ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΣ ΓΕΩΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ "ΓΕΩΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΓΕΩΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ"
Ειδίκευση: ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ - ΟΡΥΚΤΟΙ ΠΟΡΟΙ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Επικύρωση-Επαλήθευση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού νιτρικών ιόντων σε υπόγεια νερά και εδάφη

ΟΛΓΑ ΧΑΛΚΙΑΔΑΚΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ
ΑΜ 21431

Επιβλέπουσα:
Αριάδνη Αργυράκη
Αναπλ. Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ
2018

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Επικύρωση-Επαλήθευση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού νιτρικών ιόντων σε υπόγεια νερά και εδάφη

ΟΛΓΑ ΧΑΛΚΙΑΔΑΚΗ

ΑΜ 21431

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΡΙΑΔΝΗ ΑΡΓΥΡΑΚΗ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, ΕΚΠΑ

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΔΑΣΕΝΑΚΗΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΕΚΠΑ

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΤΟΥΡΑΪΤΗ
ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ
09/11/2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μέσα από την παρούσα εργασία και τη διαδικασία επικύρωσης/επαλήθευσης της νέας εναλλακτικής μεθόδου προσδιορισμού νιτρικών θα αποδειχτεί ότι α) μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία με το διαθέσιμο εξοπλισμό του Εργαστηρίου Χημείας Περιβάλλοντος και β) ότι η εφαρμογή της όχι μόνο σε δείγματα υπόγειων νερών αλλά και σε εκχυλίσματα εδαφών δίνει τα επιθυμητά και αξιόπιστα αποτελέσματα ως προς την αναλυτική επίδοση (καλή επαναληψιμότητα και ορθότητα).

Στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι:

1. η επαλήθευση/επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού των νιτρικών ιόντων σε υπόγεια νερά ώστε να καταλήξουμε στα στοιχεία αναλυτικής επίδοσης μεθόδων (ορθότητα και επαναληψιμότητα) με υλικά αναφοράς αλλά και πραγματικά δείγματα.

2. η επαλήθευση/επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού των νιτρικών ιόντων σε εκχυλίσματα εδαφών ώστε να καταλήξουμε στα στοιχεία αναλυτικής επίδοσης μεθόδων (ορθότητα και επαναληψιμότητα) με υλικά αναφοράς αλλά και πραγματικά δείγματα.

3. Η σύγκριση των τιμών που προκύπτουν από δείγματα υπόγειων νερών και εκχυλίσματα εδαφών που θα αναλυθούν τόσο με την εναλλακτική μέθοδο όσο και με την μέθοδο αναγωγής με στήλη καδμίου ώστε να αποδειχτεί η καταλληλότητα της πρώτης μεθόδου, καθώς τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων αναμένεται να είναι παρόμοια μεταξύ τους, αλλά ο χρόνος ανάλυσης και η αξιοπιστία της εναλλακτικής μεθόδου είναι καλύτερα.

Με τα παραπάνω θα διασφαλιστεί ότι οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν παράγουν αξιόπιστα και επαναλήψιμα αποτελέσματα, ώστε να μπορεί να γίνει απρόσκοπτη χρήση τους για τον έλεγχο υπόγειων νερών και εδαφών, σύμφωνα πάντα με τις διατάξεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

ABSTRACT

This thesis took place at the Laboratory of Environmental Chemistry of the Department of Chemistry of the National and Kapodistrian University of Athens.

Through this work and the validation / verification process of the new alternative nitrate determination method it will be demonstrated that (a) it can be successfully applied with the available equipment of the Environmental Chemistry Laboratory and (b) that its application not only to samples of groundwater but also in soil extracts gives the desired and reliable results in terms of analytical performance (good repeatability and trueness).

The objectives of this Master thesis are:

1. verification / validation of the method for the determination of nitrate in groundwater samples to determine the analytical performance data (trueness and repeatability) with reference materials and real samples.

2. verification / validation of the method for the determination of nitrate ion in soil extracts so as to determine the analytical performance data (trueness and repeatability) with reference materials and real samples.

3. Comparison of the nitrate values determined from groundwater sample as well as from soil extracts to be analyzed by both the alternative method and the cadmium column reduction method to prove the suitability of the first method as the results of the two methods are expected to be similar to each other, but the analysis time and the reliability of the alternative method are better.

This will ensure that the methods developed will produce reliable and repeatable results so that they can be used seamlessly to control nitrate levels in groundwater and soils, in accordance with EU regulations.

Στον Άγγελο της ζωής μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου, Δρ Αριάδνη Αργυράκη. Η συμβολή της στην ολοκλήρωση της εργασίας, αλλά και των μαθημάτων του ΠΜΣ, ήταν ουσιαστική και η βοήθειά της πολύτιμη και διαφωτιστική.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή μου, Δρ Εμμανουήλ Δασενάκη τόσο για την συμβολή του στην ολοκλήρωση της εργασίας, όσο και για την άψογη συνεργασία μας τα 10 τελευταία χρόνια.

Ευχαριστώ επίσης την Καθηγήτριά μου, Δρ Χριστίνα Στουραΐτη για το χρόνο που αφιέρωσε για να μελετήσει τη διπλωματική μου εργασία και να κάνει εύστοχες διορθώσεις-παρατηρήσεις.

Υπεύθυνη για την οργάνωση και τον συντονισμό της πειραματικής εργασίας ήταν το μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Χημείας Περιβάλλοντος, Δρ Βασιλική Παρασκευοπούλου. Την ευχαριστώ πολύ για την άψογη συνεργασία μας τόσα χρόνια, για την καθοδήγηση και εμψύχωση και φυσικά για την υπομονή της ως επαγγελματίας και ως φίλη. Η εμπειρία μαζί της στο εργαστήριο ήταν και θα είναι για εμένα καθοριστική.

Το «*ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ*» σε κάποιους ανθρώπους μοιάζει μερικές φορές τόσα λίγο μπροστά στο τι σου έχουν προσφέρει. Για μένα αυτός ο άνθρωπος είναι ο άντρας μου, *Γιώργος*.

Σ'ευχαριστώ λοιπόν για την ειλικρινή στήριξή σου τόόόόσα χρόνια, την υπομονή σου, την πίστη σου σε μένα. Πάνω από όλα όμως σε ευχαριστώ για αυτό το υπέροχο πλάσμα που φέραμε στη ζωή, τον *Άγγελό* μας. Τίποτα από όλα όσα έχω καταφέρει δεν θα μπορούσα να τα πραγματοποιήσω χωρίς εσένα δίπλα μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 11
1.1 Σημασία προσδιορισμού συγκέντρωσης νιτρικών στην περιβαλλοντική γεωχημεία 11
1.2. Σκοπιμότητα και στόχοι της έρευνας 12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΑΖΩΤΟ ΣΤΟ ΧΕΡΣΑΙΟ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ 14
2.1 Τα Θρεπτικά Συστατικά 14
2.2 Ο κύκλος του αζώτου 14
2.2.2 Ατμοσφαιρική και βιολογική αζωτοδέσμευση και αναγωγή αζώτου προς αμμωνία 15
2.2.3 Η αποικοδόμηση οργανικών αζωτούχων ενώσεων - η αναγέννηση των νιτρικών (Νιτροποίηση) 15
2.2.4 Η αφομοίωση του αζώτου των ανόργανων αζωτούχων ενώσεων προς αμινοξέα και πρωτεΐνες, η οικοδόμηση των αζωτούχων ενώσεων 16
2.2.5 Η απονιτροποίηση 17
2.3 Ανθρωπογενείς προσθήκες αζωτούχων ενώσεων στο περιβάλλον 17
2.3.1 Στην ατμόσφαιρα 18
2.3.2 Αγροτικές δραστηριότητες 19
2.3.3 Αστικά λύματα 20
2.2.4 Άλλες ανθρωπογενείς προσθήκες 20
2.2.5 Οι κύριες επιπτώσεις των αζωτούχων ενώσεων στην ανθρώπινη υγεία 21
2.4 Νομοθετικό πλαίσιο 21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ 25
3.1 Επικύρωση και Επαλήθευση Μεθόδου 25
3.2 Χαρακτηριστικά Ποιότητας Αναλυτικών μεθόδων 25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ 36
4.1 Μέθοδος ηλεκτροδίων 36
4.2 Ιοντική χρωματογραφία 37
4.3 Μέθοδος Υπεριώδους Φασματοφωτομετρίας απευθείας 37
4.4 Φασματοφωτομετρική μέθοδος με σχηματισμό συμπλόκου - Συμβατική μέθοδος με αναγωγή νιτρικών με στήλη καδμίου (Cd) 38
4.4.1 Πορεία προσδιορισμού με στήλη Cd 40
4.4.2 Προβλήματα με τη μεθοδολογία της στήλης Cd 40
4.5 Εναλλακτική μέθοδος αναγωγής νιτρικών με VCl_3 41
4.5.1 Αρχή μεθόδου 41

