

2016

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

MAGISTRSKO DELO

MAGISTRSKO DELO

VALIDACIJA KIVETNEGA TESTA ZA DOLOČANJE  
CELOTNEGA DUŠIKA V ODPADNIH VODAH

KATJA TRILLER

KATJA TRILLER

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Magistrsko delo

**Validacija kivetnega testa za določanje celotnega dušika v  
odpadnih vodah**

(Validation of cuvette test for the determination of total nitrogen in  
wastewater)

Ime in priimek: Katja Triller

Študijski program: Varstvo narave, 2. stopnja

Mentor: doc. dr. Ana Miklavčič Višnjevec

Delovni somentor: Darja Dolžan, univ.dipl.kem.

Koper, december 2016

## **Ključna dokumentacijska informacija**

Ime in PRIIMEK: Katja TRILLER

Naslov magistrskega dela: Validacija kivetnega testa za določanje celotnega dušika v odpadnih vodah

Kraj: Koper

Leto: 2016

Število listov: 65

Število slik: 28

Število tabel: 18

Število referenc: 37

Mentor: doc. dr. Ana Miklavčič Višnjevec

Delovni somentor: Darja Dolžan, univ. dipl. kem.

UDK:

Ključne besede: kivetni testi, validacija, celotni dušik, UV/VIS spektrofotometer, odpadne vode.

Izvleček: Večina metod določanja onesnaževalcev v vodi zahteva uporabo strupenih kemikalij in dragih instrumentov, poleg tega pa so časovno potratne. Namen magistrskega dela je bila vpeljava analizne metode za določanje celotnega dušika v odpadnih vodah s kivetnimi testi na UV/VIS spektrofotometru. Določili smo linearnost, mejo zaznavnosti, mejo določljivosti, točnost in natančnost metode. Rezultati kažejo, da je metoda v koncentracijskem območju med 4 mg celotnega dušika na liter in 70 mg celotnega dušika na liter linearna. Meja zaznavnosti znaša 1 mg dušika na liter, meja določljivosti 4 mg dušika na liter in je prva točka umeritvene krivulje. Metoda je natančna in točna na vseh testiranih koncentracijskih nivojih. Dokazali smo, da je metoda enostavna, hitra, občutljiva in zato primerna za rutinsko uporabo.

## Key words documentation

Name and SURNAME: Katja TRILLER

Title of the master thesis: Validation of cuvette test for the determination of total nitrogen in wastewater

Place: Koper

Year: 2016

Number of pages: 65

Number of figures: 28

Number of tables: 18

Number of references: 37

Mentor: Assist. Prof. Ana Miklavčič Višnjevec, PhD

Co-Mentor: Darja Dolžan, B. S. Chem.

UDK:

Keywords: cuvette test, validation, total nitrogen, UV/VIS spectrophotometer, wastewater

Abstract: Most methods for determinations of contaminants in water require the use of toxic chemicals, expensive instruments and are time consuming. The purpose of the master's thesis was the implementation of analytical methods for determination of total amount of nitrogen in waste water with cuvette tests on UV / VIS spectrophotometer. We determined the linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy and precision. The results show that the method used in concentration range between 4 mg of total nitrogen per litre and 70 mg of total nitrogen per litre is linear. The detection limit is 1 mg of nitrogen per litre; the limit of quantification is 4 mg of nitrogen per litre and is the first point of the calibration curve. The method is precise and accurate at all concentration levels. We proved that the method is simple, rapid, sensitive, and therefore suitable for routine use.

## KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	NAMEN MAGISTRSKEGA DELA.....	2
1.2	CILJI MAGISTRSKEGA DELA .....	2
1.3	HIPOTEZE .....	2
2	TEORETIČNA IZHODIŠČA .....	3
2.1	ZAKONODAJA NA PODROČJU ODPADNIH VODA .....	3
2.1.1	Predpisi na področju odvajanja voda.....	4
2.2	SESTAVA ODPADNE VODE .....	6
2.2.1	Dušikove spojine .....	7
2.2.2	Čiščenje odpadnih voda s poudarkom na odstranjevanju dušikovih spojin ....	9
2.3	VZORČENJE ODPADNIH VODA .....	11
2.3.1	Napake pri vzorčenju odpadnih voda .....	12
2.4	SPEKTROSKOPIJA.....	12
2.4.1	Spektrofotometer .....	13
2.4.2	Merjenje s spektrofotometrom.....	16
2.4.3	Interference .....	18
2.4.4	Uporabnost UV/VIS spektroskopije.....	18
2.5	KIVETNI TESTI .....	19
2.6	METODE ZA DOLOČANJE CELOTNEGA DUŠIKA.....	21
2.7	VALIDACIJA ANALIZNE METODE.....	22
2.7.1	Validacija umeritvenega postopka (postavitev umeritvene premice).....	22
2.7.2	Določitev validacijskih parametrov .....	25
3	EKSPERIMENTALNI DEL .....	29
3.1	OPREMA.....	29
3.1.1	Spektrofotometer .....	29
3.1.2	Hladilnik .....	29
3.1.3	Analitska tehtnica .....	29
3.1.4	Termoblok .....	30
3.1.5	Homogenizator .....	30
3.1.6	Sistem za čiščenje vode .....	30
3.1.7	Laboratorijska steklovina – oprana z raztopino za čiščenje (3.2.9) in sprana z dionizirano vodo .....	30
3.2	REAGENTI .....	30
3.2.1	Sveža deionizirana voda (DI voda) .....	30
3.2.2	Pripravljeni reagenti proizvajalca Hach (slika 15) .....	30
3.2.3	Natrijev nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ), sušen 2 uri pri 105 °C .....	31
3.2.4	Natrijev nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ), sušen 2 uri pri 105 °C .....	31

3.2.5	Kalijev nitrat ( $\text{KNO}_3$ ), sušen 2 uri pri 105 °C .....	31
3.2.6	Amonijev klorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) .....	31
3.2.7	Natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ ) .....	31
3.2.8	Žveplova (VI) kislina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) .....	32
3.2.9	Kontrolni vzorec Aquacheck .....	32
3.2.10	Raztopina za čiščenje .....	32
3.3	POSTOPEK .....	32
3.3.1	Odvzem in hranjenje vzorcev .....	32
3.3.2	Predpriprava vzorca za analizo in obvladovanje interferenc .....	32
3.3.3	Priprava standardnih raztopin za umeritveno krivuljo .....	33
3.3.4	Priprava kontrolne delovne referenčne raztopine .....	34
3.3.5	Meritev vzorcev .....	34
3.3.6	Izračun koncentracije celotnega dušika v vzorcu .....	36
4	REZULTATI .....	37
4.1	UMERITVENA PREMICA .....	37
4.1.1	Iskanje ubežnikov znotraj skupine meritev .....	37
4.1.2	Izračun linearne premice 1. reda in preverjanje linearnosti .....	38
4.1.3	Izbira delovne umeritvene premice .....	39
4.1.4	Preverjanje homogenosti varianc .....	42
4.2	DOLOČITEV VALIDACIJSKIH PARAMETROV .....	43
4.2.1	Določitev meje zaznavnosti (LOD) in meje določljivosti (LOQ) .....	43
4.2.2	Točnost metode .....	44
4.2.3	Natančnost metode .....	46
5	DISKUSIJA .....	49
5.1	UMERITVENA PREMICA .....	49
5.2	DOLOČITEV VALIDACIJSKIH PARAMETROV .....	49
5.2.1	Določitev meje zaznavnosti in meje določljivosti .....	49
5.2.2	Točnost metode .....	50
5.2.3	Natančnost metode .....	50
6	ZAKLJUČKI .....	52
7	LITERATURA IN VIRI .....	53

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Oksidacijska stanja dušika (Gerardi, 2002): .....	7
Preglednica 2: Vpliv spojin na koncentracijo dušika (Working procedure, Hach). .....	33
Preglednica 3: Shema priprave raztopin za umeritveno krivuljo. ....	34
Preglednica 4: Rezultati meritev iz treh umeritvenih krivulj. ....	37
Preglednica 5: Iskanje ubežnikov znotraj skupine meritev z Dicksonovim Q-testom. ....	37
Preglednica 6: Iskanje ubežnikov znotraj skupine meritev z Grubbs-Beckovim testom. ...	38
Preglednica 7: Parametri umeritvene premice 1.....	40
Preglednica 8: Parametri umeritvene premice 2.....	41
Preglednica 9: Parametri umeritvene premice 3.....	42
Preglednica 10: Izračun homoscedastičnosti na osnovi odzivov. ....	42
Preglednica 11: Določitev LOD in LOQ.....	43
Preglednica 12: Vrednotenje LOD iz meritev realnih vzorcev. ....	43
Preglednica 13: Vrednotenje LOQ iz meritev realnih vzorcev. ....	44
Preglednica 14: Preverjanje točnosti. ....	44
Preglednica 15: Pregled medsebojnih primerjav z drugim laboratorijem. ....	46
Preglednica 16: Medlaboratorijska primerjalna analiza Aquacheck. ....	46
Preglednica 17: Natančnost – ponovljivost .....	47
Preglednica 18: Obnovljivost metode.....	47

## KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Kinetika nitrifikacije (Kurbus, 2008).....	8
Slika 2: Kinetika denitrifikacije (Kurbus, 2008).....	9
Slika 3: Elektromagnetni spekter (Owen, 2000).....	13
Slika 4: Konvencionalni spektrofotometer (Owen, 2010).....	14
Slika 5: Levo je klasična kiveta, desno mikrokiveta (Owen, 2010).....	15
Slika 6: Dvožarkovni spektrofotometer (Owen, 2000).....	16
Slika 7: Zmanjšanje intenzitete žarka sevanja zaradi absorpcije v raztopini (Owen,2000). 16	
Slika 8: Beer-Lambertov zakon: na ordinati je prikazana absorbanca, na abscisi koncentracija (Owen, 2000).....	17
Slika 9: Prikaz sipanja svetlobe (Owen, 2000).....	18
Slika 10: Sistem kivetnih testov Hach (Hach, 2016).....	20
Slika 11: Potencialne napake nepravilne kalibracije (Owen; 2010).....	23
Slika 12: Idealne (levo) in realne meritve standardnih raztopin (Owen, 2010).....	23
Slika 13: Prikaz dobre točnosti metode (Owen, 2010).....	27
Slika 14: Primer točnosti in natančnosti (Owen, 2010).....	28
Slika 15: Reagenti proizvajalca Hach. Od leve proti desni si sledijo reagent A, B, C in D (vir: Katja Triller).....	31
Slika 16: Priprava bučk (vir: Katja Triller).....	33
Slika 17: Priprava standardnih raztopin (vir: Katja Triller).....	34
Slika 18: Dodatek reagenta v vzorec.....	35
Slika 19: Segrevanje vzorcev v termobloku.....	35
Slika 20: Dodatek MicroCap C k vzorcu.....	35
Slika 21: Dodatek reagenta D.....	35
Slika 22: Merjenje vzorca.....	36
Slika 23: Graf linearne umeritvene premice 1. reda.....	39
Slika 24: Umeritvena premica 1.....	40
Slika 25: Umeritvena premica 2.....	41
Slika 26: Umeritvena premica 3.....	41
Slika 27: Meritve amonijevega klorida pri koncentraciji 20 mg/l.....	45



## SEZNAM KRATIC IN SIMBOLOV

### Uporabljene kratice

$A$	absorbanca
$c$	koncentracija snovi v vzorcu (mg/l)
$l$	optična pot (cm)
$\varepsilon$	molarni absorpcijski koeficient (l/mol cm)
$s_i$	standardni odmik signalov na $i$ -tem koncentracijskem nivoju
$y_i$	povprečje signalov na $i$ -tem koncentracijskem nivoju
$y_{ij}$	izmerjen signal za meritev $j$ na $i$ -tem koncentracijskem nivoju
$b_0$	vrednost odseka
$b_i$	naklon premice
$e_1$	ostanki
$\bar{y}$	povprečje $y_i$
$\bar{x}$	povprečje $x_i$
$r$	Pearsonov korelacijski koeficient
$y_i$	izmerjen odziv
$\hat{y}_i$	odziv, ki ga predvideva model
$n$	število ponovitev
$v$	variance
$s$	standardni odmik
RSD	relativni standardni odmik (%)
$RSD_{\text{POOL}}$	skupni relativni standardni odmik

$S_{x/y}$                   napaka za y glede na x

## Uporabljeni simboli

EU	Evropska unija
RS	Republika Slovenija
PE	populacijski ekvivalenti
ARSO	Agencija Republike Slovenije za okolje
$\text{NO}_3^-$	nitratni ion
$\text{NO}_2^-$	nitritni ion
NO	dušikov oksid
$\text{N}_2\text{O}$	didušikov oksid
$\text{N}_2$	molekularni dušik
$\text{NH}_3$	amonijak
$\text{NH}_4^+$	amonij
$\text{O}_2$	kisik
VIS	vidni del spektra
UV	ultravijolični del spektra
TKN	celotni Kjeldahlov dušik
TN	celotni dušik
LOD	meja zaznavnosti (ang. Limit of Detection)
LOQ	meja kvantitativne določljivosti (ang. Limit of Quantitation)
ANOVA	analiza varianc
ISO	mednarodna organizacija za standardizacijo

## **ZAHVALA**

Za strokovno vodenje, nasvete in pomoč pri izdelavi magistrskega dela se zahvaljujem delovni somentorici Darji Dolžan in mentorici doc. dr. Ani Miklavčič Višnjevec.

Zahvaljujem se tudi podjetju Lotrič Certificiranje, ki mi je omogočilo izvedbo praktičnega dela v laboratoriju ter pomoč pri izvedbi.

Hvala članom komisije za pregled magistrskega dela.

Zahvala gre tudi mojim staršem, možu ter prijateljem za podporo v času študija in izvedbe magistrskega dela.

## 1 UVOD

Voda je vir življenja in nosilec vseh bioloških procesov. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) navaja, da ima 1,2 milijona ljudi nezadostno količino čiste sveže vode in 2,5 milijona ljudi pomanjkanje ustreznih higienskih razmer. Slabe higienske razmere in slaba kvaliteta pitne vode sta pomemben razlog za bolezni in umrljivost. Glede na celotno količino vode na svetu je sladke vode 2,8 %, od tega jo je le 0,6 % razpoložljive za rabo (Kasher, 2009). Potreba po pitni vodi linearno narašča s populacijsko rastjo. Hitra gospodarska rast in način življenja prispevata k vrsto onesnaženj, med drugimi tudi k onesnaženju odpadnih voda. Zato je potrebno skrbno gospodarjenje z vodami, saj je ta potrebna za zagotavljanje ustreznih življenjskih pogojev. Kljub skrbi pri porabi vode in zmanjševanju odpadne vode pri dejavnostih vseeno nastaja določena količina odpadne vode. To moramo prečistiti do takšne kakovosti, da je primerna za ponovno uporabo ali izpust nazaj v okolje. Za ugotavljanje kakovosti vode, učinkovitosti sistema čiščenja in zagotavljanja primernosti vode je potrebno vzorčenje in analiza voda, kjer se določa kemijske, fizikalne in mikrobiološke parametre (Roš in Zupančič, 2010). V zadnjih letih je na področju analitskih tehnik velik razvoj novih in bolj natančnih inštrumentov zaradi katerih je mogoče še bolj podrobno določiti onesnaževala in izboljšati procese čiščenja (Metcalf in Eddy, 2014).

Med novimi metodami so tudi kivetni testi s katerimi lahko v vodi testiramo različne parametre in zaradi svoje enostavnosti v uporabi, natančnosti, časa izvedbe, ekonomičnosti in varnosti za analitika in okolje, uspešno nadomeščajo standardne metode (Hach Lange).

Glavni del čiščenja komunalnih odpadnih vod je biološki proces s katerim znižujemo oziroma odstranjujemo dušikove, ogljikove in fosforjeve spojine. Če se dušikove in fosforjeve spojine pojavijo v površinskih vodah v prekomerni količini povzročajo evtrofikacijo (Follett in Hatfield, 2001). Zato je prav njihova določitev zelo pomembna. Dušik najdemo v različnih oksidacijskih stanjih. Oksidacijska stanja pa lahko dušik spreminja tudi s pomočjo organizmov. Najbolj splošne in najpomembnejše oblike dušika v odpadnih vodah so amonijak, amonij, dušikov plin, nitritni ion in nitratni ion. Pod izrazom celotni dušik poleg omenjenih oblik spada še organski dušik (Roš in Zupančič, 2010).

Validacija analizne metode je postopek, s katerim ovrednotimo značilnosti analizne metode in potrdimo ali je metoda primerna za določeno analitsko uporabo ali ne. Z vrsto analiz pri validaciji preverimo kako pravilen in natančen rezultat lahko pričakujemo od novega analiznega postopka (Hudnik, 2011).

## 1.1 NAMEN MAGISTRSKEGA DELA

Namen magistrskega dela je razvoj interne metode s kivetnimi testi za določanje celotnega dušika v odpadnih vodah na UV-VIS spektrofotometru ter njena validacija. Z validacijo želimo potrditi, da so izpolnjene vse zahteve, ki so predpisane za standardno metodo določitve celotnega dušika ter zahteve za akreditacijo metode po SIST EN ISO/IEC 17025.

## 1.2 CILJI MAGISTRSKEGA DELA

Vpeljava preskusnega postopka za določanje celotnega dušika v odpadnih vodah v redno delo laboratorija in priprava za akreditacijo.

## 1.3 HIPOTEZE

Hipoteza 1: Validirana metoda bo zadosti občutljiva za določanje celotnega dušika v odpadnih vodah.

Hipoteza 2: Validirana metoda bo s stališča izvedbe enostavna, hitra in primerna za rutinsko uporabo.

## 2 TEORETIČNA IZHODIŠČA

Vsaka skupnost proizvede tako trdne kot tekoče odpadke – odpadno vodo (Metcalf in Eddy, 2014). Odpadna voda je onesnažena voda, ki je lahko posledica odpadnih snovi gospodinjstev, človeških in živalskih odpadkov, industrijskih obratov, padavinskih odtokov in infiltracije podtalnice. Vsako odpadno vodo je potrebno prečistiti z namenom preprečevanja bolezni, preprečevanja onesnaževanja vodovodnih sistemov oziroma oskrbe z vodo, odstranitve vseh onesnaženih izpustov plovne vode, vzdrževanja čistih površinskih voda in podtalnice, zaščite kopalne vode in vode, namenjene zabavi in rekreaciji, ohranitve prvotnih voda za zaščito ekosistemov in ne nazadnje tudi spoštovanja predpisov (Roš in Zupančič, 2010).

S tehnološkim razvojem se je povečalo tudi število novih onesnaževalcev. Veliko kemičnih spojin je nevarnih za okolje že v majhnih količinah. Zato je razvoju novih spojin sledil tudi razvoj bolj sofisticiranih inštrumentov in analiznih metod na področju odpadnih voda. Medtem ko se večina določenih spojin podaja v enoti miligram na liter (mg/l), so sedaj na voljo tudi metode, ki podajo rezultat v mikrogramih na liter ( $\mu\text{g/l}$ ). Razumevanje karakteristik odpadne vode pa nam ne omogoča le prepoznavanja onesnaževalcev, ampak je ključno za optimalno delovanje čistilne naprave (Metcalf in Eddy, 2004).

### 2.1 ZAKONODAJA NA PODROČJU ODPADNIH VODA

Ključne vire onesnaževanja, kot so komunalne odpadne vode, obravnavajo posebne direktive EU (Falkenberg, 2010). Direktiva o čiščenju komunalne odpadne vode (Direktiva Sveta 91/271/EGS) je eden ključnih inštrumentov na področju voda v EU. Odkar je bila direktiva leta 1991 sprejeta, so se izpusti glavnih onesnaževal, ki povzročajo evtrofikacijo, bistveno zmanjšali (Evropska komisija, 2016). V Sloveniji področje voda urejajo trije osnovni zakoni, ki povzemajo najpomembnejše vsebine evropske zakonodaje: Zakon o varstvu okolja (Uradni list RS 32/93,41/2004, 20/2006, 39/2006, 70/2008, 108/2009, 48/2012, 57/2012 in 92/2013), Zakon o vodah (Uradni list RS 67/2002) in Zakon o ohranjanju narave (Uradni list RS 31/2000) ter veliko število podzakonskih predpisov, ki se nanašajo na vrednosti emisij snovi in energije v vodi ter mejne emisijske vrednosti.

