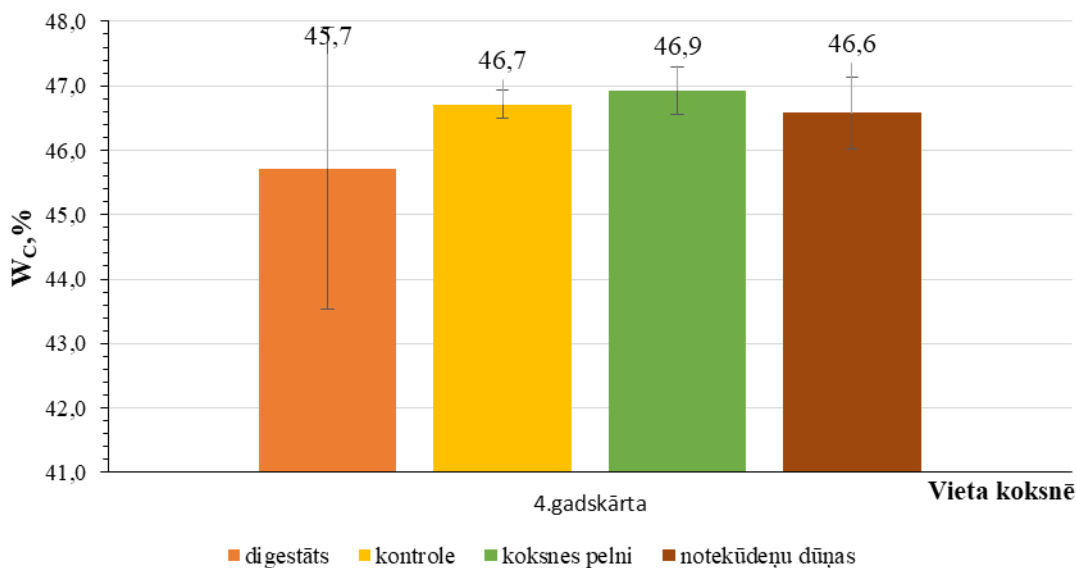
3.16.att. C vidējā masas daļa koksnes 2.gadskārtā visos paraugos

Apskatot 3.16.attēlu, var redzēt, ka visu paraugu vērtības ir samērā tuvas, tas ir no 46 % līdz 47 %.



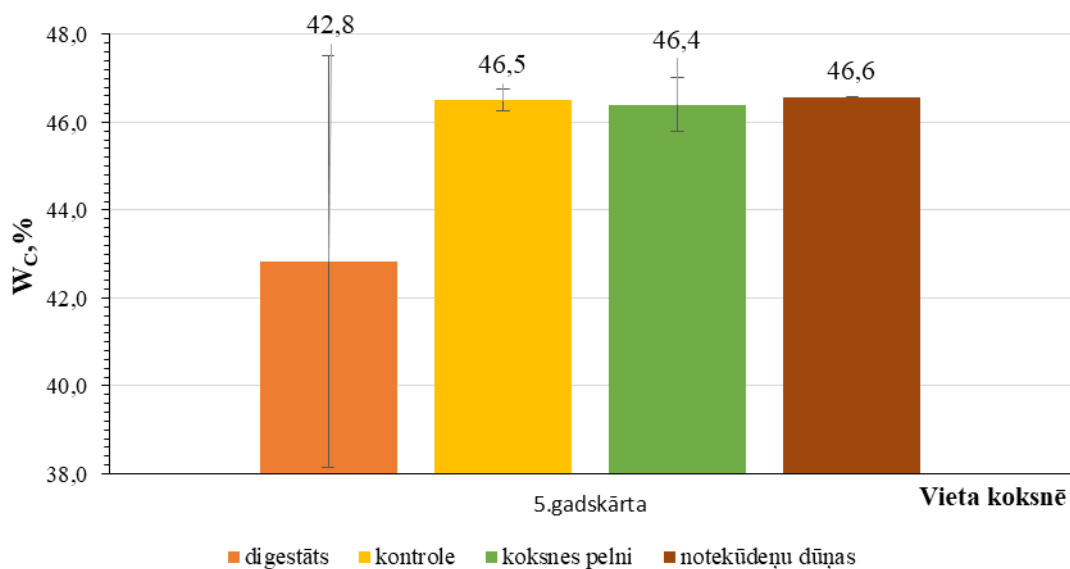
3.17.att. C vidējā masas daļa koksnes 3.gadskārtā visos paraugos