4.5.2 Προσδιορισμός νιτρικών ιόντων σε εδαφικά δείγματα 41
4.5.3 Εκχύλιση NO_3-N από εδαφικά δείγματα..... 42
4.5.4 Μέτρηση νιτρικών ιόντων στα εδαφικά εκχυλίσματα..... 43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ..... 45
5.1 Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια 45
Πρότυπα διαλύματα..... 45
5.2 Διαδικασία αναγωγής και μέτρησης νιτρικών ιόντων σε πρότυπα δείγματα και δείγματα υπόγειων νερών..... 47
5.3 Ανάπτυξη μεθόδου και βελτιστοποίηση συνθηκών 48
5.4 Καμπύλες αναφοράς NO_2 με θέρμανση και με παραμονή χωρίς θέρμανση..... 49
5.5 Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου προσδιορισμού νιτρικών ιόντων σε υδατικά δείγματα..... 49
5.6 Ισοδυναμία μεθόδων αναγωγής νιτρικών ιόντων με στήλη Cd και VCl_3..... 50
5.7 Ορθότητα (για υδατικά δείγματα)..... 50
5.8 Επαναληψιμότητα (για υδατικά δείγματα)..... 50
5.9 Αναπαραγωγιμότητα (για υδατικά δείγματα) 50
5.10 Υπολογισμοί ισοζυγίων αβεβαιότητας (για υδατικά δείγματα) 51
5.11 Αξιολόγηση στοιχείων επαναληψιμότητας – αναπαραγωγιμότητας – ορθότητας και αβεβαιότητας (για υδατικά δείγματα)..... 51
5. 12 Εδαφικά δείγματα 51
5.13 Διαδικασία αναγωγής και μέτρησης νιτρικών ιόντων σε εκχυλίσματα εδαφικών δειγμάτων 52
5.14 Καμπύλες αναφοράς σε απιονισμένο νερό και σε χλωριούχο κάλιο (KCl) για την εφαρμογή της μεθόδου σε εδάφη..... 53
5.15 Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου προσδιορισμού νιτρικών ιόντων σε εδαφικά εκχυλίσματα 53
5.16 Διερεύνηση χρόνου εκχύλισης..... 53
5.17 Σύγκριση αποτελεσμάτων με εκχύλιση σε νωπό και ξηρό δείγμα 53
5.18 Σύγκριση αποτελεσμάτων με εκχύλιση σε εδάφη κοσκινισμένα από διαφορετικά μεγέθη οπής (<100μm και < 2mm)..... 54
5.19 Αναπαραγωγιμότητα σε εδαφικά εκχυλίσματα 54
5.20 Ορθότητα σε εδαφικά εκχυλίσματα..... 54
5.21 Σύγκριση αναπαραγωγιμότητας και ορθότητας με μέτρηση εκχυλισμάτων με τη μέθοδο νιτρικών με στήλη Cd..... 54
5.22 Πειράματα Ομοιογένειας..... 55

5.23 Υπολογισμοί ισοζυγίων αβεβαιότητας (για εδαφικά δείγματα)..... 55
54.24 Στοιχεία για τα πραγματικά δείγματα εδαφών..... 55
5.25 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων..... 58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 61
Α. Ανάπτυξη μεθόδου..... 61
6.1 Ανάπτυξη μεθόδου και βελτιστοποίηση συνθηκών 61
Β. Πειράματα σε γλυκό νερό..... 67
6.2 Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης..... 67
6.3 Περιγραφή υδατικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα επαλήθευσης..... 68
6.4 Κλίσεις και τομές σε καμπύλες αναφοράς νιτρικών..... 70
6.5 Ισοδυναμία μεθόδων προσδιορισμού νιτρικών με στήλη Cd και VCl_3..... 72
6.6 Ορθότητα..... 72
6.7 Επαναληψιμότητα..... 73
6.8 Αναπαραγωγιμότητα..... 75
6.9 Υπολογισμοί ισοζυγίων αβεβαιότητας..... 76
6.9.1 Ισοζύγια αβεβαιότητας για τα δείγματα BURTAP-RAINWATER- ΠΗΓΗ-TAP1-TAP2..... 76
6.9.2 Ισοζύγια αβεβαιότητας για τα δείγματα Δ1 και Δ2..... 79
6.10 Αξιολόγηση στοιχείων επαναληψιμότητας – αναπαραγωγιμότητας – ορθότητας και αβεβαιότητας..... 83
Γ. Πειράματα σε εκχυλίσματα εδαφών..... 84
6.11 Περιγραφή δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα επαλήθευσης . 84
6.12 Καμπύλες αναφοράς σε απιονισμένο νερό και σε χλωριούχο κάλιο (KCl) για την εφαρμογή της μεθόδου σε εδάφη..... 84
6.13 Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης νιτρικών σε εδάφη..... 85
6.14 Διερεύνηση χρόνου εκχύλισης..... 86
6.15 Σύγκριση αποτελεσμάτων με εκχύλιση σε νωπό και ξηρό δείγμα..... 87
6.16 Σύγκριση αποτελεσμάτων με εκχύλιση σε εδάφη κοσκινισμένα από διαφορετικά μεγέθη οπής (<100mm και <2mm)..... 87
6.17 Ορθότητα και Αναπαραγωγιμότητα σε εδαφικά εκχυλίσματα..... 88
6.18 Ισοδυναμία προσδιορισμού νιτρικών σε εκχυλίσματα εδάφους με στήλη Cd και με VCl_3..... 91
6.19 Πειράματα Ομοιογένειας..... 91
6.20 Υπολογισμοί ισοζυγίων αβεβαιότητας..... 92

6.21 Αξιολόγηση στοιχείων επαναληψιμότητας – αναπαραγωγιμότητας – ορθότητας και αβεβαιότητας..... 95
6.22 Αποτελέσματα στα πραγματικά δείγματα 96
6.23 Συνοπτική αξιολόγηση απόδοσης εναλλακτικής μεθόδου 102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....104
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 106

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σημασία προσδιορισμού συγκέντρωσης νιτρικών στην περιβαλλοντική γεωχημεία

Η περιεκτικότητα σε άζωτο του στερεού φλοιού της Γης είναι 0,03% κ.β. και συναντάται κυρίως με τη μορφή των νιτρικών αλάτων KNO_3 και $NaNO_3$. Το άζωτο είναι το κύριο συστατικό της ατμόσφαιρας με τη μορφή του διαζώτου (N_2) αποτελώντας το 79% σε όγκο. Το αέριο άζωτο, κυρίως με τη μορφή διαζώτου (N_2), είναι χημικά σταθερό και δε σχηματίζει εύκολα ενώσεις. Το άζωτο αποτελεί, αναμφισβήτητα, το πιο άφθονο συστατικό της ατμόσφαιρας, καθιστώντας την τη μεγαλύτερη εν δυνάμει πηγή του (Zhao et al, 2017).

Το άζωτο είναι βασικό στοιχείο, αναγκαίο στους οργανισμούς, πρωτίστως για την παρασκευή πρωτεϊνών. Ωστόσο, τα φυτά, τα ζώα και οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν έχουν την δυνατότητα να αξιοποιήσουν άμεσα το ατμοσφαιρικό άζωτο στη μορφή με την οποία βρίσκεται (μοριακό άζωτο-N_2). Για το λόγο αυτό η εισαγωγή του ατμοσφαιρικού αζώτου στις τροφικές αλυσίδες των οικοσυστημάτων γίνεται με τη διαδικασία της αζωτοδέσμευσης, η οποία μετατρέπει το ατμοσφαιρικό άζωτο σε μορφές αξιοποιήσιμες από τους παραγωγούς (Murphy et al, 2018).

Το άζωτο βρίσκεται σε πολλά και ουσιώδη οργανικά μόρια των ζωντανών οργανισμών, όπως στα αμινοξέα, στις πρωτεΐνες και στο γενετικό υλικό των κυττάρων (DNA, RNA) (Wei Xing et al, 2013). Πριν το άζωτο ενσωματωθεί στις πρωτεΐνες και σε άλλες αζωτούχες ενώσεις, πρέπει να δεσμευτεί σε απλές ενώσεις που μπορούν χρησιμοποιηθούν από έμβια όντα (Worsfold 2008).

Στο υδάτινο περιβάλλον το διαλυμένο άζωτο συναντάται σε πολλές από τις εννέα οξειδωτικές καταστάσεις (-3 έως +5). Οι ενώσεις του αζώτου που συμμετέχουν σε μεγάλη έκταση στις βιολογικές διεργασίες είναι τα νιτρικά (NO_3^-), τα νιτρώδη (NO_2^-), τα αμμωνιακά (NH_4^+) καθώς και το οργανικό άζωτο και είναι και αυτές που προσδιορίζονται συνήθως στην περιβαλλοντική ανάλυση. Κυριότερη οργανική ένωση του αζώτου είναι η ουρία και ακολουθούν τα αμινοξέα (Jackson και Williams, 1985). Το άζωτο είναι το κύριο θρεπτικό που επηρεάζει την παραγωγικότητα των συστημάτων γλυκού νερού (Wetzel, 2001).

Ως **νιτρορύπανση** θεωρούμε την άμεση ή έμμεση απόρριψη στο υδάτινο περιβάλλον αζωτούχων ενώσεων, με σημαντικότερες επιπτώσεις την πρόκληση βλαβών στην ανθρώπινη υγεία και την υποβάθμιση των υδατικών οικοσυστημάτων (ΥΠΕΝ, Δικτυακός Τόπος Διαβουλεύσεων, Έγκριση κώδικα για την προστασία των νερών στο πλαίσιο οδηγίας, Άρθρο 03: ΟΡΙΣΜΟΙ, http://www.opengov.gr/minenv/?p=6537).

Τη σημαντικότερη πηγή νιτρορύπανσης αποτελούν οι αγροτικές δραστηριότητες, γεωργικές και κτηνοτροφικές, όπως αναλύθηκε και παραπάνω. Στα επιφανειακά νερά και ιδίως στις λίμνες και στους κλειστούς κόλπους η παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων αζωτούχων αλλά και φωσφορικών ενώσεων, με τη συνδρομή και της ηλιακής ακτινοβολίας, ενισχύει, συχνά σε υπερβολικό βαθμό, την ανάπτυξη υδρόβιας βλάστησης και φυτικών μικροοργανισμών στο νερό (φυτοπλαγκτόν- πρωτογενείς παραγωγοί), δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό το φαινόμενο του **ευτροφισμού** (Vollenweider, 1998). Τα μορφολογικά και υδρολογικά χαρακτηριστικά του θαλάσσιου αποδέκτη, όπως το βάθος και η ικανότητα ανανέωσης των νερών, επηρεάζουν την ευαισθησία του σε προβλήματα ευτροφισμού.