Prvi, Zakon o varstvu okolja, je bil sprejet leta 1993 in je krovni zakon na področju varstva okolja v Sloveniji. Zakon ureja varstvo okolja pred obremenjevanjem kot temeljni pogoj za trajnostni razvoj. V tem okviru določa temeljna načela varstva okolja, ukrepe varstva okolja, spremljanje stanja okolja in informacije o okolju, ekonomske in finančne

instrumente varstva okolja, javne službe varstva okolja in druga, z varstvom okolja povezana vprašanja. Namen zakona je spodbujanje in usmerjanje takšnega družbenega razvoja, ki omogoča dolgoročne pogoje za človekovo zdravje, počutje in kakovost njegovega življenja ter ohranjanje biotske raznovrstnosti. Za varovanje pravice do zdravega življenjskega okolja je v skladu s tem zakonom pristojen tudi varuh človekovih pravic (Uradni list RS 32/93 in 41/2004).

Cilji varstva okolja so zlasti preprečitev in zmanjšanje obremenjevanja okolja, ohranjanje in izboljševanje kakovosti okolja, trajnostna raba naravnih virov, zmanjšanje rabe energije in večja uporaba obnovljivih virov energije, odpravljanje posledic obremenjevanja okolja, izboljšanje porušenega ravnovesja in ponovno vzpostavljanje njegovih regeneracijskih sposobnosti, povečanje snovne učinkovitosti proizvodnje in potrošnje ter opuščanje in nadomeščanje uporabe nevarnih snovi (Uradni list RS 32/93 in 41/2004).

Za doseganje ciljev varstva okolja se spodbuja proizvodnjo in potrošnjo, ki prispevata k zmanjšanju obremenjevanja okolja, razvoj in uporabo tehnologij, ki preprečujejo, odpravljajo ali zmanjšujejo obremenjevanje okolja, ter plačuje onesnaževanje in rabo naravnih virov (Uradni list RS 32/93 in 41/2004).

Zakon o vodah (Uradni list RS 67/2002) ureja upravljanje z morjem, celinskimi in podzemnimi vodami ter vodnimi in priobalnimi zemljišči. Zakon vsebuje vsebine upravljanja z vodami ter vodnimi in priobalnimi zemljišči. Ta zakon ureja tudi javno dobro in javne službe na področju voda, vodne objekte in naprave ter druga vprašanja, povezana z vodami. Cilj upravljanja z vodami ter vodnimi in priobalnimi zemljišči je doseganje dobrega stanja voda in drugih, z vodami povezanih ekosistemov, zagotavljanje varstva pred škodljivim delovanjem voda, ohranjanje in uravnavanje vodnih količin in spodbujanje trajnostne rabe voda, ki omogoča različne vrste rabe voda ob upoštevanju dolgoročnega varstva razpoložljivih vodnih virov in njihove kakovosti.

Zakon o ohranjanju narave (Uradni list RS 31/2000) je bil sprejet leta 1999. Določa ukrepe ohranjanja biotske raznovrstnosti in sistem varstva naravnih vrednot z namenom prispevati k ohranjanju narave. Določa tudi postopke in načine podeljevanja statusa naravnih vrednot ter izvajanje njihovega varstva.

### **2.1.1 Predpisi na področju odvajanja voda**

Iz Zakona o varstvu okolja izhajajo številni podzakonski akti. V nadaljevanju so na kratko predstavljeni tisti, ki urejajo odvajanje odpadnih voda. Osnovni podzakonski predpis, ki ureja odvajanje odpadnih voda v vodno okolje, je Uredba o emisiji snovi in toplote pri odvajanju odpadnih voda v vode in javno kanalizacijo (Uradni list RS, št. 47/2005,

64/2012, 64/2014 in 98/2015). Ta predpis določa splošne mejne vrednosti emisij toplote in snovi v vode in javno kanalizacijo, način vrednotenja teh emisij, prepovedi, omejitve in druge ukrepe zmanjševanja emisij ter vsebino okoljevarstvenega dovoljenja. Predpis je splošen in ureja emisije iz čistilnih in vseh ostalih naprav.

#### 2.1.1.1 Čistilne naprave

Uredba o odvajanju in čiščenju komunalne odpadne vode (Uradni list RS 98/2015) določa merila občutljivosti vodnih teles površinskih voda, mejne vrednosti emisije snovi, ukrepe zmanjševanja emisije snovi pri odvajanju komunalne odpadne vode in monitoring stanja vodnih teles, v katera se odvajajo komunalne odpadne vode.

Uredba določa tudi posebne zahteve v zvezi z obratovanjem malih komunalnih čistilnih naprav z zmogljivostjo, manjšo od 50 PE (populacijskih ekvivalentov) ter vrste nalog, ki se morajo izvajati v okviru javne službe, ter oskrbovalne standarde in tehnične, vzdrževalne, organizacijske ter druge ukrepe in normative za izvajanje javne službe. Mejna vrednost za celotni dušik pri sekundarnem čiščenju ni določena, se pa izvajajo prve meritve in meritve obratovalnega monitoringa. Mejna vrednost terciarnega čiščenja znaša do 100 000 PE 15 mg/l, nad 100 000 pa 10 mg/l. Učinek čiščenja celotnega dušika mora biti do 100 000 PE 70 % in nad 100 000 PE 80 % (Uradni list RS 98/2015).

#### 2.1.1.2 Industrijske naprave

Ostale uredbe, ki prav tako določajo mejne vrednosti emisij in ukrepe za zmanjševanje emisij, veljajo za posamezne industrijske oziroma storitvene dejavnosti. Trenutno obstaja 40 uredb, ki pokrivajo emisije pri odvajanju odpadnih vod iz naprav iz različnih dejavnosti. Ti predpisi določajo mejne vrednosti emisij glede na posebnosti odvajanja odpadnih vod v tej dejavnosti. Mejne vrednosti so lahko izražene kot koncentracija snovi, količina snovi na maso izdelka ali surovine (emisijski faktor) ter kot maksimalna letna dovoljena količina posamezne odvedene nevarne snovi (ARSO, 2016).

#### 2.1.1.3 Monitoring odpadnih voda

Glavni predpis, ki ureja to področje, je Pravilnik o prvih meritvah in obratovalnem monitoringu odpadnih voda (Uradni list RS, št. 94/2014, 98/2015). Pravilnik določa parametre, vrste in obseg prvih meritev in obratovalnega monitoringa odpadnih voda, metodologijo vzorčenja in merjenja parametrov ter pretok odpadnih voda. Določa vsebino



poročila o opravljenih prvih meritvah in obratovalnem monitoringu ter način in obliko sporočanja podatkov o prvih meritvah in obratovalnem monitoringu. Določa tudi pogoje, ki jih mora izpolnjevati oseba, ki izvaja prve meritve in emisijski monitoring. Priloga 1 pravilnika določa merila za določanje enot obremenitve. Za vsak parameter je določena tudi količina onesnaževala, do katere se enote obremenitve ne določajo. Za celotni dušik je določena mejna vrednost 5 mg/l.

#### 2.1.1.4 Okoljska dajatev

Uredba o okoljski dajatvi za onesnaževanje okolja zaradi odvajanja odpadnih voda (Uradni list RS, št. 80/2012) določa vrste onesnaževanja, za katere se plačuje okoljska dajatev. Vrsti onesnaževanja, za kateri se plačuje okoljska dajatev, sta industrijske odpadne vode in komunalne odpadne vode.

## 2.2 SESTAVA ODPADNE VODE

Približno 80 let nazaj so bila gospodinjstva glavni vir odpadnih voda. Z razvojem industrije se je povečal delež industrijskih odpadnih voda. Delež strupenih kovin in sinteznih organskih spojin se je močno povečal in ocenjeno je, da je vsako leto za 10 000 več novih organskih spojin. Tehnološki razvoj in s tem nove sestavine odpadnih voda privedejo do dražjih in zahtevnejših postopkov čiščenja. Če bi se res hoteli izogniti onesnaževanju voda, bi morali imeti za vsako novo spojino, ki lahko pride v vode, tehnologijo za odstranitev. V primeru neučinkovite tehnologije nova spojina ne bi smela biti v uporabi (Metcalf in Eddy, 2004).

Za učinkovito delovanje in kontrolo delovanja biološke čistilne naprave je potrebno imeti čim bolj natančne podatke o sestavi odpadne vode na vtoku in iztoku čistilne naprave. Komunalna odpadna voda vsebuje približno 99,9 % vode in približno 0,1 % raztopljenih ali suspendiranih snovi v vodi. Odpadno vodo lahko ovrednotimo na podlagi fizikalnih, kemijskih in bioloških lastnosti, ki so odvisne od uporabe vode v naseljih (vaseh ali mestih), prispevka industrije, vremena in infiltracije (prispevek vode, ki doteka v kanalizacijski sistem zaradi netesnih cevi) (Roš in Zupančič, 2010).

Najpomembnejši fizikalni prameter, ki se ga določa v odpadnih vodah, so celokupne trdne snovi. Ostali pomembni parametri so motnost, barva, prepustnost, temperatura, prevodnost, koncentracija in specifična masa.

Glavne skupine mikroorganizmov so bakterije, glive, praživali, virusi ter mikroskopske rastline in živali. Za določevanje patogenosti voda se uporabljajo indikatorske bakterije, ki jih določimo kot totalne koliforme, fekalne koliforme in fekalne streptokoke. Kemijske lastnosti odpadnih voda so: pH, kloridi, alkaliniteta, dušikove spojine, fosfor, žveplo, plini, kovinske sestavine in skupne organske sestavine (Roš in Zupančič, 2010).

### 2.2.1 Dušikove spojine

Dušik je esencialni element za avtotrofne in heterotrofne organizme in je pogosto omejujoč element v vodnih ekosistemih (Ferree, 2001). Ker je dušik eden osnovnih gradnikov beljakovin, je tudi nujno potreben pri biološkem čiščenju (Roš in Zupančič, 2010), nasprotno pa večji vnosi dušika lahko povzročijo razrast fitoplanktona in makrofitsko produkcijo, poznejše odmiranje teh organizmov pa privede do porabe raztopljenega kisika (Ferree, 2001).

Viri dušika so dušikove spojine, ki nastajajo v rastlinah in živalih, natrijev nitrat, ki ga najdemo kot mineralni depozit (npr. v Čilu), in atmosferski dušik. Dušik se nahaja v različnih oksidacijskih stanjih (preglednica 1), ki jih lahko dušik spreminja tudi s pomočjo živih organizmov (Roš, 2010).

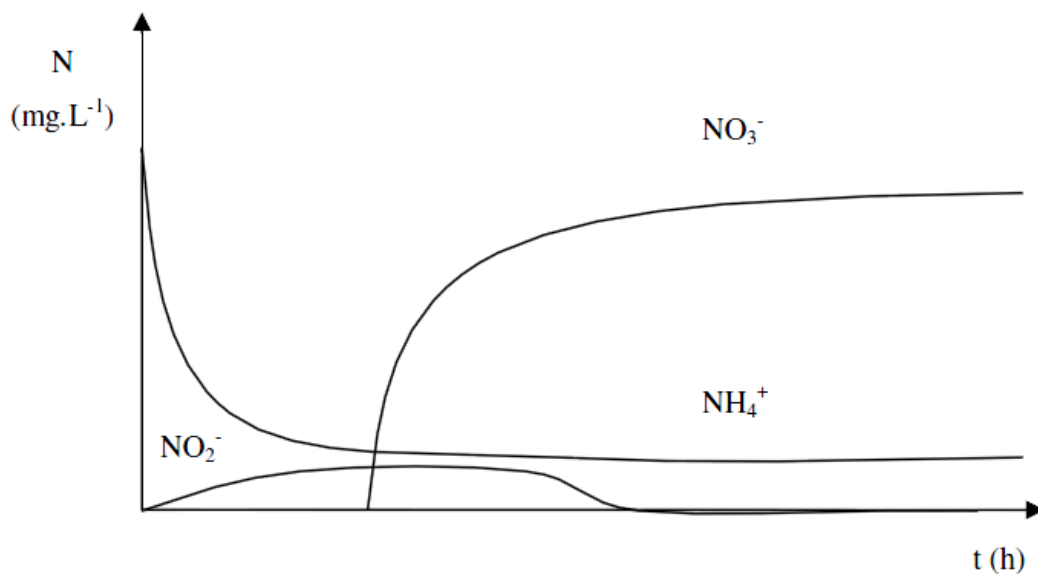
**Preglednica 1. Oksidacijska stanja dušika (Gerardi, 2002):**

Dušikova snov	Kemična formula	Oksidacijsko stanje N
Nitratni ion	$\text{NO}_3^-$	V
Nitritni ion	$\text{NO}_2^-$	III
Dušikov oksid	NO	II
Didušikov oksid	$\text{N}_2\text{O}$	I
Molekularni dušik	$\text{N}_2$	0
Amonijak	$\text{NH}_3$	- III
Amonij	$\text{NH}_4^+$	- III

Najbolj splošne in najpomembnejše oblike dušika v odpadnih vodah so amonijak ( $\text{NH}_3$ ), amonij ( $\text{NH}_4^+$ ), dušikov plin ( $\text{N}_2$ ), nitritni ion ( $\text{NO}_2^-$ ) in nitratni ion ( $\text{NO}_3^-$ ). Izraz skupni dušik zajema dušik v organskih spojinah, amonijak, amonij, nitritni ion ter nitratni ion (Roš, 2010). V komunalni vodi je približno 60 % dušika organskega in 40 % v anorganski obliki. Organske spojine so aminokisljine, proteini in urea, medtem ko je amonij glavna anorganska oblika (Ferree, 2001).

### 2.2.1.1 Nitrifikacija

Nitrifikacija je pretvorba amonijaka do nitrata s pomočjo mikroorganizmov v aerobnih pogojih. Pretvorba je dvostopenjska in v vsaki stopni sodelujeta različni vrsti mikroorganizmov, najpogosteje *Nitrosomonas* in *Nitrobacter*. V prvi stopnji bakterije rodu *Nitrosomonas* oksidirajo amonij v nitrit. Sledi oksidacija nitrita v nitrat s pomočjo bakterije *Nitrobacter* (Bitton, 2005). Torej kinetika nitrifikacije poteka tako, da se na začetku nitrifikacije koncentracija amonijaka znižuje, koncentracija nitrita in nitrata pa povečuje. Nato bakterije začnejo razkrajevati in razgrajevati nitrit, pri čemer se koncentracija nitrita znižuje, koncentracija nitrata pa se do konca nitrifikacije povečuje. Na koncu je koncentracija nitrita običajno nižja kot koncentracija amonijaka (Kurbus, 2008). Na sliki 1 je prikazana kinetika procesa.

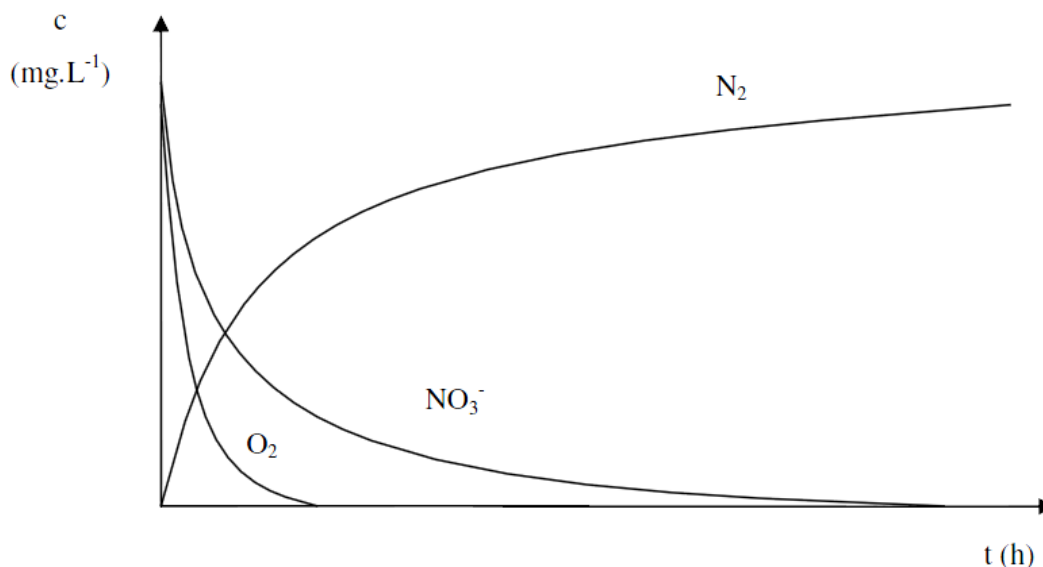


Slika 1: Kinetika nitrifikacije (Kurbus, 2008).

Kot avtotrofni organizmi morajo nitrifikatorji reducirati oksidirane ogljikove spojine v odpadni vodi za celično rast. Za popolno pretvorbo sta potrebna še kisik (4,6 mg O<sub>2</sub>/mg amonijevega dušika, oksidiranega do nitratnega dušika) ter primeren pH (7,2–7,8) (Bitton, 2005).

### 2.2.1.2 Denitrifikacija

Denitrifikacija poteka s pomočjo heterotrofnih organizmov v anoksičnih razmerah. V procesu denitrifikacije mikroorganizmi pretvorijo nitrat v elementarni dušik (N<sub>2</sub>). Bakterije za delovanje porabljajo vezani kisik iz nitrata ter organski ogljik (npr. etanol, celuloza, glukoza). Na začetku se koncentracija nitrita znižuje, pri čemer se tvori plinasti dušik (slika 2). Na hitrost denitrifikacije vpliva koncentracija kisika, ki zavira rast bakterij. Vrednost pH mora biti od 8,5 do 9 (Bitton, 2005).



Slika 2: Kinetika denitrifikacije (Kurbus, 2008).

### 2.2.2 Čiščenje odpadnih voda s poudarkom na odstranjevanju dušikovih spojin

Čiščenje odpadnih voda je sestavljeno iz ločenih procesov čiščenja, v katerih se voda očisti do te mere, da ni več škodljiva za okolje. Ustrezno prečiščena voda je ustrezna za ponovno uporabo, vendar se običajno izliva v površinske vode, v glavnem v reke. Procesne enote čistilne naprave so predčiščenje, primarno, sekundarno in terciarno čiščenje (Roš in Zupančič, 2010).

V procesu predčiščenja se odstranijo večji trdni delci ter olja in maščobe. Za industrijske vode je predčiščenje velikokrat pogoj pred izpustom v kanalizacijsko omrežje. Primarno čiščenje sledi predčiščenju. Odstranjujejo se tako ujedljive snovi kot primarno blato. Zaradi zmanjšanja hitrosti toka odpadne vode se lahko usedljive snovi posedejo na dno, plavajoče pa ostanejo na vrhu. Po predčiščenju in primarnem čiščenju v vodi ostane veliko koloidnih in raztopljenih snovi, ki jih je treba odstraniti pred izpustom. Te odstranimo v fazi sekundarnega čiščenja, in sicer z biološkim čiščenjem. Poznamo več sistemov biološkega čiščenja: naravne sisteme za čiščenje odpadne vode, sisteme čiščenja z aktivnim blatom in sisteme s pritrjeno biomaso. Naravni sistemi posnemajo samočistilno sposobnost narave za čiščenje onesnaženih voda. Z delovanjem mikroorganizmov v tleh ter s fizikalnimi in kemijskimi procesi v sedimentih se voda očisti do zahtevanih normativov. Običajno jih uporabljajo za čiščenje odpadnih voda manjših naselij ter so v obliki lagun in namakalnih polj. Sistem z aktivnim blatom je najbolj razširjen proces za odstranjevanje raztopljenih snovi, drobnih neraztopljenih snovi in koloidnih organskih onesnaževal iz odpadne vode. Zadnje čase se postopek z aktivnim blatom poleg odstranjevanja drugih parametrov uporablja tudi za nitrifikacijo in denitrifikacijo. Amonijak je strupen za vodne

organizme in pri visokih koncentracijah porablja kisik v tekočih vodah. Nitrati lahko kontaminirajo podtalnico in so škodljivi za ljudi (Roš in Zupančič, 2010).