3.17.attēlā paraugam, kas mēslots ar digestātu, oglekļa masas daļa ir 47 %. Paraugam, kas mēslots ar stabilizētiem koksnes pelniem ir līdzīga vērtība kā paraugam, kas mēslots ar notekūdeņu dūņām un kontroles paraugam, attiecīgi vērtības ir 46,8 %, 46,4 % un 46,6 %.



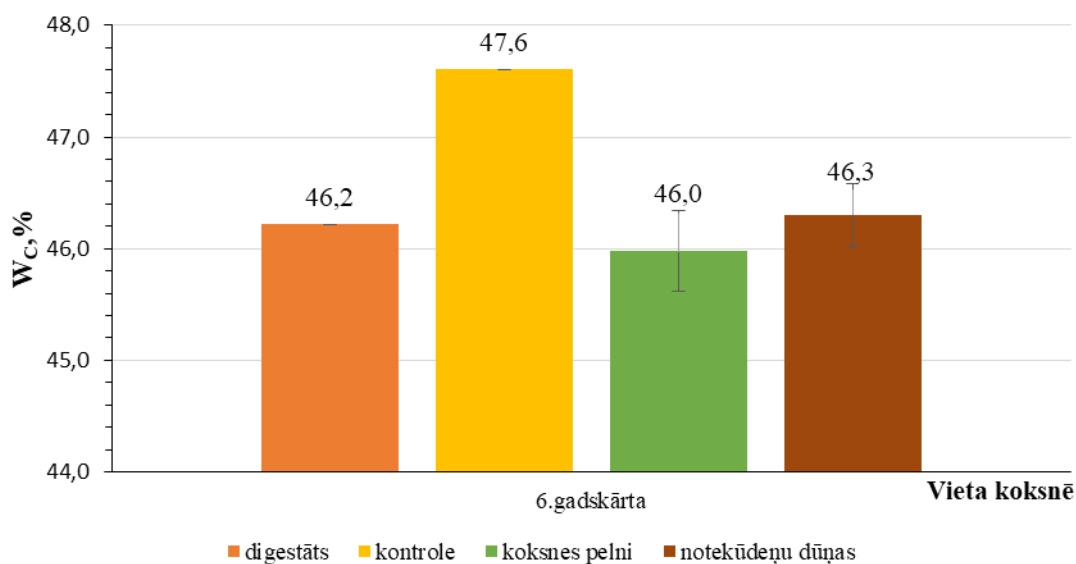
3.18.att. C vidējā masas daļa koksnes 4.gadskārtā visos paraugos

Koksnes 4.gadskārtā vismazākā oglekļa masas daļa ir paraugā, kas mēslots ar digestātu. Pārējos trīs paraugos vērtības ir samērā tuvas, kas ir ~47 %.