Συνεπώς, το φαινόμενο του ευτροφισμού εμφανίζεται όταν η εισροή θρεπτικών αλάτων από αλλόχθονες πηγές σε μία υδάτινη μάζα γίνεται τόσο μεγάλη, ώστε η ισορροπημένη αφομοίωση

(δηλαδή η κατανάλωση από τους παραγωγούς) στο τοπικό οικοσύστημα να είναι ανέφικτη. Επομένως, κατά το φαινόμενο του ευτροφισμού εκτός από την αύξηση του ρυθμού της πρωτογενούς παραγωγής και εκ τούτου της βιομάζας των φυκών, παρατηρούνται αλλαγές στις πληθυσμιακές ισορροπίες των οργανισμών, και υποβάθμιση της ποιότητας του νερού λόγω των υποξικών ή ανοξικών συνθηκών που δημιουργούνται. Είναι φανερό ότι οι συνέπειες του ευτροφισμού είναι ανεπιθύμητες εάν αισθητά υποβαθμίζουν την υγεία του οικοσυστήματος και/ή την βιώσιμη παροχή αγαθών και υπηρεσιών (Environmental Protection Agency, 2001, Smith, 2003, Smith και Schindler, 2009).

Ο ευτροφισμός αποτελεί μια από τις σημαντικότερες απειλές κυρίως για τις παράκτιες περιοχές, τους κλειστούς κόλπους και τις λιμνοθάλασσες κοντά σε αστικά κέντρα που έχουν μεγαλύτερο χρόνο ανανέωσης των υδάτων τους και υφίστανται σε πολύ πιο έντονο βαθμό τις επιπτώσεις των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων (Smith 2003, EEA 1999).

Στα υπόγεια ύδατα, η νιτρορύπανση εμφανίζεται κυρίως με τη μορφή αθροιστικής συσσώρευσης νιτρικών, τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις φθάνουν σε επίπεδα που είναι απαγορευτικά για τη χρήση του νερού για σκοπούς ύδρευσης. Ως οριακή τιμή έχει καθορισθεί από την Ελληνική και Διεθνή νομοθεσία η συγκέντρωση των 50 mg/l, ωστόσο ακόμα και σε μικρότερες συγκεντρώσεις (μεγαλύτερες από 25 mg/l) δημιουργείται προβληματισμός για μακροχρόνια χρήση του νερού για πόση (Drinking Water Directive, 98/83/EC, European Commission, 2008).

1.2. Σκοπιμότητα και στόχοι της έρευνας

Ο προσδιορισμός των NO_3^- σε δείγματα υπόγειων νερών πραγματοποιείται φωτομετρικά με την αναγωγή τους σε νιτρώδη μέχρι τώρα χρησιμοποιώντας στήλη καδμίου σε ρυθμιστικό διάλυμα. Τα νιτρικά που έχουν αναχθεί σε νιτρώδη αντιδρούν με σουλφανιλαμίδιο και σχηματίζεται μια διαζοτοένωση, η οποία στη συνέχεια αντιδρά με την N-(1-ναφθυλ) αιθυλενοδιαμίνη (NEDD) και σχηματίζει κοκκινωπό-μωβ αζωχρώμα η απορρόφηση του οποίου μετράται στα 543 nm.

Μειονεκτήματα της χρήσης στηλών Cd είναι κυρίως η πιθανή τοξικότητα του μετάλλου αυτού και οι έντονες μεταβολές στην αποτελεσματικότητα της αναγωγής των νιτρικών με το χρόνο ανάλογα με τον αριθμό και τη φύση των δειγμάτων (σταδιακή καταστροφή της στήλης). Επίσης η στήλη καδμίου χρησιμοποιείται καλύτερα σε δείγματα που έχουν χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων (όπως είναι τα θαλασσινά) και όχι σε υπόγεια νερά, όπου οι συγκεντρώσεις αναμένεται να είναι αρκετά υψηλότερες.

Εξαιτίας των παραπάνω μειονεκτημάτων κρίνεται απαραίτητη η χρήση εναλλακτικής μεθόδου προσδιορισμού νιτρικών ιόντων σε δείγματα υπόγειων νερών με διαφοροποιημένο στάδιο αναγωγής.

Επειδή σε όλες τις μετρήσεις υπάρχει η αβεβαιότητα, καθώς υπάρχει διαφορά ανάμεσα στην μετρούμενη και την πραγματική τιμή, την οποία θα παίρναμε έπειτα από μια ιδανική μέτρηση, χωρίς σφάλματα, θα πρέπει να προσδιορίζεται το μέγεθος αυτό σε όλες τις μετρήσεις.

Ο προσδιορισμός της αβεβαιότητας αλλά και των βασικότερων αναλυτικών χαρακτηριστικών (LOD, LOQ, επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα, ορθότητα) των μεθόδων που χρησιμοποιούνται είναι απαραίτητος καθώς οι χημικές μετρήσεις χρησιμοποιούνται ως πηγή πληροφορίας για διάφορους σκοπούς μεταξύ των οποίων και η λήψη σημαντικών αποφάσεων, αφού σε ελέγχους για επιβάρυνση του περιβάλλοντος ή κινδύνων για την δημόσια υγεία συγκρίνονται με νομοθετημένες

τιμές και τοξικολογικά όρια. Κατά τη σύγκριση λοιπόν αυτή είναι αναγκαίο ο αναλυτής να έχει επίγνωση της αβεβαιότητας των μετρήσεών του. Η ανάγκη για επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων (Analytical Method Validation) είναι πολύ έντονη τα τελευταία χρόνια, προκειμένου να αποδειχτεί ότι η κάθε μέθοδος που εφαρμόζεται δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα.

Μέσα από την παρούσα εργασία και τη διαδικασία επικύρωσης/επαλήθευσης της νέας εναλλακτικής μεθόδου προσδιορισμού νιτρικών θα πρέπει να αποδειχτεί ότι α) μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία με το διαθέσιμο εξοπλισμό του Εργαστηρίου Χημείας Περιβάλλοντος και β) ότι η εφαρμογή της όχι μόνο σε δείγματα υπόγειων νερών αλλά και σε εκχυλίσματα εδαφών δίνει τα επιθυμητά και αξιόπιστα αποτελέσματα ως προς την αναλυτική επίδοση (καλή επαναληψιμότητα και ορθότητα).

Στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι:

1. η επαλήθευση/επικύρωση μίας εναλλακτικής μεθόδου μέτρησης των νιτρικών ιόντων σε υπόγεια νερά ώστε να καταλήξουμε στα στοιχεία αναλυτικής επίδοσης της μεθόδου (ορθότητα και επαναληψιμότητα) με υλικά αναφοράς αλλά και πραγματικά δείγματα.
2. η επαλήθευση/επικύρωση μίας εναλλακτικής μεθόδου μέτρησης των νιτρικών ιόντων εκχυλίσματα εδαφών ώστε να καταλήξουμε στα στοιχεία αναλυτικής επίδοσης της μεθόδου (ορθότητα και επαναληψιμότητα) με υλικά αναφοράς αλλά και πραγματικά δείγματα.
3. Η σύγκριση των χαρακτηριστικών απόδοσης (χρόνος ανάλυσης και αξιοπιστία) της εναλλακτικής μεθόδου και αυτής με χρήση στήλης Cd ώστε να αποδειχτεί η καταλληλότητα της πρώτης μεθόδου.

Έτσι, οι μέθοδοι που θα αναπτυχθούν να προσφέρουν αξιόπιστα και επαναλήψιμα αποτελέσματα, ώστε να εξασφαλίζεται η ασφαλής χρήση τους για τον έλεγχο υπόγειων νερών και εδαφών, σύμφωνα πάντα με τις διατάξεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΑΖΩΤΟ ΣΤΟ ΧΕΡΣΑΙΟ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

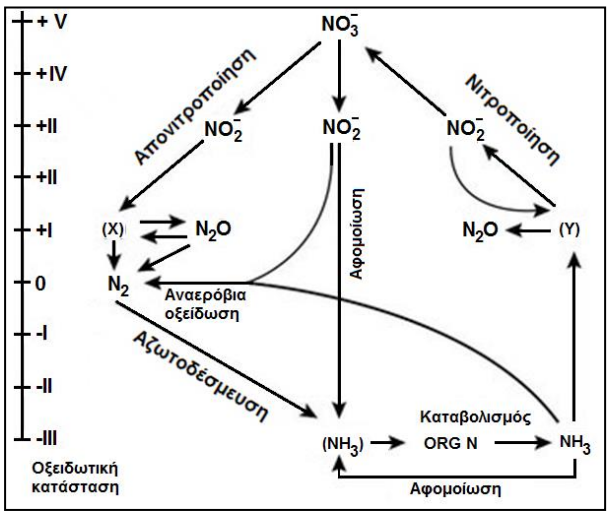
2.1 Τα Θρεπτικά Συστατικά

Τόσο για τους οργανισμούς της ξηράς όσο και για τους υδρόβιους οργανισμούς απαιτούνται διάφορα θρεπτικά συστατικά για τη φυσιολογική ανάπτυξή τους. Τα συστατικά αυτά, σε αντιδιαστολή προς τις μακροτροφές, τα λέμε συχνά μικροθρεπτικά συστατικά. Τα κυριότερα μικροθρεπτικά στοιχεία είναι το άζωτο και ο φωσφόρος, ενώ για μερικούς οργανισμούς που έχουν πυριτικό σκελετό (όπως τα διάτομα, τα ραδιολάρια κ.λπ.) το πυρίτιο (Samecka-Cymerman and Kempers 2001). Τα θρεπτικά συστατικά, όπως οι ενώσεις του φωσφόρου και του αζώτου, χρησιμοποιούνται στη φωτοσυνθετική διεργασία, ενσωματώνονται στους φυτικούς ιστούς και στη συνέχεια οι καταναλωτές οργανισμοί τρέφονται από τα φυτά παραγωγούς και με τη σειρά τους τρέφουν άλλους καταναλωτές. Οι οργανισμοί αυτοί αποβάλλουν, με τη βιολογική τους δράση (απέκκριση), απευθείας ένα ποσοστό θρεπτικών συστατικών ως προϊόντα μεταβολισμού, αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό των θρεπτικών συστατικών ελευθερώνεται μόνο μετά την καταστροφή και την αποσύνθεση των προϊόντων μεταβολισμού και των νεκρών κυττάρων των διαφόρων οργανισμών (Σκούλλος, 2010). Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στη μελέτη των ενώσεων του αζώτου στα υπόγεια ύδατα η συγκέντρωση των οποίων μάς βοηθά να εκτιμήσουμε την ποιότητα του νερού και να ανιχνεύσουμε πιθανή ρύπανση.