Poleg sistemov z aktivnim blatom, kjer je biomasa razpršena v prezračevalniku, poznamo vrsto sistemov, pri katerih je biomasa priraščena na nosilce biomase. Taki sistemi so precejalniki, rotirajoči biološki kontaktorji in različni biofiltri. Reaktorji s pritrjeno biomaso opravljajo enako nalogo kot prezračevalniki z aktivnim blatom. Mikroorganizmi oksidirajo organsko snov in amonij v novo biomaso ob prisotnosti kisika. Terciarno čiščenje je nadaljnja obdelava iztoka iz sekundarnega čiščenja. Odstranjujejo se preostale razgradljive organske snovi, suspendirane snovi, bakterije, specifične strupene snovi, predvsem pa hraniva (dušikove in fosforjeve spojine), ki se niso odstranila v sekundarnem čiščenju (Roš in Zupančič, 2010).

V zadnjih desetih letih je potekalo mnogo raziskav bioloških sistemov za odstranjevanje hraniv (dušikovih in fosforjevih spojin). Razvitih je bilo veliko modifikacij konvencionalnega sistema z aktivnim blatom. Glavna razlika med konvencionalnim sistemom in sistemi za odstranjevanje hraniv je v različnih pogojih dela v bioreaktorjih in v starosti blata. Bioreaktorji so podobni kot pri sistemu z aktivnim blatom, le da so v njih vgrajene pregrade, ki ustvarijo različne pogoje za delovanje. Prisotne so različne cone, glede na vsebnost kisika. Aerobna cona vsebuje kisik, ki ga mikroorganizmi potrebujejo za normalno delovanje. V anoksični coni mora biti koncentracija kisika manjša od 0,5 mg/l. Vir kisika sta nitratni in nitritni dušik. V anaerobni coni je vir kisika organska snov, ne sme pa biti prisotnih nitritnih in nitratnih ionov. Teoretično so možni številni sistemi za odstranjevanje hraniv, uveljavili pa so se tisti, ki so bili ekonomsko upravičeni. Najbolj so se uveljavili sistemi v eni stopnji. Ti sistemi recirkulirajo biomaso skozi različne cone reaktorja. Z recirkulacijo vnašamo aktivno blato iz bistrilnika nazaj v glavni tok procesa. Najprej v aerobnem okolju poteče nitrifikacija, kjer poteka oksidacija amonijevega dušika v nitritni in nato v nitratni dušik. Sledi ji denitrifikacija v anoksičnih pogojih, kjer poteka redukcija nitratnega dušika v plinasti dušik (Roš in Zupančič, 2010).

#### 2.2.2.1 Pomen odstranjevanja dušikovih spojin

Komunalne odpadne vode vsebujejo dušik, v glavnem v obliki amonijaka in organskega dušika. V procesu primarnega čiščenja komunalnih voda se odstrani približno 15 % celotnega dušika, v glavnem organskega dušika v obliki trdnih delcev. Konvencionalno biološko čiščenje nadaljnje odstrani 10 % dušika. Najbolj učinkovito je potem terciarno čiščenje.

Neočiščene ali slabo prečiščene odpadne vode z visoko vsebnostjo amonija ali nitrata, odvedene v površinske vode, lahko povzročijo številne okoljske probleme, kot so strupenost, zmanjšana vsebnost kisika površinske vode, eutrofikacija in korozija, lahko pa tudi neposredno vplivajo na zdravje ljudi. Neioniziran amonijak je strupen za ribe. V

nevtralnem pH je 99 % amonijaka kot  $\text{NH}_4^+$ . Pri pH večjem od 9 se poveča koncentracija  $\text{NH}_3$ . Torej je odstranjevanje amonijaka pomembno pri odvajanju alkalne odpadne vode. Pri oksidaciji amonijaka se v površinskih vodah porablja kisik, in sicer 1 mg amonijaka porabi 4,6 mg kisika, kar močno vpliva na celoten ekosistem. Odvajanje vode, bogate z dušikom, v površinske vode lahko stimulira rast alg in vodnih rastlin. Te ponoči porabijo veliko kisika, kar vpliva na ribe in ostale organizme. Rast alg in rastlin ima negativen vpliv tudi na vodne dobrine, kot sta pitna voda in rekreacija. Amonijak v višjih koncentracijah (1 mg/l) lahko povzroča korozijo bakrenih cevi. Povišana vsebnost nitratov v pitni vodi lahko pri dojenčkih povzroča methemoglobinemijo (ang. Blue-baby syndrome) in potencialna rakava obolenja odraslih. Methemoglobinemija nastane zaradi pretvorbe nitrata v nitrit v prebavnem traktu človeka s pomočjo bakterij. Nitrit nato reagira s hemoglobinom tako, da nastane metahemoglobin, posledica tega pa je, da je prenos kisika do celic onemogočen, kar povzroča smrt. Dojenčki so najbolj ranljiva skupina zaradi višjega pH želodca, ki omogoča povečano redukcijo nitrata v nitrit (Bitton, 2005).

## 2.3 VZORČENJE ODPADNIH VODA

Glavni nameni vzorčenja in analiziranja voda so določevanje kakovosti voda (površinske, pitne, odpadne), zagotavljanje primernosti tako pitne vode kot tudi vode za druge namene (v industriji ali kmetijstvu) in ugotavljanje učinkovitosti sistema čiščenja odpadnih vod (Roš in Zupančič, 2010).

Vzorec mora biti reprezentativen toku, ki ga analiziramo. Zato sta zelo pomembna mesto ter tehnika vzorčenja. Sama napaka vzorčenja lahko vodi do napačnih podatkov in posledično napačnih odločitev pri izvedbi analize ali vodenja procesov, zato je pravilen in strokoven odvzem ključnega pomena (Roš in Zupančič, 2010).

Izvedba prvih meritev ali obratovalnega monitoringa obsega (Uradni list RS, št. 94/2014, 98/2015):

1. merjenje pretoka, temperature in pH odpadne vode;
2. vzorčenje, pripravo, prevoz in shranjevanje vzorcev;
3. kemijsko, biološko in ekotoksikološko analizo odpadne vode;
4. vrednotenje emisije snovi, emisijskega deleža oddane toplote ter izračun letne količine odpadne vode in letne količine onesnaževal;
5. izračun emisijskega faktorja ali učinka čiščenja odpadne vode za posamezni parameter, če je za emisijski faktor oziroma učinek čiščenja odpadne vode predpisana mejna vrednost;
6. izračun letnega seštevka enot obremenitve okolja zaradi odvajanja odpadnih voda za industrijske odpadne vode;

## 7. izdelava poročila o opravljenih meritvah.

Glede na namen in izvedbo programa vzorčenja moramo izbrati način, kako se bodo vzorci odvzemali, določiti vzorčevalno mesto ter analize, ki jih bomo izvedli na vzorcu. Glede na vrsto potrebne informacije in narave procesa analiziranja lahko vzorce zbiramo na različne načine. Zbiramo jih lahko ročno ali avtomatsko, z enkratnim odvzemom, združujemo lahko enkratne vzorce iz posameznih vzorcev (Roš in Zupančič, 2010).

Glede na način vzorčenja ločimo različne vrste vzorcev. Naključni ali trenutni vzorec se vzorči ročno. Uporabljamo ga, če želimo dobiti hitro informacijo o sestavi odpadne vode. Sestavljeni vzorec je pripravljen z mešanjem posameznih vzorcev, pridobljenih naključno v nekem časovnem obdobju, običajno za 24 ur. Vzorec se lahko pridobi ročno ali z opremo za avtomatsko vzorčenje. S sestavljenim vzorcem pridobimo informacije o povprečnih lastnostih vzorca za določeno obdobje. Časovno sorazmerni vzorec je tak vzorec, kjer se zbira enak volumen vzorca v enakem časovnem obdobju in se potem združi. Zbira se lahko ročno ali avtomatsko, vendar je zaradi pogostosti vzorčenja veliko priročnejši avtomatski način (Roš in Zupančič, 2010).

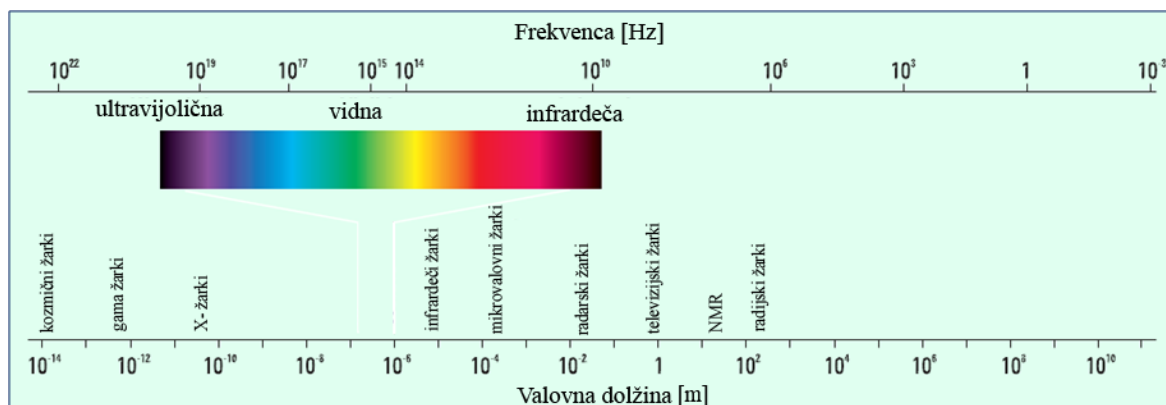
### 2.3.1 Napake pri vzorčenju odpadnih voda

Največje napake pri celotni izvedbi določanja parametrov se lahko zgodijo zaradi napak vzorčenja. Te napake se lahko zgodijo zaradi nepravilnega načina vzorčenja (pretok ni konstanten), napačno izbranega odvzemnega mesta, skladiščenja in konzerviranja vzorcev ter pri analizi plinov in komponent, ki hitro razpadejo (Roš in Zupančič, 2010).

Za čim bolj natančno vzorčenje je pomembno, da se pred vzorčenjem seznanimo z nastankom odpadnih voda, s kanalizacijskim omrežjem (mestno ali tovarniško), si ogledamo odvzemno mesto in šele potem začnemo s postopkom vzorčenja odpadnih vod (Roš in Zupančič, 2010).

## 2.4 SPEKTROSKOPIJA

Človek lahko zazna le vidni del spektra elektromagnetnega valovanja (VIS), ki obsega valovne dolžine 400–800 nm. Če to svetlobo prepustimo skozi optično prizmo, vidimo, da se razdeli na nekaj barvnih pasov z omejenimi valovnimi dolžinami. Elektromagnetno valovanje z valovno dolžino, daljšo od 800 nm, imenujemo infrardeči žarki, z valovno dolžino, krajšo od 400 nm, pa ultravijolični žarki (UV) (slika 3) (Sodja, 1998).



Slika 3: Elektromagnetni spekter (Owen, 2000).

UV/VIS spektroskopija je kvantitativna metoda, s katero lahko analiziramo spojine, ki absorbirajo elektromagnetno valovanje v ultravijoličnem ali vidnem območju (Atkins, 1997). Skozi raztopino analiznega vzorca spuščamo svetlobo izbrane valovne dolžine. Molekule vzorca absorbirajo elektromagnetno valovanje pri določeni valovni dolžini, pri čemer pridejo v višji energetski nivo. Pri tem pride do zmanjšanja intenzitete svetlobe. Spektrofotometrijo uvrščamo med molekulsko absorpcijsko spektrometrijo. Spektrofotometrija je uporabna za določanje širokega nabora snovi pri različnih valovnih dolžinah (od 190 do 780 nm). Spektri torej nastanejo z vzbujanjem atomov oziroma molekul. Poznamo več vrst spektrov, in sicer elektronske, vibracijske in rotacijske. V UV in vidnem območju nastanejo spremembe energije elektronov. Elektronski spektri nastanejo, če elektroni iz osnovnega stanja preidejo v vzbujeno stanje. Pri tem se vračajo in oddajajo energijo v obliki elektromagnetnega valovanja. V infrardečem spektralnem območju nastajajo vibracijske in rotacijske spremembe (Brodnjak, 2006).

### 2.4.1 Spektrofotometer

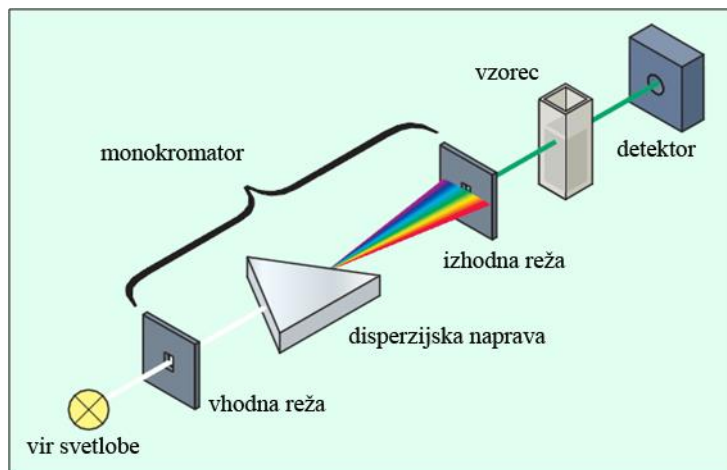
Spektrofotometer je instrument, ki meri absorbanco vzorca. Absorpcijsko svetlobo podaja Beerov zakon. Instrument je sestavljen iz izvora svetlobe, monokromatorja, kivete in detektorja. Za izvor svetlobe se uporablja devterijevo (območje od 195 do 375 nm) ali volframovo žarnico (od 350 do 1000 nm). Devterijeva žarnica ima dobro intenziteto v UV območju in omogoča uporabno intenziteto v vidnem območju. Čez čas se intenziteta žarnice zmanjša; zamenjati jo je potrebno po približno 1000 urah. Drugi vir, volframova žarnica, pa ima dobro intenziteto v delu UV spektra in skozi celotno vidno območje. Ta tip luči ima zelo malo šumov in je uporaben za 10 000 ur. Večina spektrofotometrov ima oba vira svetlobe, ki se ju da določiti glede na potrebe (Owen, 2000).

Glavni del instrumenta je monokromator, ki od svetlobe, ki jo oddaja svetilo, prepušča zelo ozek pas valovnih dolžin (slika 4). Da ugotovimo valovno dolžino maksimalne absorpcije, posnamemo absorpcijski spekter raztopine (Sodja, 1998). Monokromator je sestavljen iz vhodne in izhodne reže, optične rešetke ali prizme in zrcala. Za UV in vidno območje

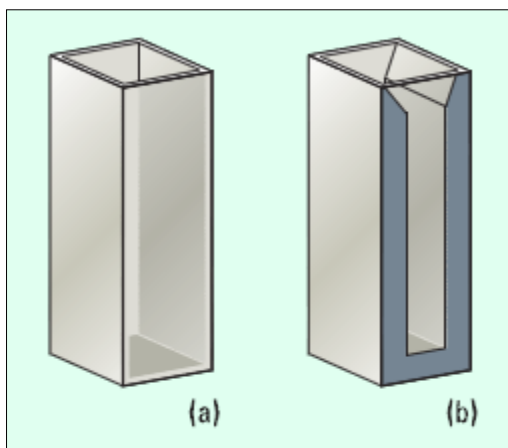


morajo biti uklonske mrežice ali prizme iz kvarčnega stekla. Prizme so enostavne in poceni, vendar je disperzija pod kotom in nelinearna. Kot disperzije svetlobe je tudi temperaturno občutljiv. Zaradi teh razlogov imajo novejši spektrofotometri uklonske mrežice namesto prizem. Uklonske mrežice so ravne ali ukrivljene steklene ali plastične površine, v katere so z diamantnim nožem vrezane številne zarezice. Zarezice morajo biti paralelne in enakih velikosti. Na dobro obdelano površino je nanesen tanek sloj aluminija. Uklonske mrežice imajo linearno disperzijo žarkov in niso temperaturno občutljive (Owen, 2000).

Vzorec damo v kiveto (slika 5). Ta mora biti popolnoma prepustna za svetlobo. Debelina sten mora biti enakomerna. Po obliki so lahko okrogle ali oglate. Lahko so narejene iz akrila, stekla in kvarčnega stekla. Kvarčno steklo se uporablja za valovne dolžine pod 210 nm. Steklo se uporablja za valovne dolžine nad 320 nm in akrilne kivete nad 290 nm. Vse vrste kivet pa lahko uporabljamo nad 320 nm. Steklene so občutno dražje od plastičnih, vendar s pravo uporabo skoraj neuničljive. Potrebna je pazljivost pri rokovanju s kivetami. Praske in odtisi prstov lahko povečajo absorbanco in s tem povzročimo napako meritve. Pred vsako meritvijo kiveto obrišemo z namenskim papirčkom. V primeru večje kontaminacije uporabimo blag detergent ali namenska čistila. Za vse materialne je značilna 10 % izguba v propustnosti. Na razpolago je veliko vrst kivet, od različnih oblik do razlik v materialu. Najbolj pogosta je štirioglata kiveta širine 12,5 mm (slika 5). Če smo zelo omejeni s količino vzorca, lahko uporabimo tudi mikro kiveto, kjer potrebujemo samo 60  $\mu$ l vzorca (Owen, 2000).



Slika 4: Konvencionalni spektrofotometer (Owen, 2010).

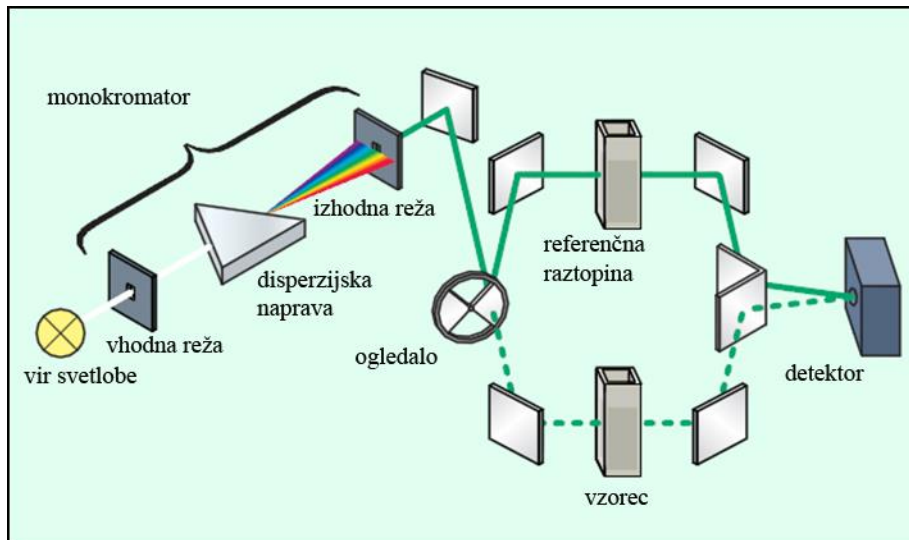


Slika 5: Levo je klasična kiveta, desno mikroktiveta (Owen, 2010).

Za doseg točnih rezultatov mora vzorec vsebovati samo vzorčni parameter, za katerega je bila izvedena kalibracija.

Detektor meri intenziteto prepuščene svetlobe skozi vzorec. Pri tem se svetlobno energijo pretvori v električni signal. Za merjenje intenzitet svetlobe se uporablja fotopomnoževalnike ali fotodiode. Fotopomnoževalnik je visoko občutljiv pri nizkih intenzitetah svetlobe skozi celotno UV območje, vendar je razlika med slepim vzorcem in vzorcem z zelo nizko koncentracijo kljub natančnemu instrumentu ponavadi premajhna za natančnost rezultata. Fotodiode se uporabljajo v primeru višje intenzitete svetlobe (Owen, 2000).