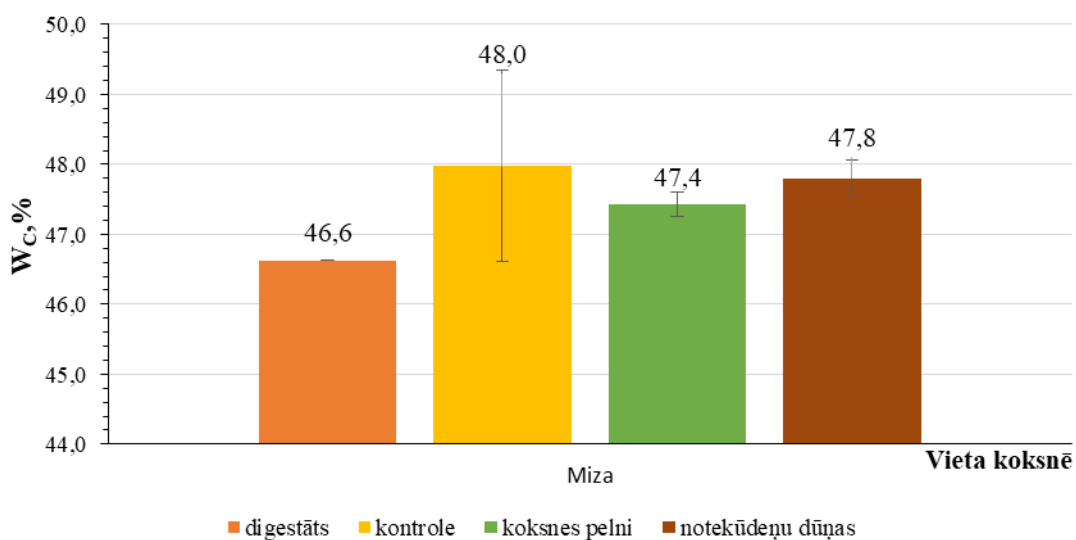
3.19.att. C vidējā masas daļa koksnes 5.gadskārtā visos paraugos

Tieši tāpat kā koksnes 4.gadskārtā, arī 5.gadskārtā vismazākā oglekļa masas daļa ir paraugā, kas mēslots ar digestātu. Pārējos trīs paraugos vērtības ir samērā tuvas, kas ir ~46 %.



3.20.att. C vidējā masas daļas koksnē 6.gadskārtā visos paraugos

Aplūkojot 3.20.attēlu, novērojams, ka triju paraugu vidējā oglekļa masas daļas skaitliskā vērtība ir ~46%. Savukārt kontroles paraugā tā sniedzas līdz ~48%.



3.21.att. C vidējā masas daļas koksnē mizā visos paraugos

3.21.attēlā redzams, ka paraugā, kas mēslots ar stabilizētiem koksnē pelniem un paraugā, kas mēslots ar notekūdeņu dūņām, lielākā oglekļa masas daļa ir novērojama tieši koksnē mizas apvidū.

3.4. Kvantitatīvās un detektēšanas robežas noteikšana

Lai spētu novērtēt iegūto rezultātu ticamību, veica metodes parametru noteikšanu, tas ir, detektēšanas robežu (LoD), kvantificēšanas robežu (LoQ) un atkārtojamību. Detektēšanas robežu noteica no kalibrēšanas grafika. Tas tika veikts, lai uzzinātu kāds būtu bijis optimālais masas iesvars, lai tiktu iegūti precīzi $\delta^{15}\text{N}$ rezultāti. Nav korekti teikt, ka slāpekļa vispār nav paraugā, bet var tikt piemērots parauga daudzums, kas ir par mazu, lai tajā precīzi varētu noteikt $\delta^{15}\text{N}$.

No kalibrēšanas grafika tika noteiktas detektēšanas robeža un kvantificēšanas robeža. Novērtējot paraugu aprēķinātās kvantificēšanas robežas (LoQ) saskaņā ar ISO metodi [37], iegūtā rezultātu precizitāte ir tikai 26 %, šī iemesla dēļ tika novērtēts pie kāda iesvara rezultātu atkārtojamība sasniegs 10 % un attiecīgi kāds minimālais parauga iesvars jāizmanto. 3.2. tabulā apkopotas aprēķinātās LoD, LoQ un LoQ 10 % vērtības nosakot slāpekļa masas daļu. Aprēķinu piemēri aplūkojami 2.pielikumā.