2.2 Ο κύκλος του αζώτου

Ο κύκλος του αζώτου στο περιβάλλον βασίζεται στις δυναμικές ισορροπίες μεταξύ των διαφόρων μορφών ανόργανων ή και οργανικών ενώσεων του αζώτου και αποτελείται από τέσσερα βασικά στάδια (Σκούλλος, 2010, Watanabe and Ortega, 2011):

1. Δέσμευση του αζώτου
2. Αφομοίωση του αζώτου -«Οικοδόμηση»
3. Αναγέννηση νιτρικών-νιτροποίηση
4. Αναγωγή νιτρικών σε νιτρώδη-Απονιτροποίηση



Εικόνα 2.1 Μετατροπές των διαφόρων μορφών του αζώτου και το αντίστοιχο σθένος τους

Οι μεταβολές του σθένους του αζώτου στο περιβάλλον αποτελούν, όπως θα παρουσιαστούν και σε επόμενο Κεφάλαιο, γέφυρα για τη μέτρησή του καθώς για τους διάφορους προσδιορισμούς εκμεταλλευόμαστε τα φαινόμενα της αναγωγής και οξείδωσής του. Έτσι, διαφορετικές μορφές του αζώτου (και κατ' επέκταση, οξειδωτικές καταστάσεις) μπορούν είτε να μετατραπούν σε μια μορφή για να μετρηθούν, είτε να μετρηθούν απευθείας.

Για παράδειγμα, τα νιτρικά ιόντα και το οργανικό άζωτο μπορούν να μετατραπούν σε νιτρώδη (μια μορφή) ενώ τα νιτρώδη και τα αμμωνιακά μπορούν να μετρηθούν απευθείας.

2.2.2 Ατμοσφαιρική και βιολογική αζωτοδέσμευση και αναγωγή αζώτου προς αμμωνία

Για να καταστεί αφομιώσιμο για την έμβια ύλη, το άζωτο θα πρέπει να μετατραπεί σε αμμωνία (NH_3) ή σε νιτρικά ιόντα (NO_3^-), μέσω της αζωτοδέσμευσης. Η αζωτοδέσμευση μπορεί να είναι είτε ατμοσφαιρική, είτε βιολογική. Η βιολογική αζωτοδέσμευση προσφέρει τα μεγαλύτερα ποσά αφομοιώσιμων μορφών αζώτου (το 90% της συνολικής αζωτοδέσμευσης).

Ατμοσφαιρική αζωτοδέσμευση

Το άζωτο της ατμόσφαιρας αντιδρά είτε με τους υδρατμούς, σχηματίζοντας αμμωνία, είτε με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, σχηματίζοντας νιτρικά ιόντα. Η απαραίτητη ενέργεια προσφέρεται από τις ηλεκτρικές εκκενώσεις. Η αμμωνία και τα νιτρικά ιόντα μεταφέρονται με τη βροχή στο έδαφος.

Βιολογική αζωτοδέσμευση

Πραγματοποιείται από ελεύθερους ή συμβιωτικούς μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο έδαφος και στο νερό, δηλαδή, τα βακτήρια. Τα βακτήρια μπορεί να είναι είτε «ριζόβια» είτε «ανεξαρτήτως δρώντα» (Βαλαβανίδης 2009, Watanabe and Ortega, 2011). Αζωτοδεσμευτικοί οργανισμοί είναι:

- κυανοβακτήρια
- βακτήρια του εδάφους που διαβιούν ελεύθερα
- βακτήρια του εδάφους που συμβιώνουν στις ρίζες των ψυχανθών φυτών
- ακτινομύκητες που συνδέονται με τις ρίζες των σκλήθρων

Η αναγωγή του N_2 προς αμμωνία (Σκούλλος 2010, Bernhard 2012):

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- \longrightarrow 2NH_3 + H_2$$
$$N_2 + 3H_2 + \text{Ενέργεια} \longrightarrow 2NH_3$$

2.2.3 Η αποικοδόμηση οργανικών αζωτούχων ενώσεων - η αναγέννηση των νιτρικών (Νιτροποίηση)

Το άζωτο επιστρέφει στο έδαφος με την αποσύνθεση της νεκρής οργανικής ύλης, από βακτήρια, τα οποία μετατρέπουν την πλούσια σε άζωτο οργανική ύλη σε αμμωνία και αμμωνιακά άλατα. Η αμμωνία ακολούθως, μετατρέπεται σε νιτρώδη και νιτρικά άλατα, τα οποία από το έδαφος μπορούν να ενσωματωθούν στις ρίζες των φυτών (Σκούλλος 2010, Βαλαβανίδης 2009).

Υπάρχουν δύο ομάδες βακτηρίων οι οποίες δρουν συλλογικά για την επίτευξη της νιτροποίησης. Τα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την οξείδωση της αμμωνίας, τα οποία λαμβάνουν την ενέργειά τους μετατρέποντας την αμμωνία σε νιτρώδη (Suzuki et al, 1974) και τα βακτήρια που οξειδώνουν

τα νιτρώδη σε νιτρικά. Τα βακτήρια που εκτελούν τις παραπάνω διεργασίες είναι είτε αερόβια είτε αναερόβια, ελευθέρως ζώντα ή προσκολλημένα σε σωματιδιακή ύλη.

Η βακτηριακή νιτροποίηση λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια, πρώτα τα αμμωνιακά ιόντα οξειδώνονται σε νιτρώδη και στη συνέχεια τα νιτρώδη οξειδώνονται σε νιτρικά ιόντα σύμφωνα με τις παρακάτω χημικές αντιδράσεις (Σκούλλος 2010, Bernhard 2012):

$NH_4^+ + 3/2O_2 \longrightarrow 2H^+ + NO_2^- + H_2O$ όπου $\Delta G°= 59,4$ kcal

$NO_2^- + 1/2O_2 \longrightarrow NO_3^-$ όπου $\Delta G°= 18$kcal

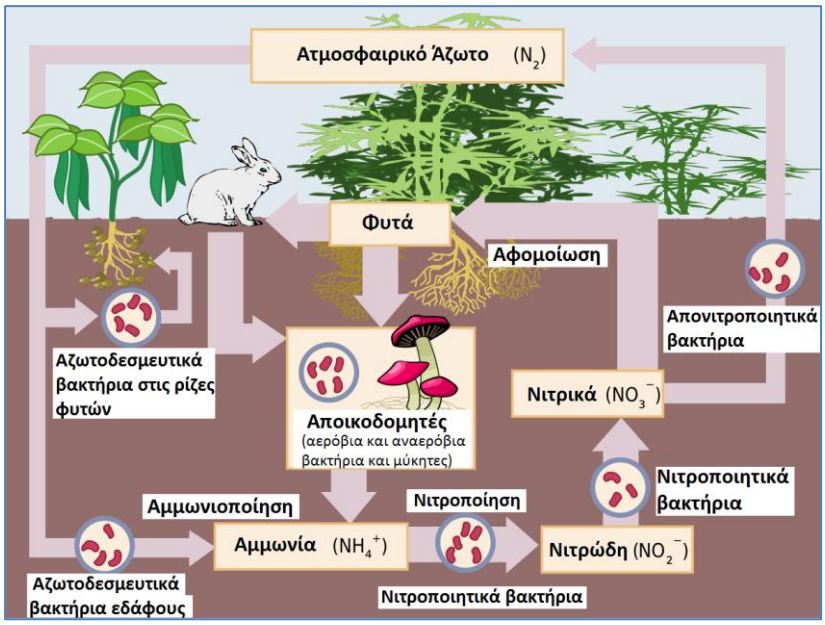
Βακτήρια των γενών *Nitrosomonas*, στο έδαφος και *Nitrosococcus* στα θαλάσσια οικοσυστήματα, συμμετέχουν στο πρώτο στάδιο της νιτροποίησης, μετατρέπουν δηλαδή τα αμμωνιακά σε νιτρώδη. Στο δεύτερο στάδιο συμμετέχουν τα γένη *Nitrobacter* στο έδαφος και *Nitrococcus* στις θάλασσες, μετατρέπωντας τα νιτρώδη σε νιτρικά (Watson 1971, Watson et al, 1986).

Εκτός από την βακτηριακή οξείδωση, υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί νιτροποίησης, όπως:

α) Καταλυτική οξείδωση με χρήση οργανικών ουσιών που παράγονται από τα βακτήρια, έξω από τον ίδιο τους τον οργανισμό.

β) Φωτοχημική οξείδωση με την επίδραση της ηλιακής υπεριώδους ακτινοβολίας.

γ) Οξείδωση από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο στα επιφανειακά στρώματα της θάλασσας.