Obstajata dve glavni vrsti spektrofotometrov, in sicer enožarkovni in dvožarkovni. Pri enožarkovnem spektrofotometru se najprej izmeri absorbanco slepega vzorca in instrument nastavi na nič. Potem se izmeri še absorbanca vzorca. Prednost enožarkovnega spektrofotometra je večja kompaktnost in s tem lažje rokovanje pri terenskem delu ter večji dinamični domet, kot ga ima dvožarkovni. Pri dvožarkovnem, prikazanem na sliki 6, s pomočjo nastajata ogledala dva žarka. En žarek prehaja skozi referenčno raztopino, drugi pa istočasno skozi vzorec. Meritve z dvožarkovnim instrumentom so točnejše, ker instrument odšteva žarek, ki gre skozi slepi vzorec od žarka, ki gre skozi vzorec. S tem se izognemo napakam zaradi nihanja napetosti izvora svetlobe (Owen, 2000).

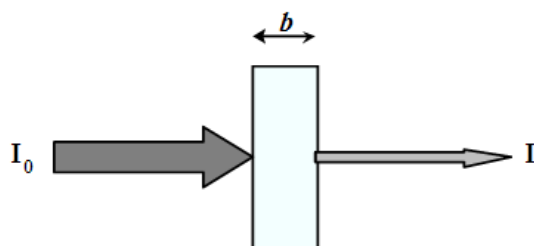


Slika 6: Dvožarkovni spektrofotometer (Owen, 2000).

## 2.4.2 Merjenje s spektrofotometrom

Za kvalitativno določanje parametrov je potrebno najprej izvesti umeritveno krivuljo za želeni parameter. Pri umeritveni krivulji moramo absorbanco slepega vzorca nastaviti na nič, tako da so absorbance vseh ostalih merjenih standardnih raztopin prikazane glede na referenčni vzorec. Spektrofotometer tako poda delež absorbance (količino absorbirane svetlobe glede na referenčni vzorec). Če spojina sama ne absorbira oz. je absorbanca šibka, si lahko pomagamo z dodajanjem reagentov, s katerimi bo tvorila obarvan produkt (Skoog in sod., 2004).

Količino merjenca v kiveti dobimo na podlagi meritve absorbance ( $A$ ) ali propustnosti ( $T$ ) raztopine. Propustnost je izražena kot razlika med intenziteto svetlobe  $I_0$  in  $I$  (slika 7). Razlika nastane zaradi odbite svetlobe na sprednji strani kivete in zaradi absorpcije medija (Owen, 2000).



Slika 7: Zmanjšanje intenzitete žarka sevanja zaradi absorpcije v raztopini (Owen,2000).

V praksi to pomeni, da če gre 100 fotonov svetlobe v kiveto in jih izstopi le 50, je propustnost 0,5 oz. 50 %. Območje propustnosti je med 0 in 1 oz. med 0 in 100 %. Matematično je propustnost izražena kot (2.1):

$$T = I / I_0 \quad (2.1)$$

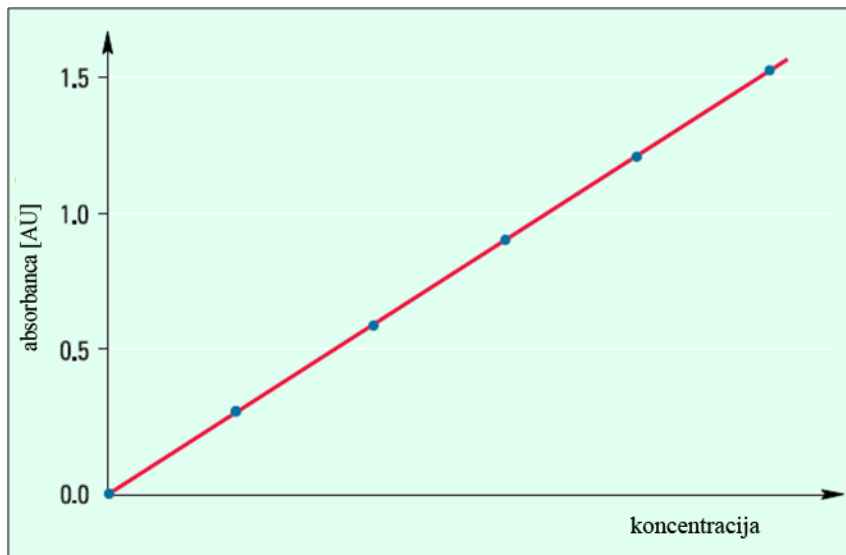
Absorbanco pa iz prepustnosti izrazimo kot (2.2):

$$A = \log_{10} T = \log(I_0 / I) \quad (2.2)$$

Absorbanca raztopine narašča z zmanjševanjem intenzitete elektromagnetnega valovanja po prehodu skozi raztopino. Večja je koncentracija in optična pot svetlobe, večja bo absorbanca, kar prikazuje slika 8. Razmerje med absorbanco, koncentracijo in dolžino poti sevanja je definirano kot Beer-Lambertov zakon (enačba 2.3). Ta določa, da je linearna zveza med intenziteto absorbirane svetlobe in koncentracijo absorbirajoče snovi pri nizkih koncentracijah. Pri višjih koncentracijah zaradi medmolekulskih interakcij zveza ni več linearna (Owen, 2000).

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon \quad (2.3)$$

- A = absorbanca,
- c = koncentracija snovi v vzorcu (mol/l),
- l = optična pot (cm),
- $\varepsilon$  = molarni absorpcijski koeficient (l/mol cm).



Slika 8: Beer-Lambertov zakon: na ordinati je prikazana absorbanca, na abscisi koncentracija (Owen, 2000).

Molarni absorpcijski koeficient je odvisen od vrste topljenca in valovne dolžine svetlobe. Za raztopino z istim topljencem pri isti valovni dolžini ( $\varepsilon = \text{konst.}$ ), merjeni v kiveti z enako širino ( $l = \text{konst.}$ ), je absorbanca sorazmerna koncentraciji raztopine. Kot že omenjeno, linearna zveza ne obstaja pri višjih koncentracijah zaradi medmolekulskih interakcij, zato je potrebno raztopine redčiti.

Za določitev koncentracije preiskovanega parametra izdelamo umeritveno krivuljo. Pripravimo standardne raztopine v koncentracijskem območju 1 : 5 in izmerimo njihovo absorbanco (Sodja, 1998).

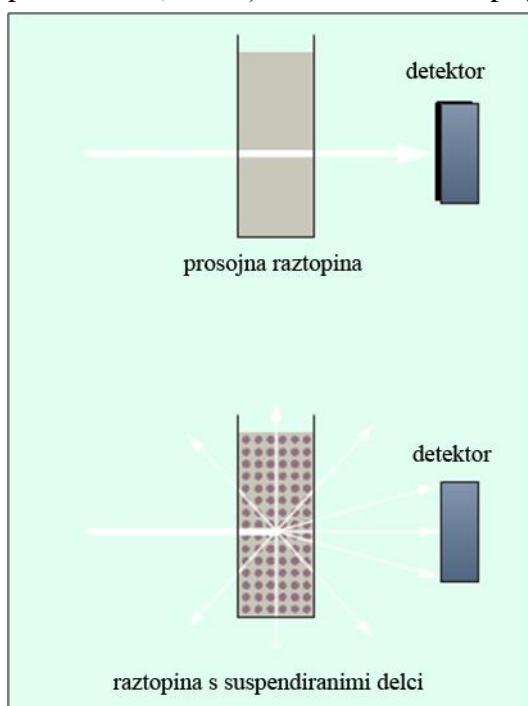
Veliko parametrov ima zelo šibko absorbanco ali je sploh nima v UV ali vidnem območju. Rešitev je dodajanje organskih reagentov, ki tvorijo kompleks z merjencem. Kompleks ima tako veliko večjo absorbanco kot sam merjenec (Owen, 2000).

### 2.4.3 Interference

V idealnih primerih je izmerjena absorbanca samo absorbanca analita, v praksi pa absorbanco lahko motijo interference, ki se pojavijo zaradi fizičnih in kemičnih razlogov.

Prisotnost drugih spojin, ki imajo absorpcijski spekter enak analitu, povzročajo napake v meritvah. V nekaterih primerih je lahko to samo ena spojina, lahko pa jih je več. Najbolj problematični so vzorci (npr. kri), pri katerih ne vemo natančne sestave.

Napako povzroča tudi sipanje svetlobe zaradi suspendiranih delcev v vzorcu. Filtriranje vzorca pred analizo eliminira sipanje, vendar ni vedno izvedljivo. Sipanje povzroča navidezno absorpcijo svetlobe. Namesto da bi svetloba šla skozi vzorec na detektor, se sipa pod kotom (slika 9). Tudi če ni absorpcije, pride manj svetlobe na detektor (Owen, 2000).



Slika 9: Prikaz sipanja svetlobe (Owen, 2000).

### 2.4.4 Uporabnost UV/VIS spektroskopije

UV/VIS absorpcijska spektroskopija je ena izmed najbolj uporabnih analiznih metod v kemiji in biokemiji. Instrumenti ne potrebujejo veliko vzdrževanja, razen zagotavljanja čistoče stekla detektorja. Glavni strošek predstavlja menjava žarnice. Uporaba je zelo enostavna ter hitra. Veliko spektrofotometrov ima dodatno programsko opremo prilagojeno

uporabnikom. Metoda ne vpliva na merjen vzorec. Kontaminacije odkrivamo s posnetkom celotnega absorpcijskega spektra. Na podlagi dodatnih vrhov lahko sklepamo o prisotnosti drugih spojin. Metoda je široko uporabna. Skoraj vse snovi absorbirajo UV ali vidno svetlobo tako, da jih lahko določimo neposredno, v primeru slabše absorpcije pa jih pretvorimo v derivate. Relativna napaka meritev je v območju med 1 in 5 % (Geisler, 2015).

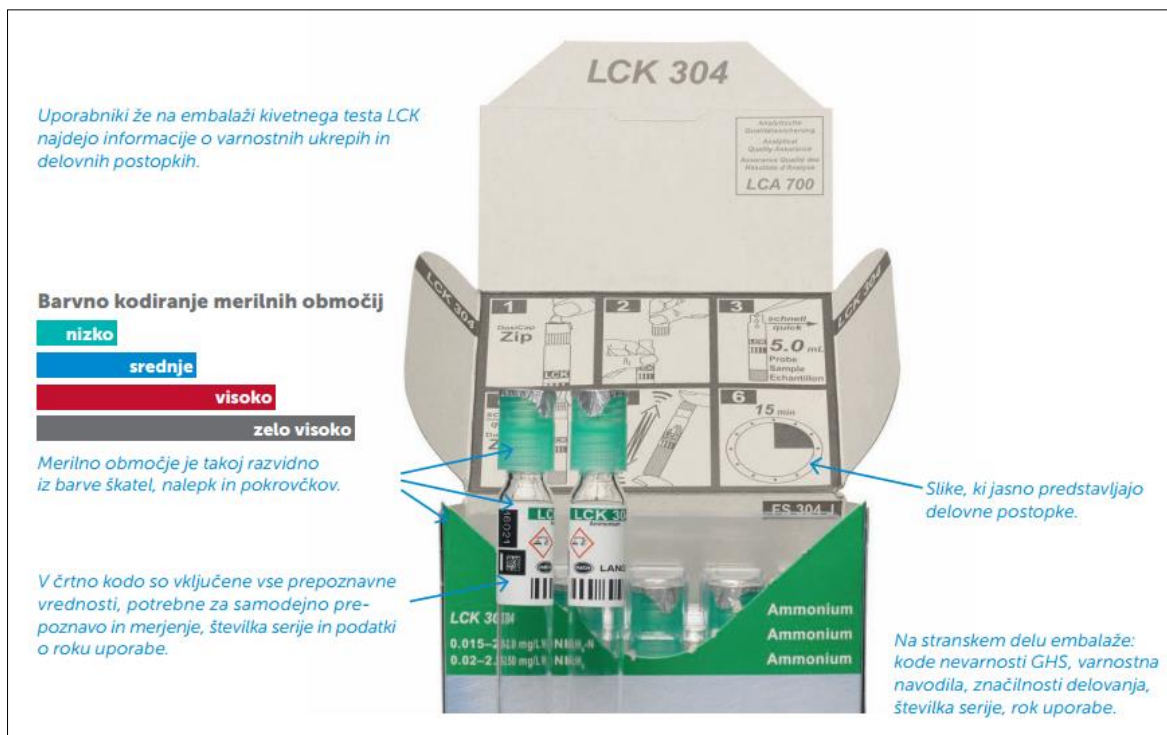
## 2.5 KIVETNI TESTI

Upravljanje javnih vodovodov in kanalizacij je v veliki meri vezano na kemične analize indikatorjev kvalitete odpadne vode. Indikatorji so kazalniki kvalitete vode. To sta poleg kemične potrebe po kisiku tudi fosfor in dušik. Obstaja veliko analitičnih metod za spremljanje omenjenih parametrov. Običajno se določujejo po nacionalnih in internacionalnih standardnih metodah. Metode so dobro proučene in dokumentirane, vendar so preveč sofisticirane in zamudne ter zahtevajo veliko izkušenj in znanja za doseg dobrih rezultatov. Večina od njih zahteva uporabo strupenih kemikalij, kar lahko povzroča zdravstvene težave analitiku in predstavlja tveganje za okolje. Zato je velika potreba po ponovljivih, poceni, nestrupenih, zanesljivih in natančnih analitskih metodah, primernih za vsakdanjo uporabo. V zadnjih desetih letih se je razvilo veliko avtomatiziranih analitskih metod in instrumentov, apliciranih za kontrolo odpadnih vod – UV/VIS spektroskopija, ionska kromatografija in druge. Spektrofotometrična analiza vode s pripravljenimi kivetnimi testi je lahko alternativa dolgotrajnim referenčnim metodam. Spektrofotometrično lahko analiziramo praktično vse sestavine in indikatorje odpadne vode neposredno oziroma po predhodni obdelavi (Dimitrova in sod., 2013).

Dimitrova s sodelavci (2013) je primerjala kivetne teste in standardne metode za določanje amonija, nitrata, celotnega fosfata in kemično potrebo po kisiku. Na realnih vzorcih odpadne vode so paralelno izvedli meritve na kivetnih testih in s standardno metodo. Statistične obdelave kažejo na odlično linearno korelacijo ( $r > 0,99$ ) pri obeh metodah. Metodi sta torej primerljivi, s tem da imajo kivetni testi nekatere prednosti: manjša testna količina vzorca, manjša poraba reagentov in posledično manj odpadkov.

Eno izmed vodilnih podjetij na področju uvajanja kivetnih testov v analitiki odpadnih voda je podjetje Hach. Nudi več kot 50 testov za testiranje različnih parametrov za skoraj 100 različnih merilnih območij. Zaradi raznolikosti testov so primerni za analizo tako pitne vode kot tudi odpadnih in procesnih voda. Kivetni testi omogočajo enostavno, varno in hitro delo. Tudi za začetnike analiza ni zahtevna, saj so na notranji strani pokrova navedena jasna navodila. Zaprt sistem in majhne količine reagentov zagotavljajo večjo

varnost uporabnikov. Proizvajalci v kompletu ponujajo reagente v zaprti kiveti, v katero je potrebno dati vzorec, včasih tudi dodatne reagente. Vsi koraki so nazorno napisani na pokrovu. Pri vseh kivetnih testih je detekcija merjenca spektrofotometrična. Primer kivetnih testov predstavlja slika 10 (Hach, 2016).



Slika 10: Sistem kivetnih testov Hach (Hach, 2016).

Leta 2007 je nizozemski inštitut Kiwa Water Research organiziral primerjalne teste na vzorcih odpadne vode, v katerih je sodelovalo približno 300 uporabnikov izdelkov Hach iz 18 evropskih držav. Analizni parametri so bili kemijska potreba po kisiku, amonij, nitrat, ortofosfat in skupni dušik. Rezultati laboratorijske raziskave so pokazali veliko primerljivost kivetne in standardne metode. Več kot 94 % vseh meritev je bilo pravilnih, od tega več kot 95 % za celotni dušik (Pütz, 2008).

Nestandardno metodo se lahko akreditira v primeru dokazov primernosti uporabe in ustrezne validacije. Leta 2007 je nemški inštitut naročil raziskavo o dopustnosti kivetnih testov za analizo pitne vode v skladu z Odlokom o pitni vodi 2001. Zaključili so, da kivetni testi Hach ustrezajo zahtevam o pitni vodi in so primerni za uradne analize pitne vode (König, 2009).

Komisija je na izboru najbolj trajnostnega produkta in storitev (Germany's most sustainable Products and Services 2009) izmed 400 podjetji imenovala podjetje Hach. Komisijo so poleg moderne tehnologije in holističnega pristopa prepričali s posebnim pristopom do reciklaže. Stranke porabljene kivete pošljejo v pooblašene zbirne centre.

Podjetje Hach jih na lastne stroške reciklira v svojem okoljskem centru, kjer poleg stekla in plastike reciklira še uporabljene kemikalije (Environmental Technology, 2009).

## 2.6 METODE ZA DOLOČANJE CELOTNEGA DUŠIKA

Standardna metoda za določanje celotnega dušika temelji na določanju celotnega Kjeldahlova dušika (TKN), vključno s koncentracijo nitrata in nitrita. Metoda določanja Kjeldahlovega dušika temelji na pretvorbi organskega dušika v aminokislinah, beljakovinah, proteinih in peptidih v amonijak. Čeprav je metoda standardna in v široki uporabi, ima pomanjkljivosti, kot so uporaba strupenega živega srebra pri visokih temperaturah, interference pri visokih vsebnostih nitrata in dejstvo, da metoda ne določa nitrata. Prav tako TKN ne poda prave vrednosti celotnega dušika, zato so potrebne dodatne analitske tehnike.

Alternativna metoda za določanje celotnega dušika je oksidacija s peroksidisulfatom (ISO 11905-1:1997). Princip metode je, da se anorgansko in organsko vezan dušik oksidira do nitrata s peroksidisulfatom (oksidant). Metoda je dobro uveljavljena in zdravju ter okolju prijaznejša. Raziskava je pokazala, da je metoda bolj občutljiva, natančna in porabi manj strupenih reagentov kot metoda po Kjeldahlu (De Borba in sod., 2014). Metoda se lahko aplicira na površinske vode, morsko, pitno in odpadno vodo. Pri maksimalnem volumnu testne porcije je zgornja meja merjenja 5 mg N/l ter spodnja 0,02 mg N/l. Spodnja meja in občutljivost sta predvsem odvisni od metode detekcije, ki jo uporabimo po oksidaciji. Nitrat lahko določamo z avtomatsko spektrofotometrično metodo konstantnega pretoka z redukcijo nitrata v nitrit s hidrazinom. Določimo ga lahko z redukcijo nitrata v nitrit z uporabo kolone, ki vsebuje pobakren kadmij, kateremu sledita reakcija in spektrofotometrično določanje. Lahko ga neposredno spektrofotometrično določimo v UV območju. Pri tej določitvi je potrebno preveriti absorbanco pričakovanih organskih spojin v vzorcu s tekočinsko kromatografijo (ISO 11905-1:1997).

V standardu je podrobneje opisana metoda določanja nitrata z redukcijo nitrata v nitrit z uporabo kolone. Po oksidaciji vzorca v nitrat sledi pretvorba nitrata v nitrit. Na koncu se doda reagent, ki tvori kompleks z nitritom in roza barvo. Sledi fotometrično določanje pri 540 nm. Umeritveno krivuljo se naredi na koncentracijskem območju od 0,8 do 4 mg/l dušika. Uporabi se največji volumen, in sicer 50 ml. Koncentracija vzorca se potem neposredno določi iz umeritvene premice v primeru, ko se uporabi volumen vzorca 50 ml. V primeru, da se uporabi manjši volumen vzorca (V), se rezultat pomnoži s 50/V (ISO 11905-1:1997).