3.2.tabula

Aprēķināto LoD, LoQ un LoQ 10% vērtību salīdzinājums slāpekļa noteikšanā

Parauglaukums (28)	LoD, μg	\pm , μg	R, %
$2 \cdot 10^{-9}$	5	3	58

Parauglaukums (28)	LoQ, μg	\pm , μg	R, %
$8 \cdot 10^{-9}$	11	3	26

Parauglaukums (28)	LoQ 10%, μg	\pm , μg	R, %
$3 \cdot 10^{-8}$	30	3	10

Pieņemot, ka vēlamā precizitāte ir 10 %, tika aprēķināts arī minimālais L-glutamīnskābes masas iesvars. Lai noteiktu oglekļa masas daļu, pietiek ja masas iesvars ir 990 μg , jo aprēķināts, ka oglekļa procentuālais daudzums L-glutamīnskābē ir 41 % un eksperimentāli noteikti ir ~47 % (2.3.tabula). Savukārt, lai korekti noteiktu slāpekļa daudzumu paraugā, iesvara masu būtu jāpalielina vismaz līdz 1493,5 μg , jo L-glutamīnskābē tas ir 10 % (2.3.tabula), bet eksperimentāli koksnes paraugā tika noteikts tikai ~0,2 %.

No iegūtajiem rezultātiem redzams, ka detektēšanas robeža ir 5 μg , kas nozīmē, to ka, lai slāpekli paraugā vispār detektētu ņemtajā 4 mg parauga, tā saturam paraugā jābūt vismaz 0,13 %. Noteiktā LoQ vērtība parāda to, ka, lai kvantitatīvi noteiktu slāpekli paraugā, tad ņemot 4 mg parauga tajā jābūt 0,3 % slāpekļa, pretējā gadījumā iesvars jāpalielina. Lai veiktu slāpekļa

kvantificēšanu paraugā ar precizitāti, lai kļūda nepārsniegtu 10 %, tad paraugā jābūt vismaz 0,8 % slāpekļa.

3.5. Rezultātu dispersijas analīze

3.6. tabulā izmantota F ir vērtība, ko iegūst veicot Dispersijas analīzi, lai noskaidrotu vai starp diviem vai vairākiem lielumiem ir novērojamas būtiskas atšķirības. Manā gadījumā tie ir divi lielumi, kontroles jeb nemēslotais paraugs un mēslotais paraugs. Abi lielumi tiek salīdzināti, lai novērtētu vai pastāv kādas nozīmīgas atšķirības starp tiem.

3.6.tabula

$\delta^{15}\text{N}$ un $\delta^{13}\text{C}$ dispersijas analīze paraugos attiecībā pret kontroles paraugu

Parauga mēslojuma veids	$\delta^{15}\text{N}$			$\delta^{13}\text{C}$		
	F	P	F krit.	F	P	F krit.
Mēslojums ar digestātu	2	0,2	5	12	0,004	5
Mēslojums ar notekūdeņu dūņām	3	0,09	5	2	0,2	5
Mēslojums ar stabilizētiem koksnes pelniem	11	0,005	5	7	0,02	5

Savukārt P vērtība ir varbūtība, ka nulles hipotēze (ideja, ka visām grupām vidējā vērtība nav vienāda) sniedz konkrētu rezultātu. Respektīvi, jo zemāka P vērtība jo lielāka varbūtība, ka hipotēze ir patiesa.

Aplūkojot 3.6.tabulas $\delta^{15}\text{N}$ kolonnas pirmo aili sanāk, ka $F < F \text{ krit.}$, tātad var secināt, ka starp kontroles paraugu un paraugu, kurš mēslojums ar digestātu, nav būtiskas atšķirības. Tieši tāpat ir arī ar otro aili, $F < F \text{ krit.}$, līdz ar to starp kontroles paraugu un paraugu, kurš mēslojums ar notekūdeņu dūņām arī nav būtisku atšķirību. Savukārt starp kontroles paraugu un paraugu, kurš mēslojums ar stabilizētiem koksnes pelniem ir nozīmīga atšķirība, jo $F > F \text{ krit.}$

$\delta^{13}\text{C}$ kolonnā, var redzēt, ka starp kontroles paraugu un paraugu, kurš mēslojums ar digestātu ir būtiska atšķirība. Līdzīgi kā pirmajā ailē, arī trešajā ailē $F > F \text{ krit.}$, respektīvi starp kontroles paraugu un paraugu, kurš mēslojums ar stabilizētiem koksnes pelniem arī pastāv būtiska atšķirība. Starp kontroles paraugu un paraugu, kurš mēslojums ar notekūdeņu dūņām nav novērojamas nozīmīgas atšķirības.