Εικόνα 2.2 Ενδεικτικός κύκλος του αζώτου στο έδαφος

2.2.4 Η αφομοίωση του αζώτου των ανόργανων αζωτούχων ενώσεων προς αμινοξέα και πρωτεΐνες, η οικοδόμηση των αζωτούχων ενώσεων

Η αμμωνία, ασχέτως προελεύσεως, αντιδρά με ακετογλουταρικό οξύ, παρουσία ανηγμένου φωσφορικού αδένινο-νικοτινάμιδο-δινουκλεοτιδίου (NADPH), και δίνει γλουταμικό οξύ από το οποίο σχηματίζονται τα αμινοξέα (περίπου 20) που χρειάζονται για τη δόμηση των πρωτεϊνών των φυτών:

$HOOC\text{-}CO\text{-}(CH_2O)_2\text{-}COOH + NH_3 + NADPH + H^+ \longrightarrow HOOC\text{-}CH(NH_2)\text{-}CH_2CH_2\text{-}COOH + NADP^+ + H_2O$

Στη συνέχεια τα αμινοξέα, συνδυαζόμενα και συνδεόμενα μεταξύ τους, δίνουν φυτικές πρωτεΐνες με πολύπλοκους μηχανισμούς όπου συμμετέχουν το RNA, το DNA και το ATP. Οι φυτικές πρωτεΐνες αφού διασπαστούν σε αμινοξέα και ανασυνδυαστούν δίνουν τις ζωικές πρωτεΐνες των ανώτερων μελών της τροφικής αλυσίδας.

2.2.5 Η απονιτροποίηση

Απονιτροποίηση θεωρείται η αναγωγή όχι μόνο των νιτρικών σε νιτρώδη, αλλά και η αναγωγή αυτών των δύο μορφών του αζώτου σε μοριακό άζωτο ή οξείδιο του αζώτου. Η απονιτροποίηση είναι δηλαδή η απελευθέρωση αζώτου στην ατμόσφαιρα. Η απονιτροποίηση συντελείται από έναν μεγάλο αριθμό βακτηρίων, τα βακτήρια απονιτροποίησης, όπως το είδος *Pseudomonas denitrificans* σε αναερόβιες συνθήκες, βαθιά στο έδαφος ή σε στάσιμα νερά. Τα νιτρώδη ιόντα που σχηματίζονται με τον τρόπο αυτό ανάγονται σε υποξείδιο του αζώτου ή ακόμη σε στοιχειακό άζωτο (Σκούλλος 2010, Bernhard, 2012).

Η έκταση στην οποία οι αυξημένες συγκεντρώσεις των νιτρικών επηρεάζουν τα υπόγεια ύδατα εξαρτάται από τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες στα τμήματα του υδροφόρου ορίζοντα. Η απονιτροποίηση είναι μία διαδικασία όπου τα νιτρικά ιόντα χρησιμοποιούνται ως δέκτης ηλεκτρονίων και ανάγονται προς N_2 ως εξής:

$$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NO_2^- + H_2O$$

$$2NO_3^- + 12H^+ + 10e^- \longrightarrow N_2 + 6H_2O$$

Οι προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα νιτρικά ως δέκτες ηλεκτρονίων όταν το οξυγόνο είναι περιορισμένο (Bernhard, 2012).

2.3 Ανθρωπογενείς προσθήκες αζωτούχων ενώσεων στο περιβάλλον

Η γνώση και κατανόηση του κύκλου του Ν είναι πολύ σημαντική, τόσο για τη μέγιστη αξιοποίηση των αποθεμάτων του εδαφικού Ν (φυσικών ή πρόσθετων), όσο και για την εκτίμηση της πιθανής διαταραχής του κύκλου του Ν λόγω των πιέσεων που υφίσταται από τις ανθρωπογενείς παρεμβάσεις. Οι ανθρώπινες δραστηριότητες διαταράσσουν τον κύκλο του αζώτου με ποικίλους τρόπους όπως (Gallloway et al, 1994, Vitousek et al, 1997):

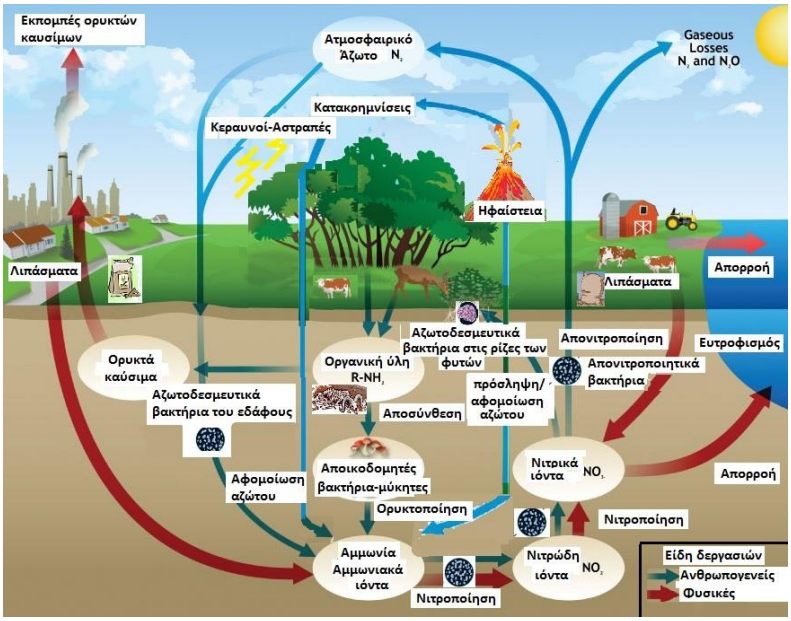
α) με την εκπομπή ενώσεων αζώτου στην ατμόσφαιρα διαμέσου της χρήση καυσίμων στην βιομηχανία και τα αυτοκίνητα,

β) με τη καύση βιομάζας ελευθερώνοντας ενώσεις αζώτου στην ατμόσφαιρα,

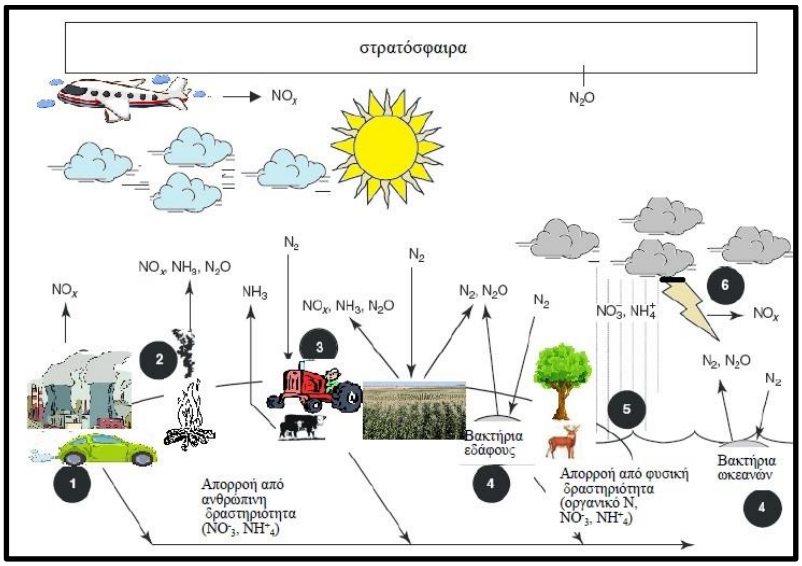
γ) με τη χρήση αζωτούχων λιπασμάτων στη γεωργία διαμέσου των οποίων εισάγεται το άζωτο στο έδαφος και στο νερό,

δ) με τα απόβλητα των ζώων των αγροκτημάτων τα οποία απελευθερώνουν αμμωνία στο έδαφος και το νερό,

ε) με τα λύματα και τα υγρά βιομηχανικά απόβλητα όπου εισάγεται άζωτο στα επιφανειακά και τα υπόγεια ύδατα.



Εικόνα 2.3 Ενδεικτικός κύκλος του αζώτου στο περιβάλλον



Εικόνα 2.4: Μία ολοκληρωμένη εικόνα του κύκλου του αζώτου.
(1)Αστικές περιοχές: NO_x εκπέμπεται στην ατμόσφαιρα από καύσεις σε υψηλή θερμοκρασία.
(2)Καύσεις βιομάζας: ελευθερώνονται NO_x, NH_3 και N_2O στηνατμόσφαιρα.
(3)Γεωργία και κτηνοτροφία: το άζωτο δεσμεύεται στο έδαφος και τα νερά με την χρήση λιπασμάτων. Η απονιτροποίηση ελευθερώνει N_2 και N_2O στην ατμόσφαιρα. Από τις απεκκρίσεις των ζώων και τα λιπάσματα ελευθερώνεται αμμωνία.
(4)Φυσικές πηγές: Το N_2 δεσμεύεται από εδαφικά βακτήρια.Η απονιτροποίηση ελευθερώνει N_2&N_2O στην ατμόσφαιρα.
(5)Υγρή και ξηρή εναπόθεση: Νιτρικά&αμμωνιακά άλατα μεταφέρονται από την ατμόσφαιρα στο έδαφος και τη θάλασσα.
(6) Αστραπές: NO_x παράγεται διαμέσου αντίδρασης σε υψηλή θερμοκρασία του N_2 με O_2.

2.3.1 Στην ατμόσφαιρα

Δύο από τα οξείδια του αζώτου είναι εκείνα που κατέχουν σπουδαίο ρόλο στα προβλήματα της ατμοσφαιρικής ρύπανσης: το μονοξείδιο και το διοξείδιο του αζώτου. Γι' αυτό έχει επικρατήσει, ο όρος «οξείδια του αζώτου (NO_x)», να αφορά μόνο τα δύο αυτά οξείδια (NOx =NO + NO_2). Επιπλέον, μεταξύ τους υπάρχει η ισορροπία:

$$2NO + O_2 \leftrightarrow N_2O_4 \leftrightarrow 2NO_2$$

Η παραγωγή των NO_x γίνεται είτε από την οξείδωση του ατμοσφαιρικού αζώτου κατά τη διάρκεια της καύσης είτε κατά τη οξείδωση των αζωτούχων ενώσεων που περιέχονται στα καύσιμα. Ο άνθρωπος επηρεάζει το ατμοσφαιρικό κομμάτι του κύκλου του αζώτου εκπέμποντας τεράστιες ποσότητες μονοξειδίου του αζώτου στην ατμόσφαιρα με τις καύσεις των ορυκτών καυσίμων σε βιομηχανιές και οχήματα (Fenn et al, 1998, Galloway et al, 1994).