Kivetni testi proizvajalca Hach za določanje celotnega dušika se navezujejo na zgoraj opisano standardno metodo ISO 11905-1:1997. Razlika med kivetnim testom in standardno metodo je, da standardna metoda zahteva pripravo vseh reagentov. Ti so žveplova kislina, natrijev hidroksid, oksidacijska raztopina s peroksidisulfatom, klorovodikovo kislino, bakrov sulfat pentahidrat, pobakrene kadmijve granule in barvni reagent z 4-aminobenzen sulfonamidom. Pri kivetnem testu so reagenti že pripravljene, nekateri so že v pravih volumnih, kar nam prihrani veliko časa. Zahtevane aparature pri kivetnem testu so termoblok, homogenizator in spektrofotometer. Standardna metoda zahteva spektrofotometer z avtomatskim vzorčevalnikom, redukcijsko kolono ter prav tako termoblok in homogenizator.

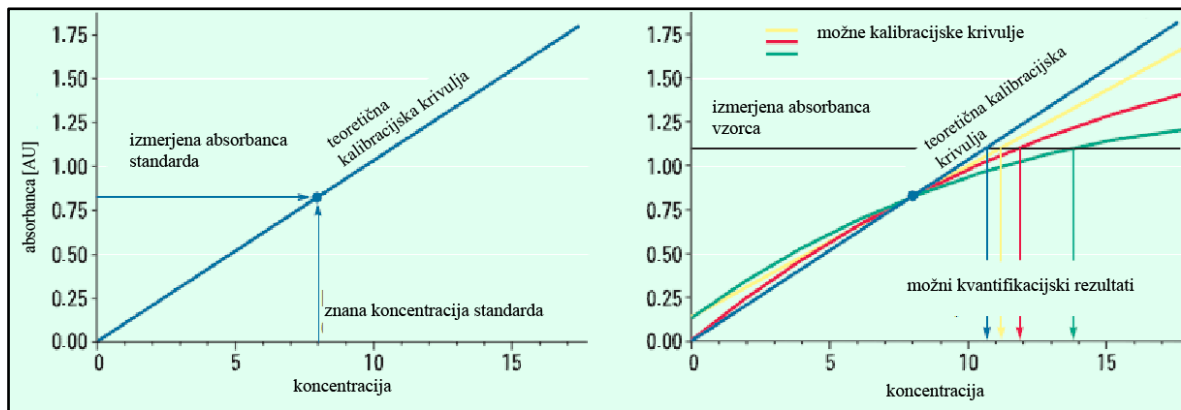
## 2.7 VALIDACIJA ANALIZNE METODE

Validacija je dokumentiran dokaz z visoko stopnjo zaupanja, da analizna metoda zagotavlja in bo konsistentno zagotavljala ponovljive, točne in natančne rezultate. Metodo morajo laboratoriji validirati v primeru novo vpeljane laboratorijske metode, nestandardne metode, metode razvite v laboratoriju, uporabe standardne metode zunaj predvidenega obsega meritve in v primeru izboljšav in modifikacij standardne metode (Magnusson in Örnemark, 2004).

Izvedba validacije obsega validacijo umeritvenega postopka, preverjanje parametrov validacije in zagotavljanje kakovosti. Vedno, ko imamo opravka z validirano metodo, ki jo je razvil nekdo drug, moramo slediti določenim priporočilom za doseg pravih rezultatov meritev. Glavno je, da je analitik popolnoma seznanjen z novo metodo. Priporočeno je, da metodo predstavi nekdo, ki jo že zelo dobro pozna. Idealno je, če novega analitika strokovnjak na začetku spremlja do samostojnosti. V vsakem primeru pa mora analitik dobro proučiti ozadje metode. Zaželeno je, da analitik določi količino vzorcev, ki jo lahko z natančnostjo analizira naenkrat (Magnusson in Örnemark, 2014).

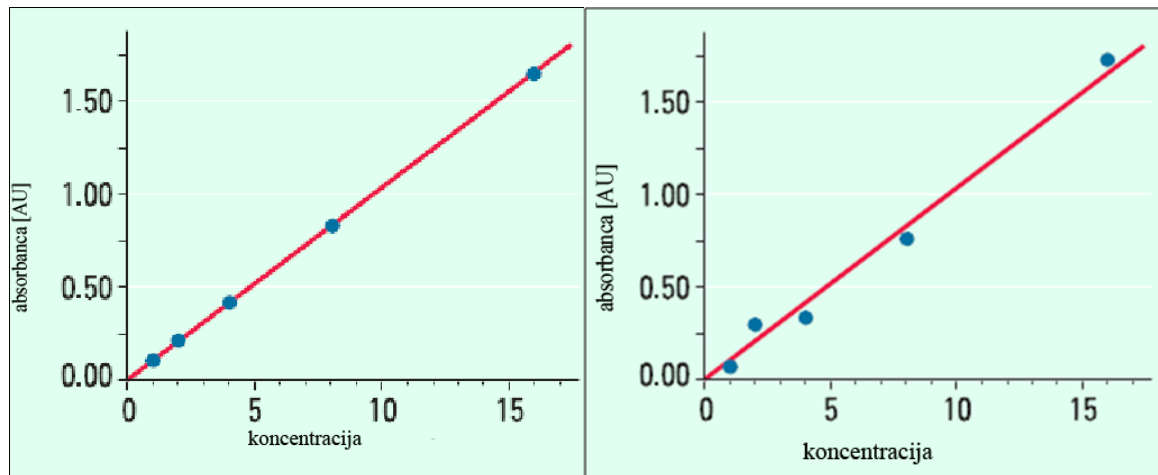
### 2.7.1 Validacija umeritvenega postopka (postavitev umeritvene premice)

Linearnost je karakteristika metode, ki podaja rezultate o koncentraciji analita v vzorcu na definiranem območju neposredno ali preko matematičnih transformacij. Za UV/VIS metode je linearno razmerje definirano z Beerovim zakonom (enačba 2.3), kjer je absorbanca neposredno povezana s koncentracijo. Številni instrumentalni parametri in napake pri ravnanju z vzorcem lahko privedejo do napak (omenjene v točki 2.4) in s tem odstopanje od Beerovega zakona. Do odstopanj lahko pride tudi zaradi napačno postavljene umeritvene krivulje, kar je razvidno iz slike 11.



Slika 11: Potencialne napake nepravilne kalibracije (Owen; 2010).

Za postavitev umeritvene premice se izmeri absorbanco vsaj trem standardnim raztopinam. Izmerjena koncentracija standardne raztopine naj bi odražala pričakovano koncentracijo raztopine. V idealnih primerih ležijo vse izmerjene koncentracije na linearni premici, vendar v praksi vrednosti vedno odstopajo od teoretične vrednosti (slika 12).



Slika 12: Idealne (levo) in realne meritve standardnih raztopin (Owen, 2010).

S statističnimi metodami zato preverimo kalibracijsko krivuljo in stopnjo odstopanja, ki se najbolj prilega rezultatom. Najbolj običajna statistična metoda je linearna regresija oz. metoda najmanjših kvadrantov (točka b). Linearnost se preverja še z drugimi statističnimi testi, kot so korelacijski koeficient (enačba 2.9), analiza varianc (enačba 2.11) in drugi (Owen, 2010).

#### a) Metoda iskanja ubežnikov znotraj skupine meritev

Pred statistično obdelavo se z metodo iskanja ubežnikov ugotovi, če katera meritev zelo odstopa od ostalih. Tako meritev imenujemo ubežnik in vpliva na točnost in natančnost metode. Najpogosteje se jih določa z Diksonovim Q-testom in z Grubbs-Beckovim testom.

Q-test:

$$Q = \frac{|\text{sumljiva meritev} - \text{najbližja meritev}|}{\text{največja meritev} - \text{najmanjša meritev}} \quad (2.4)$$

Grubbs-Beckov test:

$$z_i = \frac{y_{ij} - \bar{y}_i}{s_i} \quad (2.5)$$

Kjer je:

$S$  = standardni odklik signalov na  $i$ -tem koncentracijskem nivoju,

$y_i$  = povprečje signalov na  $i$ -tem koncentracijskem nivoju,

$y_{ij}$  = izmerjen signal za meritev  $j$  na  $i$ -tem koncentracijskem nivoju.

Po enačbi 2.5 izračunamo  $z_i$  in ga primerjamo s tabelarično vrednostjo.

b) Izračun linearne umeritvene premice 1. reda

Z metodo najmanjših kvadratov se izračuna parametre linearne umeritvene premice. V enačbi premice je  $x$  kontrolirana spremenljivka (koncentracija standarda),  $y$  pa odvisna spremenljivka (merjen signal). Vrednost neznanih parametrov odseka ( $b_0$ ) in naklona ( $b_i$ ) moramo ugotoviti na tak način, da se model, kolikor je najbolj mogoče, prilega eksperimentalnim točkam. Vrednosti  $b_0$  in  $b_i$  je potrebno izračunati tako, da je vsota kvadratov ostankov  $\Sigma (e_i)^2$  minimalna.

$$e_1 = y_1 - \bar{y}_1 \quad (2.6)$$

Vrednost odseka ( $b_0$ ) in naklona ( $b_i$ ) umeritvene premice izračunamo iz enačb:

$$b_0 = \bar{y}_i - b_1 \cdot \bar{x} \quad (2.7)$$

$$b_1 = \frac{\Sigma(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\Sigma(x_i - \bar{x})^2} \quad (2.8)$$

kjer je:

$\bar{y}$  – povprečje  $y_i$ ,

$\bar{x}$  – povprečje  $x_i$ ,

ko imajo vsi ostanki ( $e_i$ ) konstanto varianco čez celo koncentracijsko območje.

## c) Preverjanje homogenosti varianc

S pomočjo F-testa (enačba 2.11) se preveri variance na najvišjem in najnižjem koncentracijskem nivoju umeritvene krivulje

**2.7.2 Določitev validacijskih parametrov**

## d) Delovno območje

Delovno območje je območje koncentracij, v katerem lahko preskusno metodo apliciramo. Spodnje delovno območje je omejeno z mejo zaznavnosti (LOD). Meja določljivosti (LOQ) je najnižja točka umeritvene krivulje. Zgornje delovno območje je omejeno z različnimi vplivi na odziv instrumenta.

## e) Linearnost

Linearnost metode je sposobnost metode, da daje v določenem območju linearno proporcionalne rezultate glede na koncentracijo vzorca. Metoda je linearna, če je koeficient korelacije vsaj 0,99. Linearnost se ugotavlja tudi z računanjem koeficienta kvalitete (QC) (2.10). Linearnost je dobra, če vrednost QC ne presega 3 %. Vrednosti med 3 in 5 % so še dopustne, če pa je vrednost nad 5 %, je potrebno zmanjšati merilno območje krivulje. Linearnost metode se potrди tudi z analizo varianc, kjer s F-testom primerjamo odstopanje modela in eksperimentalno napako.

Pearsonov korelacijski koeficient nam poda povezanost dveh spremenljivk:

$$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}} \quad (2.9)$$

Kjer je:

$x$  = izmerjena koncentracija dušika (mg/l),

$\bar{x}$  = povprečje vrednosti  $x$ ,

$y$  = izmerjena absorbanca,

$\bar{y}$  = povprečje absorbanca.

Koeficient lahko zavzame vrednosti med 0 in 1. Bliže kot so vrednosti številu 1, močnejše sta spremenljivki povezani (Cramer, 1998).

$$QC = 100 \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 1}} \quad (2.10)$$

Kjer je:

$y_i$  = izmerjen odziv,

$\hat{y}_i$  = odziv, ki ga predvideva model,

$n$  = število koncentracijskih nivojev.

Statistični test analizo varianc uporabimo, kadar imamo dve skupini meritev, ki se med seboj razlikujeta zaradi različnih parametrov, na primer glede na način, dan, izvajalca analize in druge. Standardni odmik prve skupine meritev je  $s_1$  in druge skupine  $s_2$ . Razmerje varianc obeh skupin izračunamo po enačbi 2.11, variance pa z enačbo 2.12:

$$F_{\text{izrač.}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (2.11)$$

$$v = s^2 = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad (2.12)$$

Kjer je:

$v$  = varianca,

$x_i$  = izmerjen odziv,

$\bar{x}$  = povprečje meritev,

$n$  = število koncentracijskih nivojev.

Če je  $F_{\text{izrač.}} > F_{\text{tab.}}(0,05, n_1-1, n_2-1)$ , potem se metodi razlikujeta po natančnosti pri 0,05 nivoju statistične značilnosti. Tabelarično F vrednost odčitamo iz tabele (Brereton, 2007).

f) Določitev meje zaznavnosti in določljivosti

LOD je najnižja koncentracija analize komponente, ki jo lahko določimo v vzorcu, ne moremo pa je kvantitativno ovrednotiti. Izračunamo jo lahko po enačbi 2.14. Dobljena vrednost predstavlja absorbanco pri meji zaznavnosti. Koncentracijo nato izračunamo iz enačbe premice.

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}{n - 2}} \quad (2.13)$$

Kjer je:

$S_{x/y}$  = standardna napaka za  $y$  glede na  $x$ ,

$n$  = število meritev.

$$LOD = y_B + 3 \cdot S_B \quad (2.14)$$

Kjer je:

$Y_B = a$  = odsek premice na ordinati,

$$S_B = S_{x/y} \cdot$$

$$RSD = \frac{s(x_1)}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (2.15)$$

Meja določljivosti je najnižja koncentracija merjenega vzorca, ki jo še lahko določimo z zadovoljivo točnostjo in natančnostjo. Ponavadi je to najnižja točka umeritvene krivulje (Owen, 2010). Izračunamo jo lahko iz desetkratnega standardnega odmika raztopine (Magnusson in Örnemark, 2004).

$$LOQ = y_B + 10 \cdot S_B \quad (2.16)$$

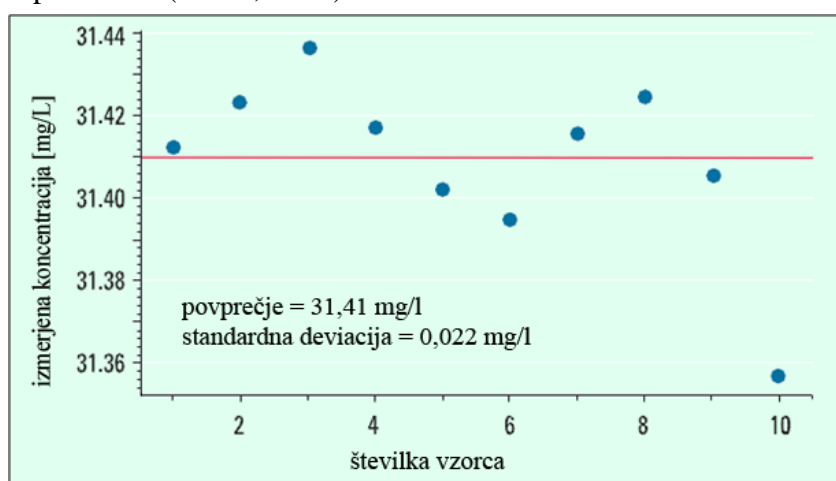
Kjer je:

$y_B = a$  = odsek premice na ordinati,

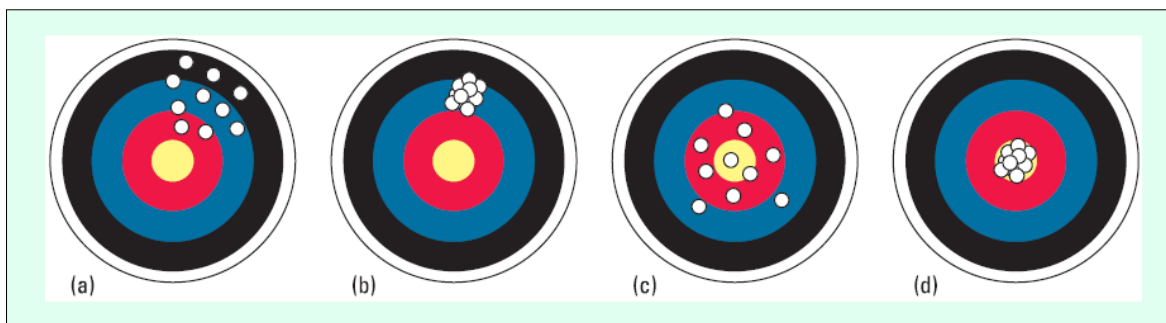
$S_B = S_{x/y}$  .

#### g) Točnost metode

S točnostjo pokažemo, da z uporabo določene analizne metode dobimo prave rezultate. Točnost je stopnja ujemanja izmerjenih rezultatov s pravo vrednostjo. Preverjanje preskusne opreme in točnosti preskusnih metod se lahko opravlja z referenčnim materialom ali certificiranim referenčnim materialom in z vzorci iz medlaboratorijskega primerjalnega preizkušanja. Za določitev točnosti metode s pomočjo referenčnega materiala izmerimo 10 do 20 vzorcev iste koncentracije. Nato rezultate statistično ovrednotimo. Ponavadi določimo povprečje, standardno deviacijo in izvedemo t-test. Slika 13 predstavlja primer sipanja rezultatov ter primer dobre standardne deviacije. Na sliki 14 vidimo štiri primere sipanja rezultatov, kjer je metoda točna, ne pa natančna. V a primeru nimamo niti natančnega niti točnega rezultata. B je primer natančnih, vendar netočnih meritev. V primeru c so rezultati točni, vendar niso natančni. Točni in natančni so rezultati v primeru d (Owen, 2010).



Slika 13: Prikaz dobre točnosti metode (Owen, 2010).



Slika 14: Primer točnosti in natančnosti (Owen, 2010).

Izračunano t-vrednost primerjamo s tabelarično vrednostjo pri dani zanesljivosti in prostostni stopnji (PS). Izračunamo standardni odmik po enačbi 2.17, nato še t-vrednost s pomočjo enačbe 2.18:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.17)$$

Kjer je:

$s$  = standardni odmik,

$n$  = število meritev,

$\bar{x}$  = povprečje meritev.

$$t_{izrač.} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (2.18)$$

Kjer je:

$s$  = standardni odmik,

$n$  = število meritev,

$\bar{x}$  = povprečje meritev.

#### h) Natančnost metode

Natančnost metode je merilo za velikost slučajne napake. Podajamo jo kot standardni odmik (enačba 2.17); manjši kot je, bolj je metoda natančna. Natančnost metode podajamo na dva načina, in sicer kot ponovljivost, ki je natančnost meritev pri ponovljivih pogojih. Obnovljivost je natančnost metode pri obnovljivih pogojih. To so lahko različni analitiki, dnevi, kemikalije.

### 3 EKSPERIMENTALNI DEL

Meritve smo izvajali v podjetju LOTRIČ Certificiranje, na oddelku za kemijo.

#### 3.1 OPREMA

##### 3.1.1 Spektrofotometer

Uporabili smo spektrofotometer UV/VIS,  $\lambda = 340$  nm, ki ima naslednje karakteristike: območje skeniranja 200–700 nm, serijska številka aparature: 502S08072306, UV-VIS svetloba, halogenska žarnica, optična pot žarka je 10 mm. Spektrofotometer je dvožarkovni z volframovo in devterijevo žarnico.

Podatki za absciso:

- rang valovne dolžine: 190 do 1100 nm,
- merilna točnost je  $\pm 0,1$  nm,
- avtomatski preklon luči pri 326 nm.

Podatki za ordinato:

- fotometrični razpon: transmisija (T) od 0 do 100 %,
- fotometrična pravilnost: absorbanca  $\pm 0,003$  (merjena pri absorbanci 1 in valovni dolžini 440 nm),

Pred analiziranjem smo spektrofotometer pustili prižgan približno 10 minut, da se žarnica segreje in sistem stabilizira. Počakali smo, da se je sistem stabiliziral, šele nato smo zagnali program (približno 3 minute po zagonu inštrumenta). Pri zagonu pazimo, da je optična pot prosta, to pomeni, da ne smemo imeti notri vzorca (PerkinElmer, 2000).