W_N un W_C dispersijas analīze paraugos attiecībā pret kontroles paraugu

Parauga mēslojuma veids	W _N			W _C		
	F	P	F krit.	F	P	F krit.
Mēslojums ar digestātu	4	0,07	5	1,4	0,3	5
Mēslojums ar notekūdeņu dūņām	2	0,2	5	3	0,12	5
Mēslojums ar stabilizētiem koksnes pelniem	3	0,10	5	6	0,03	5

Aplūkojot 3.7.tabulas W_N kolonnu, var redzēt, ka visos trīs gadījumos $F < F_{krit.}$, tas nozīmē, ka visiem paraugiem attiecībā pret kontroles paraugu nav būtisku atšķirību.

Savukārt W_C kolonna rezultātu ziņā ir ļoti līdzīga 3.6.tabulas $\delta^{13}C$ kolonnai, jo, aplūkojot pirmo aili redzams $F < F_{krit.}$, un ir secināms, ka starp kontroles paraugu un paraugu, kurš mēslojums ar digestātu, nav nozīmīgas atšķirības. Līdzīgi ir arī ar otro aili, $F < F_{krit.}$, līdz ar to starp kontroles paraugu un paraugu, kurš mēslojums ar notekūdeņu dūņām arī nav nozīmīgas atšķirības. Taču starp kontroles paraugu un paraugu, kurš mēslojums ar stabilizētiem koksnes pelniem ir nozīmīga atšķirība, jo $F > F_{krit.}$

SECINĀJUMI

1. Analizētie paraugi vidēji saturēja 0,17% N un 47% C.
2. Noteiktās $\delta^{13}\text{C}$ vērtības hibrīdapses koksnes gadskārtās ir intervālā no -26 līdz -29 ‰, bet mizā sasniedz pat 30‰.
3. Noteiktās $\delta^{15}\text{N}$ vērtības hibrīdapses koksnes gadskārtās ir intervālā no -0,02 līdz -11 ‰, bet mizā sasniedz pat 2‰.
4. Nav būtisku N masas daļu izmaiņu starp koku paraugiem, kas auguši dažādi mēsļotos parauglaukumos.
5. Dispersijas analīzes rezultātā secināts, ka vislielākās atšķirības ir starp paraugiem, kas mēsļoti ar koksnes pelniem un nemēsļoto kontroles paraugu.
6. Darba rezultātā secināts, ka ir novērojamas $\delta^{15}\text{N}$ un $\delta^{13}\text{C}$ atšķirības ne tikai starp paraugiem no dažādi mēsļotajiem parauglaukumiem, bet arī starp viena koka dažādām gadskārtām, kas norāda uz dažādu ikgadēju faktoru maiņu (laikapstākļi un apkārtējā vide).
7. Ja ņemtā parauga iesvars ir 4 mg, tad metodes LoD – 0,12 %, LoQ – 0,3 % un LoQ 10 % - 0,8 % paraugā.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Mikro- un makroelementu plūsmas īscirtmeta apšu hibrīdu kokaugu stādījumā. [tiešsaiste] http://www.silava.lv/userfiles/file/Aktualitates/2019_12_19_Kopsavilkums_LV_Bardule_pr_omocija.pdf (skatīts 05.03.2020)
2. Kas ir hibrīda apse. [tiešsaiste] http://www.silava.lv/userfiles/file/apse_optim.pdf (skatīts 21.09.2019)
3. Ātraudzīgā hibrīdapse. [tiešsaiste] <https://www.metsaforest.com/lv/Documents/Noderigi/atraudziga-hibridapse.pdf> (skatīts 23.03.2020)
4. Ātraudzīgā hibrīdapse. [tiešsaiste] <https://www.lvm.lv/petijumi-un-publicijas/atraudziga-apse-mezs-gatavs-cirsanai-20-gados?view=attachments> (skatīts 23.03.2020)
5. Smith, K. T.; Shortle, W. C. Tree biology and dendrochemistry. In: *Tree rings, Environment and Humanity*; Dean, J.S.; Meko, D.M.; Swetnam, T.W., Ed.; Tucson, Radiocarbon, 1996; pp 629-635.
6. Balouet, J. C.; Burken, J. G.; Karg, F.; Vroblesky, D.; Smith, K. T.; Grudd, H.; Chalot, M. Dendrochemistry of Multiple Releases of Chlorinated Solvents at a Former Industrial Site. *Environmental Science & Technology*. **2012**, *46(17)*, 9541–9547.
7. Balouet, J. C.; Smith, K. T.; Vroblesky, D.; Oudijk, G. Use of Dendrochronology and Dendrochemistry in Environmental Forensics: Does It Meet the *Daubert* Criteria? *Environmental Forensics*. **2009**, *10(4)*, 268–276.
8. Beghin, R.; Cherubini, P.; Battipaglia, G.; Siegwolf, R.; Saurer, M.; Bovio, G. Tree-ring growth and stable isotopes (^{13}C and ^{15}N) detect effects of wildfires on tree physiological processes in *Pinus sylvestris* L. *Trees*. **2011**, *25(4)*, 627–636.
9. Scharnweber, T.; Hevia, A.; Buras, A.; van der Maaten, E.; Wilmking, M. Common trends in elements? Within- and between-tree variations of wood-chemistry measured by X-ray fluorescence — A dendrochemical study. *Science of The Total Environment*. **2016**, *566-567*, 1245–1253.
10. Nabais, C.; Freitas, H.; Hagemeyer, J. Tree rings and dendroanalysis. In: *Metals in the environment: Analysis by biodiversity*; Marcel Dekker, New York, 2000; pp 367–400.
11. Sensuła, B.; Wilczyński, S.; Monin, L.; Allan, M.; Pazdur, A.; Fagel, N. Variations of tree ring width and chemical composition of wood of pine growing in the area nearby chemical factories. *Geochronometria*, **2017**, *44(1)*, 226–239.