Ο μικρός σχετικά χρόνος ζωής του NO_2 (~1 μέρα), με τον μετασχηματισμό του σε HNO_3, λόγω της αντίδρασής του με τους υδρατμούς της ατμόσφαιρας, οδηγείται έμμεσα σε χρόνους ζωής της μιας εβδομάδος, με αποτέλεσμα την επιστροφή του στην επιφάνεια της Γης ως όξινη εναπόθεση. Το νιτρικό οξύ, μαζί με το διοξείδιο του θείου, είναι σημαντικά συστατικά της όξινης βροχής, η οποία μπορεί να καταστρέψει τα δάση και να διαταράξει τα υδάτινα οικοσυστήματα καθώς και να διαβρώσει κτήρια και άλλες δομικές κατασκευές (Fenn et al, 1998, Vitousek et al, 1997).

Η παρουσία του N_2O στην τροπόσφαιρα σχετίζεται με έντονη συνεισφορά στην ενίσχυση του φαινόμενου του θερμοκηπίου. Το N_2O, εξαιτίας της εξαιρετικά υψηλής σταθερότητάς του στην τροπόσφαιρα, αν όχι όλη η μεγαλύτερη ποσότητά του διαχέεται προς την στρατόσφαιρα. Στην ζώνη αυτή θα φωτοδιασπαστεί ή θα αντιδράσει με ατομικό οξυγόνο:

$N_2O + h\nu \rightarrow N_2 + O$ ($\lambda<340$ nm)
$N_2O + h\nu \rightarrow NO + N$ ($\lambda<250$ nm)
$N_2O + O \rightarrow N_2 + O_2$ (κατά 42%)
$N_2O + O \rightarrow 2NO$ (κατά 58%)

Κατόπιν του σχηματισμού του NO η καταστροφή του στρατοσφαιρικού όζοντος απ΄ αυτό συντελείται με βάση τον κάτωθι κύκλο αντιδράσεων:

$NO + O_3 \rightarrow NO_2 + O_2$
$NO_2 + O \rightarrow NO + O_2$

Συνολικά: $O_3 + O \rightarrow O_2 + O_2$

Τέλος, προκαλεί μείωση της ορατότητας καθώς μέσα από φωτοχημικές αντιδράσεις δημιουργεί ένα καστανοκίτρινο νέφος πάνω από τις πόλεις (Fenn et al, 1998).

2.3.2 Αγροτικές δραστηριότητες

Μεταξύ όλων των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων, το Ν θεωρείται ως το πλέον αναγκαίο στοιχείο για την ανόργανη θρέψη των καλλιεργούμενων φυτών, καθώς ασκεί τη μεγαλύτερη επίδραση στην αύξηση, την ανάπτυξη και απόδοση των καλλιεργειών, ενώ συχνά αποβαίνει περιοριστικός παράγοντας της γεωργικής παραγωγής (Αναλογίδης, 2000, Gastal & Lemaire, 2002).

Ο άνθρωπος επεμβαίνει στον κύκλο του αζώτου κυρίως με την εισαγωγή αζωτούχων λιπασμάτων στα αγροτικά οικοσυστήματα, προκειμένου να αυξήσει την παραγωγικότητά τους. Τα αζωτούχα λιπάσματα, προστίθενται σε μεγάλες ποσότητες, ενώ λιγότερο από το ένα τρίτο της εκάστοτε προστιθέμενης ποσότητας προσλαμβάνεται από τα φυτά. Το υπόλοιπο παρασύρεται από τη βροχή και καταλήγει στους υδάτινους αποδέκτες, οδηγώντας στο φαινόμενο του ευτροφισμού (Stoddard 1994, Williams et al, 1996).

Τα αζωτούχα λιπάσματα επιβαρύνουν το υδάτινο περιβάλλον κατά κύριο λόγο με νιτρικά ιόντα. Αυτό συμβαίνει γιατί, παρόλο που η κύρια μορφή αζώτου που προστίθεται είναι η αμμωνία, αυτή γρήγορα οξειδώνεται σε νιτρικά ιόντα με τη βοήθεια των νιτροποιητικών βακτηρίων του εδάφους. Τα νιτρικά, που σχηματίζονται, μπορούν να εκπλυθούν εύκολα, γιατί τα περισσότερα εδάφη της εύκρατης ζώνης έχουν αρνητικό φορτίο στα κολλοειδή τους, το οποίο δεν έλκει τα NO_3^- και κατά συνέπεια δεν τα συγκρατούν. Το πλεόνασμα αζώτου εκπλένεται από το ριζικό σύστημα των φυτών, καταλήγοντας στα υπόγεια νερά ή στα αρδευτικά κανάλια και από εκεί σε επιφανειακά (ποτάμια και λίμνες) και παράκτια θαλάσσια ύδατα. Η απόπλυση των νιτρικών ιόντων εξαρτάται από τα επίπεδα συγκέντρωσής τους, τον τύπο του εδάφους, το κλίμα, το είδος καλλιέργειας, καθώς και τον τύπο και τον τρόπο χρήσης των εφαρμοζόμενων λιπασμάτων (Lyons et al, 1993).

2.3.3 Αστικά λύματα

Τα αστικά λύματα είναι ετερογενές μίγμα οργανικών και ανόργανων χημικών ενώσεων. Στην παράκτια ζώνη εκχύνονται μεγάλες ποσότητες αστικών λυμάτων και μάλιστα συχνά χωρίς καμία επεξεργασία (Postigo et al, 2018).

Η πολύπλοκη κυκλοφορία των ρευμάτων σε εκβολικές περιοχές, συχνά συνεπάγεται την παγίδευση και συσσώρευση των λυμάτων που καταλήγουν εκεί.

Το άζωτο που προέρχεται από αστικά λύματα υπολογίζεται μεταξύ 2,2 – 5,5 kg N ανά κάτοικο ανά έτος (EEA, 1999). Πρέπει να σημειωθεί, ότι μέρος του αζώτου που προέρχεται από αστικά λύματα βρίσκεται στην μορφή αμμωνιακών ιόντων, τα οποία είναι ιδιαίτερα επιβλαβή για τους υδρόβιους οργανισμούς, ενώ συνεισφέρουν και στην κατανάλωση οξυγόνου, καθώς εύκολα οξειδώνονται σε νιτρικά ιόντα.

Εκτός από την απευθείας εισροή θρεπτικών συστατικών από τα αστικά λύματα, θρεπτικά ελευθερώνονται και από την αποσύνθεση της οργανικής ύλης των αστικών λυμάτων. Οι οργανικές ουσίες αποικοδομούνται από τα βακτήρια, το διαλυμένο οξυγόνο μειώνεται ή εξαντλείται, οπότε και δημιουργούνται ανοξικές συνθήκες με αρνητικές επιπτώσεις για τους θαλάσσιους οργανισμούς.

Αρχικά, η αύξηση της ποσότητας των θρεπτικών συστατικών μιας περιοχής, είναι ευεργετικό φαινόμενο, διότι τονώνει την παραγωγικότητά της. Όμως, σε προχωρημένη κατάσταση, η υπέρμετρη αύξηση της πρωτογενούς παραγωγής δημιουργεί το φαινόμενο του ευτροφισμού, το οποίο θα αναλυθεί σε επόμενη παράγραφο.

2.2.4 Άλλες ανθρωπογενείς προσθήκες

Τα βιομηχανικά απόβλητα, τα οποία είναι πλούσια σε οργανικές ουσίες, είναι μια σημαντική ανθρωπογενής προσθήκη, που όπως και τα αστικά λύματα, με την αποσύνθεσή τους ελευθερώνουν θρεπτικά συστατικά (Worsfold, 2008).

Άλλες προσθήκες θρεπτικών συστατικών στα υδάτινα συστήματα είναι τα απόβλητα των μεγάλων μονάδων εκτροφής ζώων, τα οποία παρέχουν τεράστια φορτία αποβλήτων, ενώ αύξηση θρεπτικών στοιχείων παρατηρείται και σε περιοχές με υδατοκαλλιέργειες. Τέλος, σε ορισμένες τουριστικές περιοχές, τους καλοκαιρινούς μήνες παρατηρείται σημαντική αύξηση θρεπτικών συστατικών. Οπότε

και ο τουρισμός μπορεί να θεωρηθεί ως ένας τοπικός παράγοντας αύξησης θρεπτικών συστατικών σε παράκτιες περιοχές (Papathanassiou και Zenetos, 2005).

2.2.5 Οι κύριες επιπτώσεις των αζωτούχων ενώσεων στην ανθρώπινη υγεία

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα επιφανειακά και τα υπόγεια ύδατα ρυπαίνονται σχετικά εύκολα από πηγές νιτρικών όπως είναι τα λιπάσματα, οι απεκκρίσεις από τα εκτρεφόμενα ζώα, τα ανθρώπινα απόβλητα από τις σηπτικές δεξαμενές καθώς και τα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων (Bryan, 2013). Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα τα επίπεδα των νιτρικών στα υπόγεια ύδατα να αυξάνονται συνεχώς και κατά συνέπεια να αυξάνεται και η έκθεση στα νιτρικά και στα νιτρώδη για όσους καταναλώνουν πόσιμο νερό από ρυπασμένους υδροφορείς. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα νιτρικά σε φυσιολογικά επίπεδα έχουν ευεργετικό ρόλο στην ανθρώπινη φυσιολογία, ωστόσο όταν βρίσκονται σε πάρα πολύ υψηλά επίπεδα μπορεί να προκαλέσουν οξεία τοξικότητα (Bryan,2012).