##### 3.1.2 Hladilnik

Serijska št. K000 230101

Območje: 2–8 °C

##### 3.1.3 Analitska tehtnica

M. št. M007 230485

Točnostni razred: Neavtomatska/Analitska/Elektro-mehanska tehtnica\_Točnostni razred I

Minimalno tehtanje (Min) in maksimalno tehtanje (Max): Min = 1 mg, Max = 205 mg

Najmanjši razdelek (d) in preskusni razdelek (e): d = 0,01 mg, e = 1 mg



### **3.1.4 Termoblok**

Razklopna enota za celotni dušik  
Serijska številka 0064533  
Temperaturno območje: 100 °C in 148 °C

### **3.1.5 Homogenizator**

Hitrost vrtenja rotorja: 30 000 rpm  
Volumen vzorca: od 0,1 ml do 10 l

### **3.1.6 Sistem za čiščenje vode**

Tehnika čiščenja: reverzna osmoza z ionsko izmenjavo  
Predfilter TK: vsebuje filtracijo, aktivno oglje in stabilizator trdote  
Adsorpcijski filter kartuša – poseben ionski izmenjevalec: odstrani anorganske ione in sledi raztopljenih organskih snovi.

### **3.1.7 Laboratorijska steklovina – oprana z raztopino za čiščenje (3.2.9) in sprana z deionizirano vodo**

Merilne bučke, točnosti razred A, kalibrirane pri 20 °C: 50 ml ( $\pm 0,06$  ml), 100 ml ( $\pm 0,1$  ml), 500 ml ( $\pm 0,15$  ml), 1000 ml ( $\pm 0,40$  ml)

Polnilna pipeta, točnostni razred A, kalibrirana pri 20 °C: 2,5 ml ( $\pm 0,01$  ml), 4 ml ( $\pm 0,015$  ml), 7 ml ( $\pm 0,015$  ml)

Transferpette BRAND M. št.: K000 230041, z regulacijo volumna od 0,5 ml do 5 ml

Transferpette Eppendorf Research M. št.: K000 230043, z regulacijo volumna od 100  $\mu$ l do 1000  $\mu$ l

Transferpette Eppendorf Research M. št.: K000 230044, 500  $\mu$ l

## **3.2 REAGENTI**

Uporabili smo reagente znane čistosti in vodo, katere priprava je navedena v točki 3.2.1

### **3.2.1 Sveža deionizirana voda (DI voda)**

Prečiščena voda 2. stopnje glede na ISO 3696, elektroprevodnost od 0,1 do 1  $\mu$ S/cm, brez dušika, natočena direktno iz naprave.

### **3.2.2 Pripravljeni reagenti proizvajalca Hach (slika 15)**

- Sodium hydroxide solution A,
- Oxidant tablet B,

- MicroCap C,
- 2.6-dimethylphenol solution D.



Slika 15: Reagenti proizvajalca Hach. Od leve proti desni si sledijo reagent A, B, C in D (vir: Katja Triller).

### 3.2.3 Natrijev nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ), sušen 2 uri pri $105\text{ }^\circ\text{C}$

Referenčni material A 119, Merck, Sodium nitrate, MW = 84,99 g/mol

### 3.2.4 Natrijev nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ), sušen 2 uri pri $105\text{ }^\circ\text{C}$

Referenčni material A 106, Sigma-Aldrich/ Sodium nitrate, MW = 84,99 g/mol

### 3.2.5 Kalijev nitrat ( $\text{KNO}_3$ ), sušen 2 uri pri $105\text{ }^\circ\text{C}$

CAS: 7757, Sigma-Aldrich/Potassium nitrate, puriss. p. a., ACS reagent, reag. ISO, reag. Ph. Eur., < 99 %, MW = 101,1 g/mol

### 3.2.6 Amonijev klorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )

Referenčni material A 96, SIGMA-ALDRICH, Ammonium chloride, p. a.,  $\text{H}_4\text{ClN}$ , MW = 53,49 g/mol.

### 3.2.7 Natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ )

Uporabili smo

- trden NaOH (Carlo Erba, Sodium Hydrokside, anhydrous pellets, ACS-ISO-For analysis, MW = 39,997 mg/ mol, min. 97 % NaOH),
- titrival 1 M (KEFO, Sodium hidrokside, pro analysi,  $f = 1,000 \pm 0,005$ ),
- titrival 0,1 M (KEFO, Sodium hidrokside, pro analysi,  $f = 1,000 \pm 0,005$ ).

### **3.2.8 Žveplova (VI) kislina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

SIGMA-ALDRICH, Sulfuric acid, ISO p. a., 95–97 %.

### **3.2.9 Kontrolni vzorec Aquacheck**

Dve 30 ml steklenički. Prva je vsebovala anorganski dušik, druga organski dušik. Vzorci niso zahtevali nadaljnje priprave.

### **3.2.10 Raztopina za čiščenje**

100 g ± 2 g NaOH smo raztopili v 100 ml ± 2 ml vode, ohladili in dodali 900 ml ± 50 ml 95 % etanola. Raztopino smo shranili v polietilenske steklenice.

## **3.3 POSTOPEK**

Celotni dušik smo določevali s kivetnimi testi proizvajalca Hach oznake LCK 238. Test se navezuje na ISO standard 11905-1.

Princip določanja celotnega dušika temelji na metodi, pri kateri se anorgansko in organsko vezan dušik oksidira do nitrata s peroksidisulfatom (oksidant). Nitrarni ioni ob prisotnosti fosforne in žveplove kisline reagirajo z 2,6-dimetilfenolom in tvorijo nitrofenol. Absorbanco smo izmerili pri 340 nm (Working procedure, Hach).

### **3.3.1 Odvzem in hranjenje vzorcev**

Laboratorijski vzorec smo odvzeli v steklene ali polietilenske posode, predhodno oprane z laboratorijskim detergentom. Z vzorcem smo ravnali v skladu z ukrepi, ki veljajo za delo z nevarnimi kemikalijami ali kužnim materialom. Vzorce smo do analize hranili pri 2–5 °C in jih analizirali čim prej, ko je bilo to izvedljivo, najkasneje pa v 48 urah po vzorčenju (ISO 11905-1).

### **3.3.2 Predpriprava vzorca za analizo in obvladovanje interferenc**

#### **a) Homogenizacija vzorca**

Homogenizator smo uporabili za doseg homogene porazdelitve delcev in ob morebitno prisotnih trdnejših struktur v samih vzorcih. Homogenizator s pomočjo zelo hitrega vrtenja nožkov doseže želeni učinek. Uporabili smo ga v primeru zelo nehomogenega vzorca (večinoma pri vtokih komunalnih vod, kjer je vrednost dušika nad 40 mg/l).

#### **b) Uravnavanje pH vzorca**

V primeru močno nakisanega vzorca (pH pod 2) smo pH uravnali z NaOH (3.2.7), zelo alkalnega (pH nad 12) pa s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3.2.8).

### c) Interference

Povišana vsebnost raztopljenih ali suspendiranih organskih snovi, prisotnih v vzorcu, lahko zmanjša oksidacijsko kapaciteto peroksidisulfata. Povišan KPK je pomembna interferenca (tabela 2); če so koncentracije interferenc v vzorcu (posamezno ali v kombinaciji) nižje od spodaj navedenih mejnih koncentracij, ne motijo določitve. Če so bile presežene, smo vzorec redčili z deionizirano vodo.

**Preglednica 2: Vpliv spojin na koncentracijo dušika (Working procedure, Hach).**

Snov	koncentracija interference v 0,5 ml vzorca
KPK	> 1000 mg/l
Cl <sup>-</sup>	> 2000 mg/l

### 3.3.3 Priprava standardnih raztopin za umeritveno krivuljo

Pripravili smo tri krivulje iz različnih standardnih raztopin. Prvo umeritveno krivuljo smo pripravili iz natrijevega nitrata (ki smo ga sušili 2 uri pri 105 °C) (3.2.3), drugo umeritveno krivuljo prav tako iz natrijevega nitrata (točka 3.2.4), tretjo umeritveno krivuljo smo pripravili iz kalijevega nitrata (3.2.5). Pripravili smo standardne raztopine z absolutno vsebnostjo dušika 4 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 40 mg/l in 70 mg/l. Standardne raztopine smo pripravili iz referenčnih raztopin po shemi, prikazani v preglednici 3. Pripravili smo si šest 100 ml bučk in jih ustrezno označili (slika 16). S pomočjo pipet smo iz 1000 ml bučke, kjer smo imeli pripravljeno začetno standardno raztopino, to prenesli v 100 ml bučke (slika 17). Meritve smo izvedli po točki 3.3.5, le da smo namesto vzorca uporabili standardne raztopine.



**Slika 16: Priprava bučk (vir: Katja Triller).**



Slika17: Priprava standardnih raztopin (vir: Katja Triller).

Preglednica 3: Shema priprave raztopin za umeritveno krivuljo.

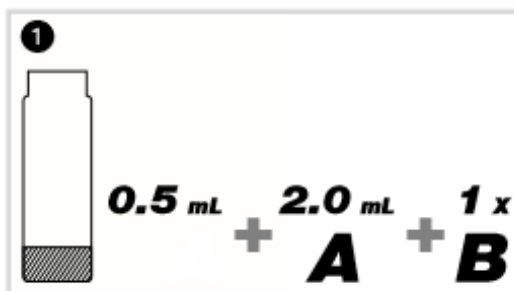
Začetna koncentracija (mg/l)	Vzet volumen (ml)	Končni volumen (ml)	Končna koncentracija (mg/l)
1000	0,4	100	4
1000	0,5	100	5
1000	1	100	10
1000	2,5	100	25
1000	4	100	40
1000	7	100	70

### 3.3.4 Priprava kontrolne delovne referenčne raztopine

Za pripravo kontrolne delovne referenčne raztopine smo uporabili amonijev klorid (3.2.6). V 500 ml bučko smo pripravili raztopino s koncentracijo  $c(N) = 20 \text{ mg/l}$ . Vzorec za kontrolo smo analizirali enako kot vzorce, in sicer po točki 3.3.5.

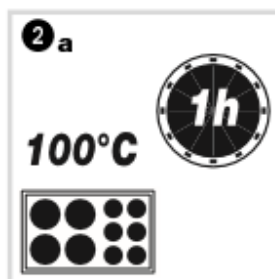
### 3.3.5 Meritev vzorcev

- a) V suho reakcijsko posodico smo z avtomatsko pipeto odpipetirali 0,5 ml predpripravljenega vzorca (določili smo ga po točki 3.3.2) in dodali 2,0 ml reagenta A ter eno tableto B. Reakcijsko posodico smo takoj zaprli.



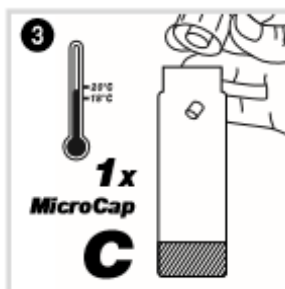
Slika 18: Dodatek reagenta v vzorec.

b) V predhodno segretem termobloku smo vzorce kuhali 60 min na 100 °C.



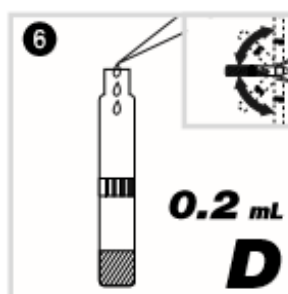
Slika 19: Segrevanje vzorcev v termobloku.

c) Reakcijske posodice smo ohladili (med 18 in 20 °C) in dodali 1 MicroCap C.



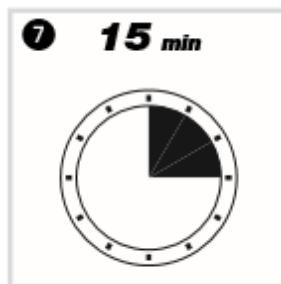
Slika 20: Dodatek MicroCap C k vzorcu.

d) V kivetni test, kjer smo imeli ohlajeno raztopino vzorca po predhodni oksidaciji, smo počasi odpipetirali 0,2 ml raztopine D. Kiveto smo takoj zaprli in nekajkrat obrnili.



Slika 21: Dodatek reagenta D.

e) Po 15 min smo merili (zunaj smo očistili kiveto).



Slika 22: Merjenje vzorca.

Merili smo proti deionizirani vodi v referenčni kiveti.

### 3.3.6 Izračun koncentracije celotnega dušika v vzorcu

Koncentracijo dušika v vodi smo izračunali z enačbo:

$$c(N) = \frac{A_{vz} - A_{SL} - A_t}{b \times V_{vz}} \quad (3.1)$$

Kjer je:

- c (N)      koncentracija N v mg/l,
- $A_{vz}$       izmerjena absorbanca za vzorec,
- $A_{SL}$       izračunana absorbanca za slepi vzorec,
- $A_t$         absorbanca obarvanega vzorca,
- b            naklon umeritvene krivulje.

## 4 REZULTATI

Najprej smo si iz standardnih raztopin pripravili tri umeritvene premice. Na podlagi premice smo določili delovno območje in linearnost. Nato je sledila določitev validacijskih parametrov.

### 4.1 UMERITVENA PREMICA

Koncentracijo celotnega dušika v raztopini neznanega vzorca smo določili posredno iz umeritvene premice. V ta namen smo uporabili premico z delovnim območjem od 4 mg/l do 70 mg/l dušika. Pripravili smo tri krivulje iz različnih standardnih raztopin po navodilih, opisanih v točki 3.3.3. Rezultati meritev so prikazani v preglednici 4.

**Preglednica 4: Rezultati meritev iz treh umeritvenih krivulj.**

Privzeta vrednost; $x_i$	$x_1$	$x_2$	$x_4$	$x_5$	$x_6$	$x_7$
mg/l	4	5	10	25	40	70
Izmerjena vrednost, $y_{in}$ (abs)	$y_{1n}$	$y_{2n}$	$y_{3n}$	$y_{4n}$	$y_{5n}$	$y_{6n}$
Umeritvena premica 1	0,0773	0,0900	0,2196	0,5245	0,8614	1,4800
Umeritvena premica 2	0,0850	0,1031	0,2112	0,5351	0,8206	1,4860
Umeritvena premica 3	0,0850	0,1108	0,2147	0,5394	0,8485	1,4717

#### 4.1.1 Iskanje ubežnikov znotraj skupine meritev

Morebitne ubežnike smo znotraj posameznih skupin meritev določili s pomočjo Dicksonovega Q-testa po enačbi 2.4 in Grubbs-Beckovega testa (enačba 2.5). Rezultati Dicksonovega Q-testa so podani v spodnji preglednici 5, rezultati Grubbs-Beckovega testa pa v preglednici 6. Povprečje meritev je izračunano iz podatkov absorbanč preglednice 4.

**Preglednica 5: Iskanje ubežnikov znotraj skupine meritev z Dicksonovim Q-testom.**

Privzeta vrednost; $x_i$	$x_1$	$x_2$	$x_4$	$x_5$	$x_6$	$x_7$
mg/l	4	5	10	25	40	70
Povprečna meritev ( $y$ )	0,0824	0,1013	0,2152	0,5330	0,8435	1,4792
Standardni odmik	0,0044	0,0105	0,0042	0,0077	0,0209	0,0072
$y - 2s$	0,0735	0,0803	0,2067	0,5177	0,8018	1,4649
$y + 2s$	0,0913	0,1223	0,2236	0,5483	0,8852	1,4936
KRITERIJ: Če meritev leži znotraj intervala $[y - 2s, y + 2s]$ ni ubežnik, v nasprotnem						



primeru je ubežnik.
---------------------

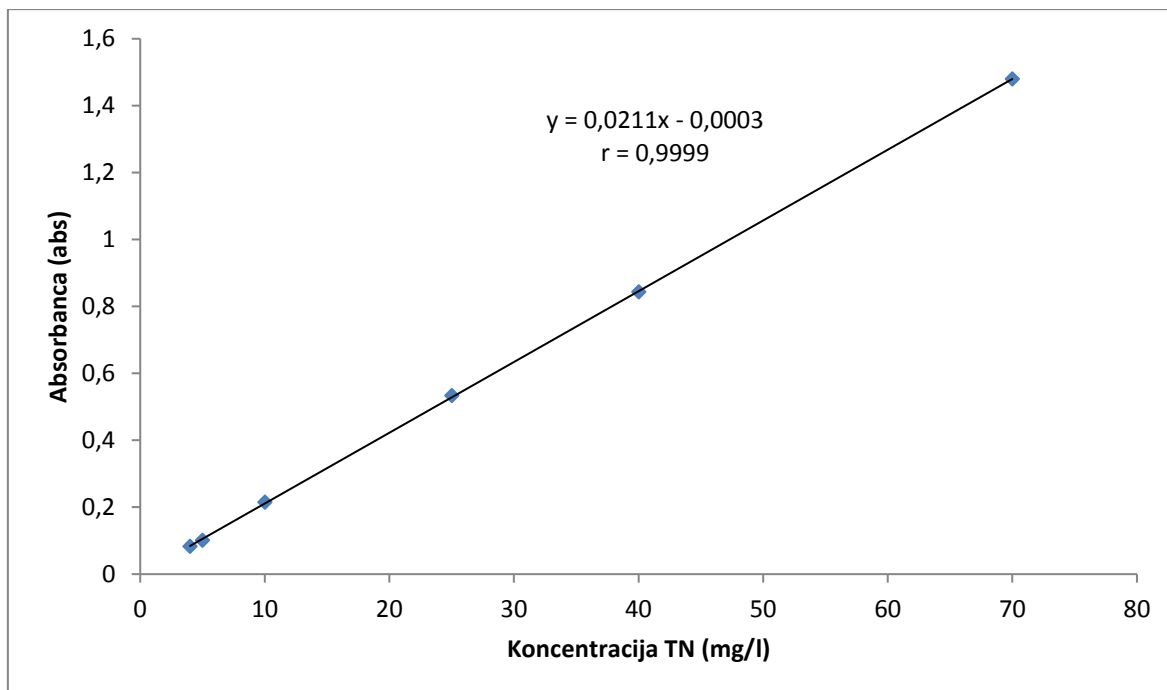
**Preglednica 6: Iskanje ubežnikov znotraj skupine meritev z Grubbs-Beckovim testom.**

Privzeta vrednost; $x_i$	$x_1$	$x_2$	$x_4$	$x_5$	$x_6$	$x_7$
mg/.	4	5	10	25	40	70
Št. paralelke	Vrednost »z« za iskanje ubežnikov z Grubbs-Beckovim testom					
(n)	Testna – izračunana:			$Z_{izr.}$		
1	1,155	1,075	1,051	1,108	0,858	0,107
2	0,577	0,171	0,940	0,274	1,098	0,942
3	0,577	0,903	0,111	0,835	0,240	1,049
	Kritična tabelarična:			$Z_{tab. (0,05; n)}$		
	1,155	1,155	1,155	1,155	1,155	1,155
KRITERIJ: Če je izračunana testna vrednost $Z_{izr.}$ manjša od tabelarne kritične vrednosti $Z_{tab. (0,05; n)}$ meritev ni ubežnik, v nasprotnem primeru je ubežnik.						

Ubežnih meritev ni bilo, zato smo pri nadaljnjih statističnih obdelavah (oz. izračunu umeritvene premice) upoštevali vse meritve.

#### 4.1.2 Izračun linearne premice 1. reda in preverjanje linearnosti

Na osnovi meritev iz preglednice 4 smo s pomočjo programske opreme z metodo najmanjših kvadratov (enačbe 2.6 do 2.8) določili parametre linearne umeritvene premice. Graf linearne premice z enačbo premice je podan na sliki 23. Validacijska dokumentacija zahteva preverjanje linearnosti za tri premice hkrati, zato je premica podana na podlagi vseh treh umeritvenih premic.



Slika 23: Graf linearne umeritvene premice 1. reda.