12. Gilboy, W.B.; Tout R.E.; Spyrou, N.M. Dendroanalysis: the study of trace elements in tree rings. Proceedings of the ERDA X- and Gamma-Ray Symposium, Ann Arbor. 1976; pp 164-165.
13. Hagemeyer, J. Trace metals in tree rings: What do they tell us?. In: *Trace metals – their distribution and effects in the Environment*; Markert B.; Friese K., Ed.; 2000; pp 375-385.
14. Shortle, W. C.; Smith, K. T.; Lapenis, A. G. Dendrochemical evidence for soil recovery from acidic deposition in forests of the northeastern U.S. with comparisons to the southeastern U.S. and Russia. *Chemosphere*. **2017**, *181*, 786–796.
15. Stein, L. Y.; Klotz, M. G. The nitrogen cycle. *Current Biology*. **2016**, *26*, 1.
16. Takai, K. The Nitrogen Cycle: A Large, Fast and Mystifying Cycle. *Microbes and Environments*. **2019**, *34(3)*, 223–225.
17. Bukata, A. R.; Kyser, T. K. Response of the Nitrogen Isotopic Composition of Tre-Rings Following Tree-Clearing and Land-Use Changes. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39*, 7777-7778.
18. Bioģeokīmiskie cikli. Slāpekļa cikls. [tiešsaite] <https://www.uzdevumi.lv/p/biologija/10-klase/organismi-un-to-dzives-vide-11313/re-42ff7d44-26d3-4f04-a9f8-3979173cfc53> (skatīts 07.01.2020)
19. Muccio, Z.; Jackson, G. P. Isotope ratio mass spectrometry. *The Analyst*. **2009**, *213*, 213–222.
20. Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry; Carter, J. F.; Barwick, V., Eds.; FIRMS, 2011; pp 1-6.
21. Georgiou, C. A., & Danezis, G. P. Elemental and Isotopic Mass Spectrometry. *Comprehensive Analytical Chemistry*, **2015**, 179.
22. Hoefs, J. *Stable Isotope Geochemistry*; Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, 1997; pp 7-25.
23. de Groot, P. A. GC and IRMS Technology for ¹³C and ¹⁵N Analysis on Organic Compounds and Related Gases. In: *Handbook of stable isotope analytical techniques*. de Groot, P. A., Ed. Elsevier: Amsterdam, 2004, 153–155.
24. Brand, W. High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. **1996**, *31*, 225-235.
25. Muccio, Z.; Jackson, G.P. Isotope ratio mass spectrometry. *Analyst*. **2009**, *134*, 213-222.
26. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. [tiešsaite] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2556583/> (skatīts 21.12.2019)