Οι υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών που καταλήγουν στο πόσιμο νερό λόγω της ανθρωπογενούς δραστηριότητας αυξάνουν τον κίνδυνο ασθενειών, όπως είναι ορισμένες μορφές καρκίνου, η μεθαιμογλοβιναιμία κατά την οποία τα νιτρικά ανάγονται σε νιτρώδη, τα οποία στη συνέχεια συμπλέκονται με την αιμογλοβίνη του αίματος προκαλώντας παρεμπόδιση της αποτελεσματικής μεταφοράς του οξυγόνου στους ιστούς (Nuñez, 2013), οι αποβολές, ο διαβήτης και οι διαταραχές του θυρεοειδούς (Bruning-Fann, 1996). Επιπλέον, άλλη πιθανή ανησυχία της τοξικής δράσης των νιτρικών είναι η πιθανή επιβλαβής νίτρωση των αμινών χαμηλού μοριακού βάρους που μπορεί να συμβεί στο ελαφρώς όξινο περιβάλλον του στομάχου σχηματίζοντας με αυτό το τρόπο N-νιτροζαμίνες, όπου μερικές από αυτές θεωρούνται καρκινογόνες και έχει δειχθεί ότι προκαλούν ένα εύρος όγκων σε περισσότερα από 40 είδη ζώων (Nuñez 2013, Bryan 2012). Το ποσοστό πρόσληψης νιτρικών από το πόσιμο νερό ως προς τη συνολική διατροφική πρόσληψη στην Ευρώπη κυμαίνεται από 10 έως 20%, ωστόσο ορισμένοι πληθυσμοί, όπως αυτοί που ζουν σε αγροτικές γεωργικές περιοχές και χρησιμοποιούν ρηχά πηγάδια, μπορούν να εκτίθενται σε μεγαλύτερο βαθμό (Bryan, 2013).

2.4 Νομοθετικό πλαίσιο

Γενικά, η ύπαρξη αζωτούχων ενώσεων στο πόσιμο νερό είναι ανεπιθύμητη, καθώς η παρουσία τους συχνά συνδέεται με ρυπάνσεις από λύματα πόλεων, διαρροές από οχετούς ή βόθρους. Τα ύδατα των γεωτρήσεων κοντά σε αγροτικές περιοχές εμφανίζουν αυξημένες συγκεντρώσεις σε νιτρικά ιόντα, τα οποία προέρχονται από λιπάσματα ή και κτηνοτροφικά απόβλητα (Justic et al, 1995).

Λαμβάνοντας υπόψη τις πιέσεις που ασκούνται στα υδατικά αποθέματα και δεδομένου ότι η πρόσβαση σε νερό είναι δικαίωμα όλων, η Ευρωπαϊκή Ένωση έλαβε νομοθετικά μέτρα για την ποιοτική και ποσοτική διαχείριση των υδάτων, με την Ελλάδα να τα ενσωματώνει στο εθνικό δίκαιο και να τα εναρμονίζει μέσω Κοινών Υπουργικών Αποφάσεων (http://www.ypeka.gr/).

Η Οδηγία 98/83/ΕΚ είναι η πιο βασική νομοθεσία της Ε.Ε. για τη θέσπιση προτύπων ποιότητας για το πόσιμο νερό. Οι διατάξεις σχετικά με την ποιότητα του πόσιμου νερού που καθιερώνονται από την Οδηγία επιτρέπουν στα κράτη-μέλη της Ε.Ε. να προσαρμόσουν την παρακολούθηση της ποιότητας των υδάτων στις τοπικές συνθήκες, έτσι ώστε να αξιολογηθεί η ασφάλεια των υδάτων

προς την κατανάλωση νερού και να ανιχνευθούν τυχόν προβλήματα ώστε να ληφθούν κατάλληλα μέτρα για την αποκατάσταση και την επίτευξη της καλής ποιότητας του πόσιμου νερού. Στην Οδηγία αυτή καθορίζονται τα όρια των τιμών για μικροβιολογικές και χημικές παραμέτρους, καθορίζονται οι τρόποι παρακολούθησης στις αναλυόμενες παραμέτρους, καθώς και η συχνότητα δειγματοληψίας. Η Οδηγία θέτει ανώτατα όρια για τα νιτρικά άλατα, τα νιτρώδη και αμμωνιακά ιόντα. Η Οδηγία ενσωματώθηκε στο Εθνικό δίκαιο με την ΚΥΑ Υ2/2600/2001 (ΦΕΚ 892/Β΄/ 11.07.2001)
(http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EL:PDF)

Στο πόσιμο νερό, οι ανώτερες επιτρεπτές τιμές της Ευρωπαϊκής Ένωσης δίδονται στον Πίνακα 2.1 (Υγειονομική διάταξη αρ. Α5/288/23-1-86, βασισμένη στην 80/778/17-7-80 οδηγία της ΕΟΚ).

Πίνακας 2.1: Ανώτερες επιτρεπτές τιμές κάποιων θρεπτικών αλάτων για το πόσιμο νερό (Οδηγία 98/83/ΕΚ, 1998)

Παράμετρος	Ανώτερες τιμές
Νιτρικά ιόντα	50 mg/l
Νιτρώδη ιόντα	0,50 mg/l
Αμμωνία	0,50 mg/l

Η Ευρωπαϊκή Ένωση, αναγνωρίζοντας το πρόβλημα της νιτρορύπανσης στους υδάτινους υδροφορείς, κρίνει αναγκαίο να ληφθούν μέτρα, προκειμένου να προστατευθούν η ανθρώπινη υγεία, η χλωρίδα και η πανίδα και τα υδάτινα οικοσυστήματα και εκδίδει ειδική Οδηγία, την 91/676/ΕΟΚ, «Για την προστασία των υδάτων από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης» (Nitrates Directive, 91/676/EEC). Η Οδηγία καθορίζει ευπρόσβλητες ζώνες και αναφέρεται σε προγράμματα δράσης, τα οποία πρέπει να περιλαμβάνουν μέτρα για τη μείωση της χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων στο έδαφος και για την παρακολούθηση των υδάτων (monitoring). Για την εξασφάλιση ενός γενικού επιπέδου προστασίας, σύμφωνα με την Οδηγία, τα κράτη μέλη οφείλουν να θεσπίσουν κώδικες ορθής γεωργικής πρακτικής που θα εφαρμόζονται από τους γεωργούς, και να εφαρμόσουν κατάλληλα προγράμματα παρακολούθησης, σε σχέση με την περιεκτικότητα των επιφανειακών και των υπόγειων υδάτων σε νιτρικά ιόντα, σε επιλεγμένα σημεία μέτρησης, ώστε να προσδιορίζουν την έκταση της γεωργικής νιτρορύπανσης των υδάτων. Τα κράτη μέλη οφείλουν να επανεξετάζουν και ενδεχομένως να αναθεωρούν τα εθνικά τους προγράμματα δράσης, τουλάχιστον ανά τετραετία και να ενημερώνουν την Επιτροπή για κάθε τροποποίηση.

Η Οδηγία της Ε.Ε. 91/676 υιοθετήθηκε και εναρμονίστηκε με την Εθνική Νομοθεσία με την ΚΥΑ 161690/1335/1997 (ΦΕΚ Β’ 519/25-6-1997) ως ένα μέτρο αντιμετώπισης των πλεονασματικών αζωτούχων λιπάνσεων, οι οποίες έχουν οδηγήσει πολλές ζώνες εντατικών εκμεταλλεύσεων σε προβληματική κατάσταση από απόψεως νιτρορύπανσης των υδάτινων πόρων.

Σύμφωνα με το άρθρο 4 της Οδηγίας της Ε.Ε. 91/676 θεσπίστηκε με την αρ. 85167/820/20-3-2000 Υπουργική Απόφαση ο «Κώδικας Ορθής Γεωργικής Πρακτικής» για την προστασία των νερών από νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης’’ (ΦΕΚ Β 477/6-4-2000).

Ο σκοπός της Οδηγίας σε ότι αφορά τα λιπάσματα, και ειδικότερα τα αζωτούχα, είναι να βοηθήσει τους γεωργούς να εφαρμόσουν πρακτικές φιλικές προς το περιβάλλον. Ιδιαίτερα ο κώδικας στοχεύει:

- στην αποτροπή της ρύπανσης των υπόγειων και επιφανειακών νερών από τη συσσώρευση νιτρικών λόγω βαθιάς διήθησης ή επιφανειακής απορροής.
- στην παροχή οδηγιών για τη σωστή διαχείριση των νερών (συστήματα άρδευσης, τρόποι εφαρμογής, εξοικονόμηση νερού, κ.λ.π)
- στον χειρισμό - διάθεση των κτηνοτροφικών αποβλήτων με στόχο πάντα την προστασία του περιβάλλοντος και της Δημόσιας υγείας (http://www.ypeka.gr/?tabid=250)

Πίνακας 2.2: Ανώτερες αποδεκτές τιμές σε υπόγεια ύδατα (ΦΕΚ 3322 στις 30/12/2011).