Linearnost smo preverili s korelacijskim koeficientom (enačba 2.9), koeficientom kvalitete (2.10) in analizo varianc (2.11). Pearsonov korelacijski koeficient nam pove, kako dobro se eksperimentalne točke prilegajo premici. Če vse točke ležijo na premici, je vrednost koeficienta 1. Čim bližje je  $r$  vrednosti 1, tem bolje se točke prilegajo modelu. S programsko opremo ANOVA smo naredili analizo varianc.  $F_{izr}$  je vrednost pri nivoju signifikantnosti 0,05. Če je  $F_{tab.} > F_{izr}$ , se rezultati ne razlikujejo pri natančnosti 0,05, sicer pa se. Linearnost je dobra, če koeficient kvalitete ne presega 3 %.

Dobljeni vrednosti analize varianc:

$$F_{izr} = 0,41$$

$$F_{tab} = 3,26$$

Koeficient kvalitete, QC = 0,6532 %

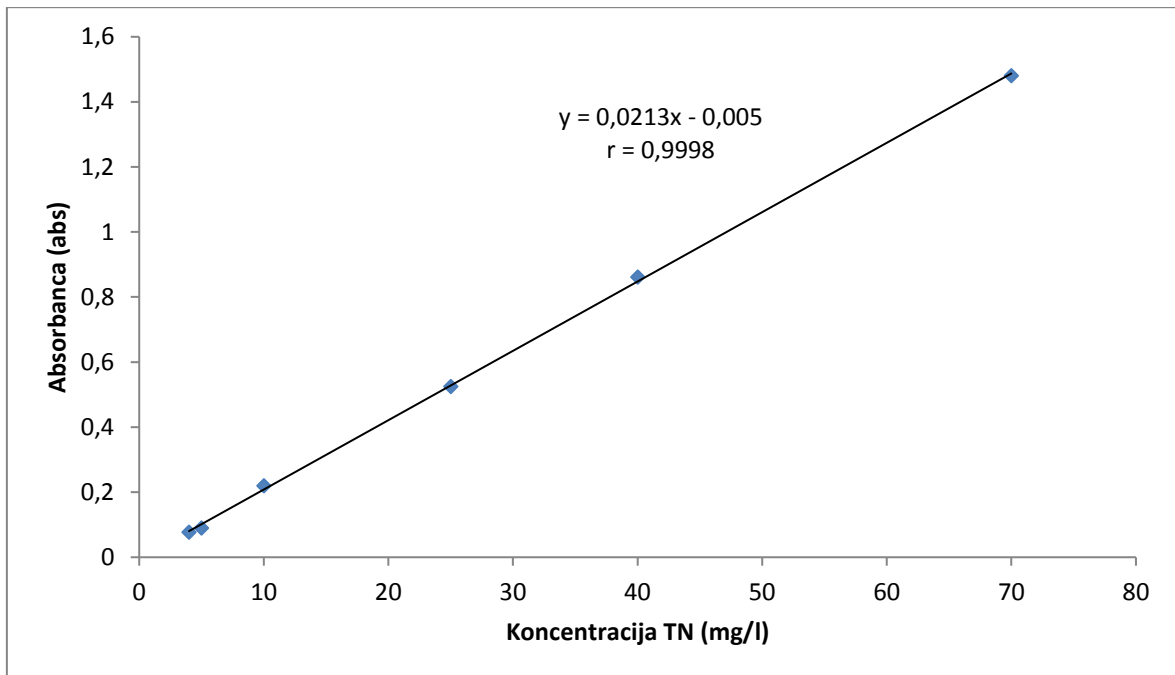
Korelacijski koeficient: 0,9999

Iz tega sledi potrditev linearnosti metode v danem merilnem območju.

#### 4.1.3 Izbira delovne umeritvene premice

Podatki premic so zbrani v preglednici 4. Vsaki umeritveni krivulji smo izračunali standardni odmik (2.10) in koeficient kvalitete (2.13). Enačba premice in korelacijski koeficient sta izpisana na sliki umeritvenih premic. Vse tri premice imajo koeficient kvalitete pod 3 %, kar potrjuje dobro linearnost. Prav tako je pri vseh korelacijski koeficient višji od 0,99. Na podlagi treh umeritvenih premic smo se morali odločiti za eno

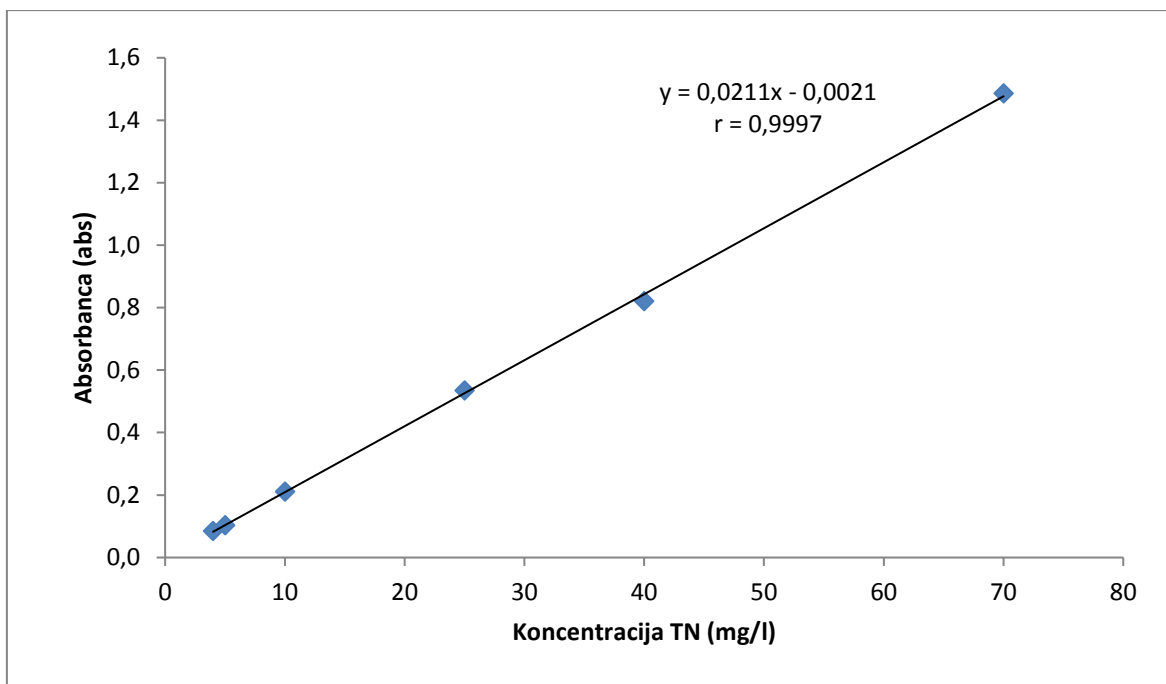
delovno premico, ki se potem uporablja za vse nadaljnje meritve. Odločili smo se za umeritveno premico 3 zaradi najnižjega koeficienta kvalitete (0,9) in korelacijskega koeficienta najbližje vrednosti 1.



Slika 24: Umeritvena premica 1.

Preglednica 7: Parametri umeritvene premice 1.

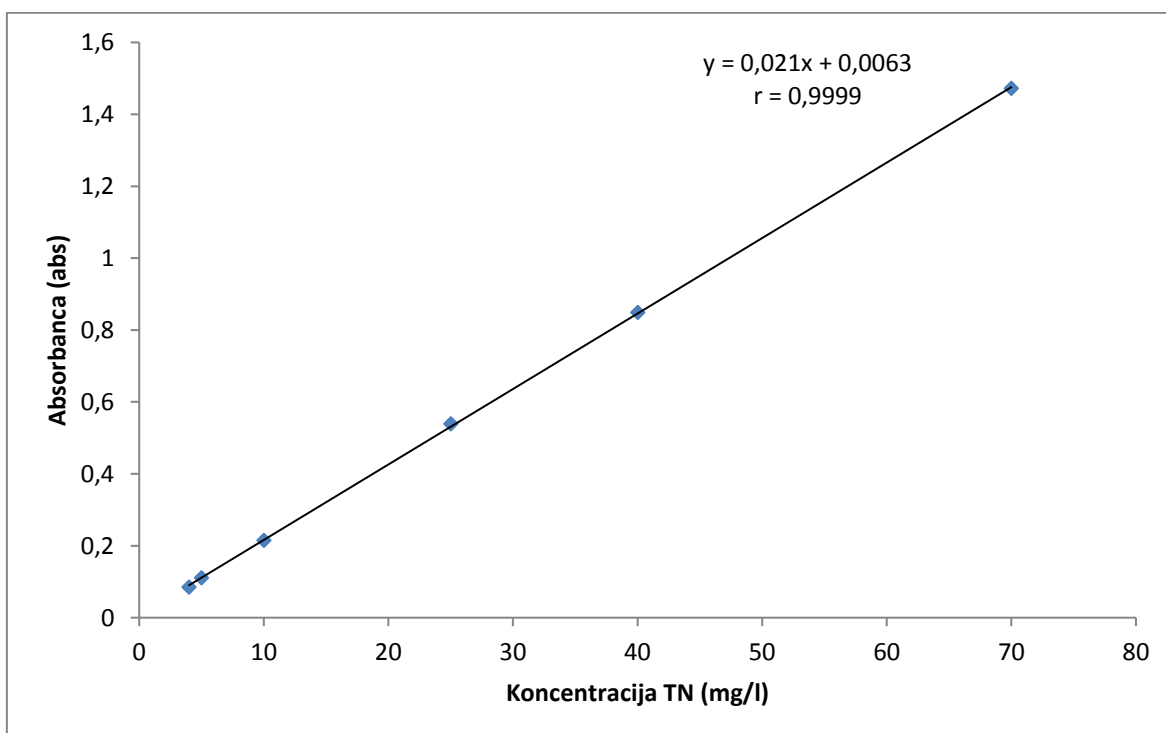
Standardna napaka	0,01146 abs
Koeficient kvalitete	2,0941 %
Odsek premice na ordinati (a)	-0,00503 abs
Naklon premice (b)	0,02132 abs/ (mg/l)
Povprečna vrednost $y_i$	0,54214 abs



Slika 25: Umeritvena premica 2.

Preglednica 8: Parametri umeritvene premice 2.

Standardna napaka	0,01299 abs
Koeficient kvalitete	2,1517 %
Odsek premice na ordinati (a)	-0,00209 abs
Naklon premice (b)	0,02113 abs/ (mg/l)
Povprečna vrednost $y_i$	0,54017 abs



Slika 26: Umeritvena premica 3.

**Preglednica 9: Parametri umeritvene premice 3.**

Standardna napaka	0,00552
Koeficient kvalitete	0,90558 %
Odsek premice na ordinati (a)	0,00623 abs
Naklon premice (b)	0,02099 abs/ (mg/l)
Povprečna vrednost $y_i$	0,54502 abs

#### 4.1.4 Preverjanje homogenosti varianc

S pomočjo F-testa smo preverili variance na najvišjem in najnižjem koncentracijskem nivoju umeritvene krivulje. Standardni odmik smo izračunali z enačbo 2.13, varianco 2.12 in F-test z 2.11. Če bi bilo potrebno, bi predhodno izločili ubežnike znotraj obeh skupin meritev. S testom primerjamo dve skupini meritev, v našem primeru najvišji in najnižji koncentracijski nivo. Iz preglednice 10 je razvidno, da lahko ovržemo trditev, da variance niso primerljive oz. homogene. Metoda je enako natančna tako na spodnji kot na zgornji točki umeritvene krivulje.

**Preglednica 10: Izračun homoscedastičnosti na osnovi odzivov.**

Odziv (abs)	4 mg/l	70 mg/l
Odziv 1	0,0986	1,526
Odziv 2	0,0912	1,498
Odziv 3	0,1016	1,482
Odziv 4	0,1023	1,453
Odziv 5	0,1016	1,464
Odziv 6	0,0844	1,485
Odziv 7	0,0868	1,489
Odziv 8	0,0747	1,497
Odziv 9	0,0752	1,477
Odziv 10	0,0677	1,478
Povprečna vrednost meritev	0,08823	1,4849
Standardni odmik (s)	0,01259974	0,019991387
Varianca ( $s^2$ )	0,000158753	0,000399656
$F_{izr.}$	2,517460689	
$F_{tab. (9; 9; 0,99)}$	5,351128861	
KRITERIJ: Če je izpolnjen pogoj $F_{tab.} < F_{izr.}$ , so variance primerljive oz. homogene, v nasprotnem primeru niso primerljive oz. homogene.		

## 4.2 DOLOČITEV VALIDACIJSKIH PARAMETROV

### 4.2.1 Določitev meje zaznavnosti (LOD) in meje določljivosti (LOQ)

S pomočjo enačb 2.14 in 2.16 ter podatkov iz umeritvene krivulje 3, podanih v preglednici 11, smo dobljene vrednosti preračunali v koncentracije. Za preračun smo upoštevali nekorigirane signale s slepo iz stolpca b. Korigiran signal pomeni, da smo izmerjenemu signalu pri dani koncentraciji odšteli vrednost slepe raztopine. Pri nekorigiranem signalu vrednost slepe raztopine ni odšteta. V našem primeru je absorbanca slepe raztopine 0,0989 (stolpec b, vrednost 0).

**Preglednica 11: Določitev LOD in LOQ.**

	a	b
$x_i$ (mg/l)	Korigiran signal $y_i$ (abs)	Nekorigiran signal $y_i$ (abs)
0	-	0,0989
4	0,0850	0,1839
5	0,1108	0,2097
10	0,2147	0,3136
25	0,5294	0,6383
40	0,8485	0,9474
70	1,4717	1,5706
Naklon premice, b		0,02103 abs/ (mg/l)
Odsek premice na ordinati, $a = y_b$		0,10346 abs
Napaka ostankov – premice, $S_B$		0,00548 abs

Meja zaznavnosti: 0,1199 abs

Koncentracija pri meji zaznavnosti: 1

Meja določljivosti: 0,1583

Koncentracija pri meji določanja: 3

LOD in LOQ smo zatem potrdili tudi na realnih vzorcih (preglednica 12 in 13). Za vsako mejo smo si izbrali po šest vzorcev in naredili dve paralelki. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali povprečje meritev, standardni odmik (enačba 2.17) in relativni standardni odmik (enačba 2.15). Meja zaznavnosti je sprejemljiva, če je sipanje rezultatov manjše kot 33,3 %. Meja določljivosti je sprejemljiva, če je sipanje manjše od 10 %.

**Preglednica 12: Vrednotenje LOD iz meritev realnih vzorcev.**

Vzorec	Meritev I. (mg/l)	Meritev II. (mg/l)	Povprečje meritev	Standardni odmik	Relativni standardni	Kriterij za LOD
--------	----------------------	-----------------------	----------------------	---------------------	-------------------------	--------------------

			(mg/l)	(mg/l)	odmik (%)	(%)
64549	0,9	0,9	0,92	0,03	3,7	33,3
64546	2,2	1,5	1,83	0,54	29,4	33,3
64550	1,1	1,1	1,10	0,05	4,7	33,3
64560	1,2	1,2	1,18	0,05	4,0	33,3
64565	1,9	2,4	2,12	0,36	16,9	33,3
64568	1,3	1,5	1,40	0,17	11,8	33,3

**Preglednica 13: Vrednotenje LOQ iz meritev realnih vzorcev.**

Vzorec	Meritev I. (mg/l)	Meritev II. (mg/l)	Povprečje meritev (mg/l)	Standardni odmik (mg/l)	Relativni standardni odmik (%)	Kriterij za LOQ (%)
64376	4,1	4,1	4,09	0,02	0,4	10
64185	3,5	3,5	3,47	0,02	0,6	10
44408	3,4	3,4	3,38	0,04	1,0	10
64407	5,5	5,4	5,46	0,07	1,3	10
64401	6,6	6,4	6,46	0,15	2,4	10
64551	3,5	3,6	3,55	0,08	2,2	10

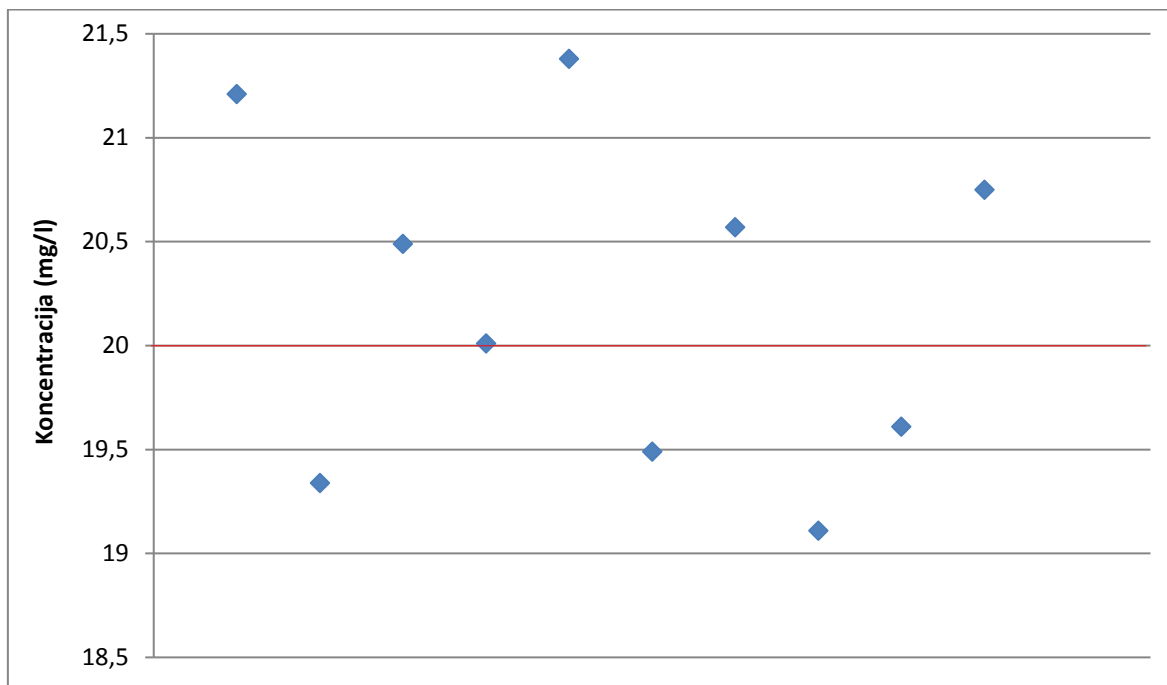
#### 4.2.2 Točnost metode

Točnost metode smo preverili s standardno referenčno raztopino. Pripravili smo jo iz amonijevega klorida (3.2.6) na podlagi raztapljanja in redčenja. Meritve referenčne raztopine smo izvedli desetkrat. Izračunali smo povprečno vrednost in standardni odmik (2.17). Rezultati statistične obdelave so podani v preglednici 14, grafično pa prikazani na sliki 28.

**Preglednica 14: Preverjanje točnosti.**

Št. paralelke (n)	Izmerjena koncentracija (mg/l)	Prava koncentracija (privzeta) (mg/l)
1	21,21	19,98
2	19,34	19,98
3	20,49	19,98
4	20,01	19,98
5	21,38	19,98
6	19,49	19,98
7	20,57	19,98
8	19,11	19,98
9	19,61	19,98

10	20,75	19,98
Povprečje, C	20,20	19,98
Standardni odmik, S	0,798	0



Slika 27: Meritve amonijevega klorida pri koncentraciji 20 mg/l.

Za oceno točnosti smo uporabili t-test (enačba 2.18), pri katerem se primerja povprečji dveh skupin, kjer sta standardna odmika obeh skupin različna. Standardna odmika sta različna zato, ker je privzeta vrednost brez standardnega odmika, izmerjene vrednosti pa imajo standardni odmik. Če velja, da je  $t_{izr.} < t_{tab.}$ , potem se standardna odmika razlikujeta za manj kot 0,05 nivoja statistične značilnosti.

t-test:

Izračunana t testna vrednost;  $t_{izr.} = 0,86$

Kritična t vrednost;  $t_{tab.}(0,05; N-1; \text{two-tailed}) = 2,26$

Iz tega sledi, da je metoda točna.

Usposobljenost določevanja celotnega dušika v laboratoriju smo preverili tudi z medlaboratorijsko primerjavo z akreditiranim laboratorijem in medlaboratorijsko primerjalno analizo Aquacheck. Pregled medlaboratorijskih preskušanj z akreditiranim laboratorijem navajamo v preglednici 15.