27. Shrivastava, A.; Gupta, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*. **2011**, 2(1), 21-25.
28. Limits of Detection. [tiešsaite] <https://sites.chem.utoronto.ca/chemistry/coursenotes/analsci/stats/LimDetect.html> (skatīts 15.01.20)
29. Armbruster, D. A.; Tillman, M. D.; Hubbs, L. M. Limit of detection (LQD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clinical Chemistry*. **1994**, 40(7), 1233–1238.
30. Rostami, H.; Dantan, J.-Y.; Homri, L. Review of data mining applications for quality assessment in manufacturing industry: support vector machines. *Int. J. Metrol. Qual. Eng.* **2015**, 6, 5.
31. Cho, S.; Kim, Y.; Choung, Y. Distribution and synchronized massive flowering of *Sasa borealis* in the forests of Korean National Parks. *Journal of ecology and environment*. **2018**, 42, 37.
32. Kim, E.; Shin, J.; Jeong, K. Genetic variation and structure of *Juniperus chinensis* L. (Cupressaceae) in Korea. *Journal of ecology and environment*. **2018**, 42, 14.
33. Anova in R. [tiešsaite] <https://www.datanovia.com/en/lessons/anova-in-r/> (skatīts 13.04.20)
34. Bardule A.; Bertins M.; Busa L.; Lazdina D.; Viksna A.; Tvrdonova M.; Kanicky V.; Vaculovic T. Variation of major elements and heavy metals occurrence in hybrid aspen (*Populus tremuloides* Michx. × *P. tremula* L.) tree rings in marginal land. **2020**, 13(24-32)
35. Ziēmlauki. [tiešsaite] <https://www.google.com/maps/place/56%C2%B041'30.8%22N+25%C2%B008'13.2%22E/@56.6919,25.1348113,17z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d56.6919!4d25.137> (skatīts 25.04.20)
36. Koksnes resursu ieguve. [tiešsaite] <https://www.vmd.gov.lv/valsts-meza-dienests/statiskas-lapas/-meza-apsaimniekosana-/koksnes-resursu-ieguve?nid=1682#jump> (skatīts 22.05.20)
37. Mocak, J.; Janiga, I.; Rabarova, E. Evaluation of IUPAC limit of detection and ISO minimum detectable value – electrochemical determination of lead. *Nova Biotechnologica*. 2009, 9, 91-100.