**Preglednica 15: Pregled medsebojnih primerjav z drugim laboratorijem.**

	Leto	Vzorec	Izmerjena koncentracija našega laboratorija (mg/l)	Izmerjena koncentracija primerjalnega laboratorija (mg/l)
1	2016	0069360	75	70
2	2016	0064406	20	24
3	2016	0064407	5,6	5,9
4	2016	0064185	4,4	5,9
5	2016	0064408	3,4	4
6	2016	0064380	30	30
7	2016	0064403	9,9	9,5
8	2016	0064402	98	100
9	2016	0064376	4,2	4,3
10	2016	0064375	51	51

t- test:

Izračunana t testna vrednost;  $t_{izr} = 0,28$

Kritična t vrednost;  $t_{tab.}(0,05; \text{two-tailed}) = 2,26$

Iz tega sledi, da je metoda točna.

Rezultati medlaboratorijske primerjalne analize Aquacheck so v preglednici 16. Kriterij za točnost metode je bil rezultat v intervalu  $|z| \leq 2$ . Z vrednost je definirana kot količnik razlike izmerjene vrednosti s pravo vrednostjo s standardnim odklonom. Iz preglednice je razvidno, da je z vrednost v intervalu  $|z| \leq 2$ , zato lahko trdimo da je metoda za določanje celotnega dušika točna.

**Preglednica 16: Medlaboratorijska primerjalna analiza Aquacheck.**

Vzorec	Izmerjena koncentracija našega laboratorija (mg/l)	Referenčna vrednost (mg/l)	Z vrednost
0879	25,1	24,8	0,12

#### 4.2.3 Natančnost metode

Natančnost metode smo preverili s študijo ponovljivosti, ki se je izvajala istega dne, in študijo ponovljivosti, ki se je izvajala v različnih dneh (obnovljivost).

Študijo ponovljivosti smo naredili na osnovi meritev različnih vzorcev (različni matriks, različna vsebnost celotnega dušika). Daje nam rezultate slučajnih (naključnih) napak. Za vsak vzorec smo naredili šest neodvisnih meritev (označeni z I. do VI.). Na osnovi dobljenih rezultatov analiz smo izračunali povprečne vrednosti ter standardne (2.17) in

relativne standardne odmike (2.15). Vrednosti meritev in izračunane vrednosti so podane v preglednici 17.

**Preglednica 17: Natančnost – ponovljivost**

vzorec	Izmerjena vrednost (mg/l)						Povprečje meritev	Standardni odmik	RSD (%)
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.			
64376	4,7	4,0	3,9	4,1	4,1	4,3	4,18	0,27	6,5
64185	3,4	3,6	3,6	3,4	3,5	3,5	3,50	0,09	2,6
64375	53	48	52	51	50	51	50,9	1,51	3,0
64406	20	20	20	20	20	20	20,0	0,16	0,8
64403	11	10	10	11	10	10	10,2	0,42	4,1
64381	340	340	340	340	338	356	343,4	6,75	2,0
Kriterij: RSD < 10 %									

Študijo obnovljivosti metode znotraj laboratorija smo naredili na osnovi rezultatov meritev realnih vzorcev, ki smo jih spremljali skozi daljše časovno obdobje (daljše časovno obdobje, različni dnevi, različni vzorci). Rezultati so prikazani v preglednici 18. Relativni standardni odmik smo izračunali iz deljenja absolutne vrednosti razlike paralelk in povprečne vrednosti ter množili s 100.

$$r \% = \frac{|d|}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

Kjer je:

$d$  = razlika med paralelkami,

$\bar{x}$  = povprečna vrednost paralelk.

**Preglednica 18: Obnovljivost metode.**

datum	Vzorec	Izmerjena vrednost (mg/l)		Povprečje (mg/l)	Razlika paralelk (mg/l)	r (%)
		I.	II.			
7. 6. 2016	64375	50	51	50,78	-0,90	1,8
9. 6. 2016	64376	4,1	4,0	4,04	0,12	2,9
9. 6. 2016	64406	20	20	19,95	-0,35	1,7
13. 6. 2016	64185	3,6	3,5	3,55	0,18	5,1
17. 6. 2016	64403	10	10	9,93	0,25	2,5
17. 6. 2016	44408	3,4	3,4	3,39	0,04	1,3
17. 6. 2016	64407	5,5	5,4	5,46	0,10	1,9
17. 6. 2016	64380	28	28	28,03	0,00	0,0
17. 6. 2016	64400	16	16	16,04	-0,06	0,4

17. 6. 2016	64401	6,6	6,4	6,46	0,22	3,3
22. 6. 2016	64552	56	56	56,10	-0,53	1,0
22. 6. 2016	64558	66	67	66,61	-0,60	0,9
22. 6. 2016	64547	24	24	24,02	0,36	1,5
22. 6. 2016	64566	63	64	63,60	-0,91	1,4
23. 6. 2016	64400	16	16	16,08	-0,33	2,0
23. 6. 2016	64401	6,7	6,9	6,80	-0,25	3,7
23. 6. 2016	64551	3,5	3,6	3,55	-0,11	3,0
29. 6. 2016	64381	340	347	343,21	-7,02	2,0
Relativni standardni odmik vseh meritev.						1,8

## 5 DISKUSIJA

### 5.1 UMERITVENA PREMICA

Izvedli smo meritve treh neodvisnih umeritvenih premic na šestih koncentracijskih območjih. Za ugotavljanje ubežnikov in parov ubežnikov standardnih raztopin smo uporabili Grubbsov in Beckov test. Test je pokazal, da ubežnih meritev ni, zato smo pri nadaljnjih statističnih obdelavah upoštevali vse meritve.

Za izračun razpršenosti med najvišjim in najnižjim koncentracijskim nivojem smo uporabili  $F$ -test. Izračunali smo količnik obeh varianc ter ga primerjali s tabelarično vrednostjo. Izračuni iz preglednice 10 kažejo, da je  $F_{meritev} < F_{tabel.}$ . To pomeni, da meritve nimajo različnih varianc in zadostujejo pogoj homocedastičnosti.

Linearnost metode smo preverjali s korelacijskim koeficientom, koeficientom kvalitete in analizo varianc. Podatki vseh treh premic so razvidni v preglednicah 7, 8 in 9. Korelacijski koeficienti so pri vseh treh premicah višji od 0,99, kar nakazuje na zelo dobro linearno korelacijo in linearnost metode v koncentracijskem območju med 4 mg/l in 70 mg/l. Kriterij koeficienta kvalitete določa dobro linearnost pod 3 % in dopustno vrednost do 5 %. Naši izračuni kažejo na zelo dobro linearnost, saj so koeficienti kvalitete pod 3 %. Analizo varianc smo napravili iz podatkov vseh treh premic in jih združili. Rezultati kažejo na  $F_{izr.} < F_{tabe.}$ , torej se meritve ujemajo z modelom – model je ustrezen in linearnost metode je potrjena v celotnem delovnem območju, ki se giblje med vrednostmi 4 mg/l in 70 mg/l. Prav tako je skupni koeficient kvalitete manjši od 3 % in korelacijski koeficient večji od 0,99.

Dimitrova in sodelavci (2013) so primerjali kivetne teste s standardnimi metodami za amonij, nitrat, celotni fosfat in kemično potrebo po kisiku. S standardno metodo in metodo s kivetnimi testi so dosegli linearno korelacijo ( $r > 0,99$ ). Tudi naša metoda za določanje celotnega dušika kaže na dobro linearnost, kar potrjuje zelo dober korelacijski koeficient ( $r > 0,999$ ) in dober koeficient kvalitete (manjši od 3 %).

### 5.2 DOLOČITEV VALIDACIJSKIH PARAMETROV

#### 5.2.1 Določitev meje zaznavnosti in meje določljivosti

Mejo določljivosti in mejo zaznavnosti smo izračunali na podlagi enačb 2.14, 2.15, 2.16, 2.17 in iz umeritvene premice ter jo potrdili z merjenjem vzorcev. Izračunana vrednost

LOD znaša 1 mg dušika na liter. Meji smo potrdili tudi z realnimi vzorci, z metodo preverjanja natančnosti testnih vzorcev s koncentracijami, ki so bile blizu LOD in LOQ, in zanje izračunali relativne standardne odmike, ki smo jih uporabili za preverjanje privzetih mej. Kot kriterij za preverjanje privzete meje LOD smo uporabili relativni standardni odmik pod 33,3 %, za preverjanje privzete meje LOQ pa relativni standardni odmik pod 10 %. Iz statistične obdelave v preglednicah 12 in 13 je razvidno, da vzorci zadostijo kriteriju in sta LOD in LOQ potrjena. LOQ je tako enak prvi točki iz umeritvene premice, tj. 4 mg/l.

Metoda je primerna za rutinsko uporabo, ker zagotavlja določanje najnižje določene koncentracije, to je 5 mg/l, ki jo je po zakonu še potrebno določiti (Uradni list RS, št 94/2014, 98/2015).

### 5.2.2 Točnost metode

Točnost metode smo določili z amonijevim kloridom s koncentracijo 19,98 mg dušika na liter. Izvedli smo deset neodvisnih meritev in jih primerjali s pravo vrednostjo.

S *t*-testom smo primerjali pravo koncentracijo dušika s povprečjem skupine meritev. Izmerjena vrednost (0,86) je manjša od tabelarične (2,26). Owen sliki 13 navaja kot primer dobre točnosti, kjer so rezultati enakomerno porazdeljeni okrog prave vrednosti. Vidimo, da naši rezultati na sliki 22 sipajo na enak način kot na sliki 13.

Točnost metode smo preverili tudi v medlaboratorijskih primerjavah. Izračunana *t* vrednost (0,28) je manjša od tabelarične vrednosti (2,26). Tudi z vrednost Aquacheck primerjave je bila veliko nižja (0,12) od kriterija (2,0).

Kriterij za točnost metode je izpolnjen, zato lahko na podlagi naših rezultatov z gotovostjo sklepamo, da je metoda točna.

### 5.2.3 Natančnost metode

Natančnost metode smo preverjali s študijo ponovljivosti v enem dnevu in s študijo ponovljivosti v različnih dneh.

Za študijo ponovljivosti smo izvedli šest meritev istega vzorca in izračunali relativni standardni odmik. Izbrali smo si več vzorcev z različno koncentracijo dušika, da smo testirali ponovljivost znotraj testiranega koncentracijskega območja. Iz preglednice 16 je razvidno, da je velikostni red standardnih in relativnih standardnih odmikov pri različnih koncentracijah analita primerljiv. Prav tako so primerljivi tudi standardni in relativni standardni odmiki znotraj istega vzorca. Vzorec 64381 smo predhodno desetkrat redčili z namenom testiranja vpliva redčenja. Relativni standardni odmik je zelo nizek (2 %), zato

lahko zaključimo, da redčenje vzorcev, kot je bilo izvedeno v naši raziskavi, ne vpliva na ponovljivost rezultatov. Skupni standardni odmik ( $RSD_{pool}$ ) znaša 3,6 % in je veliko nižji od postavljenega, ki znaša 10 %. Na osnovi izračunov lahko zaključimo, da je metoda ponovljiva.

Študijo obnovljivosti smo izvedli z meritvami vzorcev v paralelkah v različnih dneh in na različnem koncentracijskem območju. Na osnovi izvedene študije je razvidno, da je obnovljivost, ko opazujemo vzorce, ki imajo različne koncentracije znotraj testiranega koncentracijskega območja analita, enaka (linearna). Velikostni red standardnih in relativnih standardnih odklikov pri različnih koncentracijah analita je primerljiv. Prav tako so primerljivi tudi standardni in relativni standardni odkliki znotraj različnih matriksov. Skupni standardni odmik ( $RSD_{pool}$ ) znaša 1,8 % in je veliko nižji od postavljenega, ki znaša 10 %. Iz tega lahko zaključimo, da je metoda obnovljiva.

Inštitut Kiwa je izvedel primerjalne teste kivetne metode med več kot 300 laboratoriji. Za celoten dušik je bilo več kot 95 % podanih rezultatov znotraj območja zaupanja. Rezultati naših meritev in rezultati inštituta potrjujejo, da je metoda natančna.

## 6 ZAKLJUČKI

Umerjanje oz. kalibracija je med najbolj pomembnimi postopki v analizi kemiji. Pogoj za doseg dobre točnosti in natančnosti metode je dobra kalibracija. Meja določljivosti celotnega dušika je hkrati spodnja točka umeritvene krivulje, in sicer 4 mg N/l. Izračunano spodnjo mejo smo potrdili z realnimi vzorci, kjer je največji relativni standardni odmik 2,5 % in najnižji 0,4 % (kriterij 10 %). Mejo zaznavnosti smo določili računsko in eksperimentalno ter znaša 1 mg N/l.

S študijami obnovljivosti in ponovljivosti smo dokazali natančnost metode. Skupni relativni standardni odmik obeh študij je veliko nižji od meje. Merili smo realne vzorce tako komunalne kot tudi industrijske odpadne vode. Nobeden od preiskovanih vzorcev ni odstopal od dopustne meje.

Točnost metode smo preverili s standardno referenčno raztopino znane koncentracije dušika. Princip metode je, da se oksidirajo vse oblike dušika v nitrat, ki ga potem ob dodatku barvnega reagenta določimo. Z desetkratnim merjenjem amonijevega klorida smo dokazali dobro točnost meritev. To dokazuje tudi popolno oksidacijo amonijevega klorida. Točnost smo potrdili tudi z medlaboratorijsko primerjavo.

Na podlagi validacije umeritvenega postopka in validacijskih parametrov, ki smo jih ovrednotili med postopkom validacijske študije, smo ugotovili, da metoda zadosti predpisanim kriterijem in je primerna za predvideno uporabo.

Hipotezo 1 smo potrdili z določitvijo meje določljivosti in zaznavnosti. Meji zadovoljujeta pogojem kriterijev, zato lahko zaključimo, da je metoda dovolj občutljiva za določanje celotnega dušika v odpadnih vodah.

Proizvajalec Hach navaja enostavnost, hitrost in primernost metode. To smo tudi preverili v praksi. Že na embalaži so jasna navodila postopka, ni potrebna priprava reagentov, celotna analiza je hitra ter dosegamo dobro natančnost in točnost rezultatov. Zato lahko potrdimo hipotezo 2 in zaključimo, da je validirana metoda s stališča izvedbe enostavna, hitra in primerna za rutinsko uporabo.

## 7 LITERATURA IN VIRI

Atkins, P. W., Clugston, M. J., Fraazer, M. J., Jones, R. A. Y. (1997): Kemija –zakonitosti in uporaba. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije.

Bitton, G. (2005): Wastewater Microbiology, Third Edition. John Wiley & Sons. New Jersey.

Božič, S. J. (1998): Vaje iz instrumentalne analize. Založba Izolit, Trzin.

Brereton, R. G. (2007): Applied chemometrics for scientists. Anglija, *John Wiley & Sons*.

Brodnjak-Vončina, D. (2006): Analizna kemija II. Zbrano gradivo. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Cramer, D. 1998. Fundamental Statistics for Social Research. Step-by-step calculations and computer techniques using SPSS for Windows. London and New York: Routledge.

De Borba, B., Jack, F. R., Rohrer, J. (2014): Determination of Total Nitrogen and Phosphorus in Wastewaters by Alkaline Persulfate Digestion Followed by IC. Thermo Fisher Scientific, USA.

Dimitrova et al. (2013): Comparison of spectrophotometric methods using cuvette tests and national standard methods for analysis of wastewater samples. Academic Journals, 5(8). Sofija, Bulgarija 482 – 488.

Direktiva Sveta 91/271/EGS o čiščenju komunalne odpadne vode.

Environmental Technology (2009): Environmental laboratory. Cuvette Tests Gain German Sustainability Award 2009. [http://www.envirotech-online.com/news/environmental-analysis/7/hach\\_lange/cuvette\\_tests\\_gain\\_%20german\\_sustainability\\_award\\_2009/8562/](http://www.envirotech-online.com/news/environmental-analysis/7/hach_lange/cuvette_tests_gain_%20german_sustainability_award_2009/8562/) (10. 5. 2016).

Falkenberg, K. (2010): Odvajanje odpadnih voda in varstvo okolja. Evropska komisija za okolje.

Ferree, M. A., Shannon, R. D. (2001): Evaluation of a second derivate UV/visible spectroscopy technique for nitrate and total nitrogen analysis of wastewater samples. Wat. Res. 35(1): 327 – 332.

Follett, R. F., Hatfield, J. L.(2001): Nitrogen in environment: Sources, Problems and Management; Elsevier Science B. V., Amsterdam.

Geisler, J. (2015): Choosing the Best Detection Method: Absorbance vs. Fluorescence. Eppendorf, North America. <http://www.biocompare.com/Bench-Tips/173963-Choosing-the-Best-Detection-Method-Absorbance-vs-Fluorescence/> (25. 7. 2016).



Gerardi, M. H. (2002): *Nitrification and denitrification in the Activated Sludge Process*. New York, John Wiley & Sons, Inc.

Hudnik, V., Pečanac, M. (2011): *Validacija analiznih metod*. Ljubljana, Most do znanja, družba za izobraževanje d. o. o.

ISO 11905-1 (1997): *Water quality – Determination of nitrogen. Method using oxidative digestion with peroxodisulfate*.

Kasher, R. (2009): *Membrane-based water treatment technologies: Recent achievements, and new challenges for a chemist*. *Bulletin Israel Chemical Society* 24: 10–18.

Kivetni testi LCK: profesionalna rešitev za doseganje skladnosti. HACH, 2016.

König, 2009: *Validation of cuvette test for drinking water analysis*.

Kurbus, T. (2008): *Razvoj visoko učinkovitega postopka čiščenja odpadnih vod v šaržnem biološkem reaktorju*. Doktorska disertacija, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana.

Magnusson, B., Örnemark, U. (eds.) (2014): *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0.

Metcalf in Eddy (2004): *Wastewater engineering : treatment and reuse*. New York; London: McGraw-Hill.

Osmo poročilo o stanju izvajanja in programih izvajanja (kot zahteva člen 17I Direktive Sveta 91/271/EGS o čiščenju komunalne odpadne vode). Bruselj, 2016.

Owen, T. (2000): *Fundamentals of modern UV-visible Spectroscopy*. Germany, Copyright Agilent Technologies.

PerkinElmer (2000): *Lambda, 25, 35, 45 User s Guide*.

Pravilnik o prvih meritvah in obratovalnem monitoringu odpadnih voda, Uradni list RS, št. 94/2014, 98/2015.

Pütz, P. (2008): *Mednarodni primerjalni testi potrdili visoko kakovost analiz*. Poročilo iz prakse. <http://si.hach.com/quick.search-quick.search.jsa?keywords=Mednarodni+primerjalni+testi> (11. 5. 2016).

Roš, M., Zupančič, D. G (2010): *Čiščenje odpadnih voda*. Visoka šola za varovanje okolja. Velenje.

Skoog, A. D., West, M. D., Holler, J. F., Crouch, R. S. (2004): *Molecular Absorption Spectrometry*. In: *Fundamentals of Analytical Chemistry 8-th ed*. Belmont: Brooks/Cole, str. 789–790.

Uredba o emisiji snovi in toplote pri odvajanju odpadnih voda v vode in javno kanalizacijo, Uradni list RS št. 47/2005, 64/2012, 64/2014 in 98/2015.

Uredba o odvajanju in čiščenju komunalne odpadne vode, Uradni list RS št. 98/2015.

Uredba o okoljski dajatvi za onesnaževanje okolja zaradi odvajanja odpadnih voda Uradni list RS, št. 80/2012.

Working procedure: LCK238 Total Nitrogen, TNb HACH.

Zakon o ohranjanju narave (Uradni list RS, št. 31/2000).

Zakon o varstvu okolja (Uradni list RS, št. 32/93, 41/2004, 20/2006, 39/2006, 70/2008, 108/2009, 48/2012, 57/2012 in 92/2013).

Zakon o vodah (Uradno list RS, št. 67/2002).