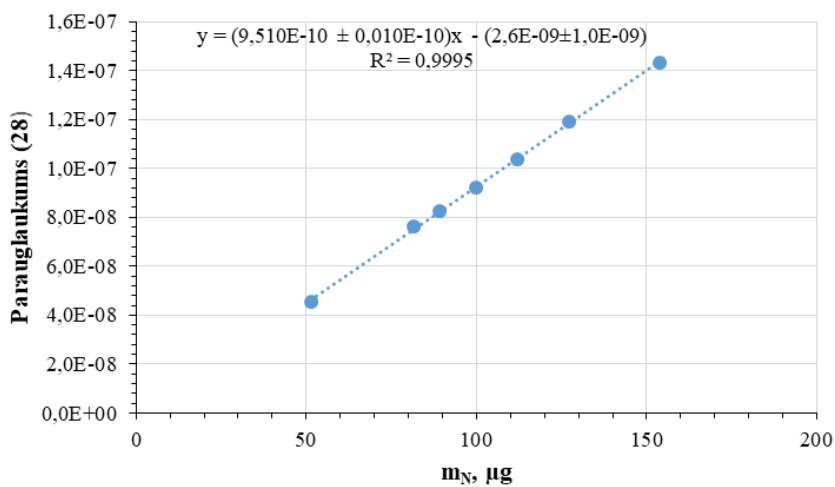
PIELIKUMI

1. Pielikums. Reaģentu drošības datu lapa

1. tabula

Vielu saraksts	Bīstamība	Daudzums, mL/g	Izmantošana	
Kobalta oksīds (CoO)	   GHS06, GHS08, GHS09	H301-H317- H330-H334-H410 P260-P273-P280- P301 + P310 + P330-P304 + P340 + P310- P342 + P311- P391-P403 + P233	3 g	Reakcijas šūna
Magnija perhlorāts (MgClO ₄)	  GHS03, GHS07	H271, H272, H315, H319 P210 - P302 + P352 - P305 + P351 + P338	5 g	Mitruma uztvērējs
NaOH	 GHS05	H290-H314 P260-P280-P303 + P361 + P353- P304 + P340 + P310-P305 + P351 + P338	5 g	Mitruma uztvērējs
He (gāze, 5.0)	 GHS04	H280 P410 + P403	50 L	Nesējgāze
N ₂ (gāze, 5.0)	 GHS04	H280 P410 + P403	50 L	References gāze
CO ₂ (gāze)	 GHS04	H280 P410 + P403	50 L	References gāze
O ₂	  GHS03, GHS04	H270-H280 P220-P410 + P403	50 L	Oksidētājs

2.Pielikums. LoD, LoQ un LoQ 10% aprēķina paraugs



LINEST	
9,51018E-10	-2,5613E-09
9,75156E-12	1,04045E-09
0,999474573	7,91282E-10
9511,068819	5

1.att. Slāpekļa (N28) kalibrēšanas grafiks atkarībā no parauga laukuma

$$\text{Parauglaukums} = S(y) \cdot 3 = 7,91282 \cdot 10^{-10} \cdot 3 = 2,37 \cdot 10^{-9}$$

$$\text{LoD} = \left(\frac{\frac{\text{Parauglaukums} - a}{b} \cdot 10}{10} \right) = \left(\frac{\frac{2,37 \cdot 10^{-9} - 2,56 \cdot 10^{-9}}{9,51 \cdot 10^{-9}} \cdot 10}{10} \right) = 5$$

$$\text{Parauglaukums} = S(y) \cdot 10 \rightarrow 7,91282 \cdot 10^{-10} \cdot 10 = 7,91 \cdot 10^{-9}$$

$$\text{LoQ} = \left(\frac{\frac{\text{Parauglaukums} - a}{b} \cdot 10}{10} \right) = \left(\frac{\frac{7,91 \cdot 10^{-9} - 2,56 \cdot 10^{-9}}{9,51 \cdot 10^{-9}} \cdot 10}{10} \right) = 11$$

$$\text{Parauglaukums} = S(y) \cdot 32,66 \rightarrow 7,91282 \cdot 10^{-10} \cdot 10 = 2,58 \cdot 10^{-8}$$

$$\text{LoQ 10\%} = \left(\frac{\frac{\text{Parauglaukums} - a}{b} \cdot 10}{10} \right) = \left(\frac{\frac{2,58 \cdot 10^{-8} - 2,56 \cdot 10^{-9}}{9,51 \cdot 10^{-9}} \cdot 10}{10} \right) = 30$$

PATEICĪBA

Izsaku pateicību Latvijas Valsts mežzinātnes institūtam “Silava” par iespēju bakalaura darba izstrādei izmantot hibrīdapses koksnes paraudziņus.

Bakalaura darbs „Izotopu attiecību masspektrometrijas metodes pielietojums hibrīdapses (*Populus Tremula L. × P. Tremuloides Michx*) dendroķīmiskajos pētījumos” izstrādāts LU Ķīmijas fakultātē Analītiskās ķīmijas katedrā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: _____ Signija Zaķe
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Ķīm. mag. Māris Bērtiņš: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Recenzente: docente, Dr.chem. Agnese Osīte: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: _____ (datums)

Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: _____ Vija Gutāne
(personiskais paraksts)

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

_____ protokols Nr. _____ (ieraksta sekretārs)
(datums) (protokola Nr.)

Komisijas sekretāre, lektore: _____
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)