Παράμετρος	Ανώτερη αποδεκτή τιμή
Αμμώνιο	0,50 mg/l
Νιτρικά	50 mg/l
Νιτρώδη	0,50 mg/l

Η ποιότητα του νερού που χρησιμοποιείται για άρδευση συνεξετάζεται πάντα με βάση:

i. Τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους (μηχανική σύσταση, ολικά άλατα, διαπερατότητα, pH, κλπ.)
ii. Τις συνθήκες στράγγισης και έκπλυσης αλάτων
iii. Το ύψος της στάθμης του υπόγειου νερού
iv. Τον τρόπο άρδευσης
v. Το εύρος των αρδεύσεων και τις χορηγούμενες δόσεις νερού σε κάθε άρδευση
vi. Την αντοχή των καλλιεργειών στα άλατα του νερού σε σχέση με τη μηχανική σύσταση των εδαφών
vii. Την ιδιαιτερότητα των φυτικών ειδών να παρουσιάζουν ευαισθησία στα επιμέρους ιόντα του νερού
viii. Τις κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής

Τα κριτήρια ποιότητας για το νερό που χρησιμοποιείται για άρδευση έχουν εξαχθεί από κείμενο του FAO (Loukas 2012, Ayers 1985) και προβλέπουν τρεις κατηγορίες εκτίμησης κινδύνου για τα φυτά:

I) νερό με το οποίο η άρδευση δεν προκαλεί προβλήματα,

II) νερό με το οποίο η συνεχόμενη χρήση για άρδευση μπορεί να προκαλέσει αυξανόμενα προβλήματα

III) και νερό με το οποίο άρδευση προκαλεί άμεσα σοβαρά προβλήματα.

Πίνακας 2.3: Κριτήρια για αρδευτικά νερά (Loukas 2010, Ayers 1985)

Παράμετρος	Νερό I Άρδευση χωρίς προβλήματα	Νερό II Συνεχόμενη άρδευση μπορεί να προκαλέσει αυξανόμενα προβλήματα	Νερό III Άρδευση μπορεί να προκαλέσει άμεσα σοβαρά προβλήματα
Αγωγιμότητα (μS/cm)	<700	700-3000	>3000

Αμμωνιακά και Νιτρικά ** (NH_4-NO_3 mg/L)	<22	22-133	>133
Νιτρικά ** (NO_3 mg/L)	<5	5-30	>30
pH**	Φυσιολογικό εύρος 6,5-8,4		
*Τοξικότητα για πρόσληψη από τη ρίζα, ** Ειδικά προβλήματα για ευαίσθητα φυτά			

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ

3.1 Επικύρωση και Επαλήθευση Μεθόδου

Η διασφάλιση ποιότητας των εργαστηριακών διαδικασιών είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εξαγωγή αξιόπιστων αριθμητικών αποτελεσμάτων σε κάθε εργαστήριο που εφαρμόζει πρότυπες ή άλλες δημοσιευμένες μεθόδους, ώστε να προσδιορίζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των μεθόδων που επέλεξε με τον εξοπλισμό και τους αναλυτές που διαθέτει (IUPAC, 2002).

Στη διαδικασία της διαπίστευσης των εργαστηρίων, η επικύρωση (validation) - επαλήθευση (verification) των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται και η εκτίμηση της συνδυασμένης και διευρυμένης αβεβαιότητας των μετρήσεων αποτελούν αναγκαίες ενέργειες συμμόρφωσης προς τις απαιτήσεις διεθνών προτύπων (ISO 17025), της Νομοθεσίας και των διάφορων Κανονιστικών Επιτροπών (IUPAC, 2002).

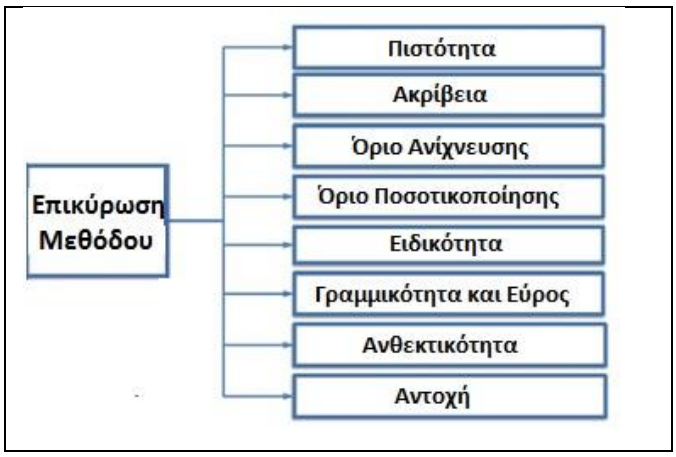
Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν κάποια αναλυτικά χαρακτηριστικά της νέας μεθόδου προσδιορισμού νιτρικών σε υπόγεια νερά και εδαφικά εκχυλίσματα που ξεκίνησε να εφαρμόζεται στο Εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος. Τα κύρια αναλυτικά χαρακτηριστικά και ο τρόπος προσδιορισμού τους περιγράφεται στη συνέχεια.

Επικύρωση (Validation): Αξιολόγηση των χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης και η εξέταση της ανταπόκρισής της προς προδιαγραφές (specifications) για να αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται (fitness for purpose) (Eurachem Guide, 1998).

Επαλήθευση (Verification): Επιβεβαίωση μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης ότι μια επικυρωμένη μέθοδος με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ποιότητας και χαρακτηριζόμενη ως κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο αναπτύχθηκε, εφαρμοζόμενη στο Εργαστήριο εξακολουθεί να ανταποκρίνεται προς τις απαιτούμενες προδιαγραφές (Miller J. C. and Miller J. N., 2010).

3.2 Χαρακτηριστικά Ποιότητας Αναλυτικών μεθόδων

- Accuracy: Ακρίβεια
- Trueness: Ορθότητα
- Precision: Πιστότητα
- Repeatability: Επαναληψιμότητα
- Reproducibility: Αναπαραγωγιμότητα
- Ruggedness: Ανθεκτικότητα
- Detectability: Ανιχνευσιμότητα
- Detection Limit: Όριο Ανίχνευσης
- Quantitation Limit: Όριο Ποσοτικοποίησης
- Specificity / Selectivity : Ειδικότητα / Εκλεκτικότητα
- Sensitivity: Ευαισθησία
- Linearity: Γραμμικότητα



Εικόνα 3.1: Τα 8 βήματα της USP για επικύρωση μεθόδων (Κουππάρης, 2015)

Ακρίβεια (Accuracy)

Η έννοια της ακρίβειας είναι ένα από τα πλέον δύσκολα θέματα και αυτό γιατί δεν είναι μόνον ο ορισμός ασαφής και δύσκολος στην ερμηνεία του, αλλά επίσης το θεωρητικό υπόβαθρο των μεθόδων για τον υπολογισμό της ακρίβειας είναι πολύπλοκο, ασαφές και όχι γενικά αποδεκτό (Eurachem Guide, 1998).

Ένας από τους ορισμούς της ακρίβειας είναι οι εξής: «Η ακρίβεια αναφέρεται στη διαφορά (σφάλμα, error ή bias) μεταξύ του μέσου όρου ¯x (mean), μιας σειράς μετρήσεων και της αληθούς τιμής μ, (true/correct) της μετρούμενης ποσότητας» (Eurachem Guide, 1998).

Γενικά, ως ακρίβεια ορίζεται η προσέγγιση της προσδιοριζόμενης τιμής προς την πραγματική.

Το σφάλμα μίας μέτρησης έχει δύο συνιστώσες:

Α) το τυχαίο σφάλμα (random error),

Β) το συστηματικό σφάλμα (bias).

Θεωρητικά, δεν πρέπει να υπάρχει συστηματικό σφάλμα, ωστόσο ένα μικρό συστηματικό σφάλμα είναι συνήθως αποδεκτό.

Ελλείψει συστηματικού σφάλματος η ακρίβεια της μεθόδου εκφράζεται μόνο από το τυχαίο σφάλμα, δηλαδή τον συντελεστή διακύμανσης CV (Πιστότητα). Παρουσία συστηματικού σφάλματος, το σφάλμα αποδίδει το μέτρο της Ορθότητας της μεθόδου (Eurachem, 1998).

ΑΚΡΙΒΕΙΑ = ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ + ΟΡΘΟΤΗΤΑ

Είναι προφανές ότι η ορθότητα αναφέρεται στη μέθοδο και στο μέσο όρο σειράς μετρήσεων, όχι όμως σε μία μεμονωμένη μέτρηση ή προσδιορισμό. Είναι επίσης προφανές ότι εάν γίνει ικανοποιητικός αριθμός μετρήσεων/προσδιορισμών το τυχαίο σφάλμα εξαλείφεται και η ακρίβεια συμπίπτει με την ορθότητα. Είναι τέλος προφανές ότι εάν σε μία μέθοδο δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα, τότε η έννοια της ακρίβειας εκφράζεται από την πιστότητα (Eurachem Guide, 1998).

Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο (και μερικές φορές το αποκλειστικό) χαρακτηριστικό ποιότητας μίας αναλυτικής μεθόδου. Η πιστότητα εκφράζει το βαθμό της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό ρητά καθορισμένες συνθήκες (ISO GUIDE, 1997).

Ως μία παράμετρος ποιότητας της ανάλυσης, η πιστότητα μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά (dispersion) των αποτελεσμάτων, όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Δηλαδή, ως πιστότητα ορίζεται η προσέγγιση των επαναλαμβανόμενων προσδιορισμών του ιδίου δείγματος μεταξύ τους. Η διασπορά των αποτελεσμάτων μπορεί να προκληθεί από πολλές πηγές. Είναι κοινή πρακτική στην περιγραφή της πιστότητας να λαμβάνουμε υπόψη μόνο τις πηγές που προκαλούν τυχαίες διακυμάνσεις (random fluctuations) στη μεθοδολογία (ISO GUIDE, 1997).

Υποσύνολα του όρου πιστότητα είναι οι όροι:

- Επαναληψιμότητα (repeatability)
- Αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)

Ως μέτρο της πιστότητας χρησιμοποιείται η τυπική απόκλιση (SD), καθώς και η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD) ή συντελεστής μεταβλητότητας ή διακύμανσης (coefficient of variation, CV), που είναι καθαρός αριθμός:

$$\%RSD = CV = 100 * (SD/x)$$

Τα όρια αποδοχής είναι η σχετική τυπική απόκλιση ≤ 15%. Για συγκεντρώσεις κοντά στο LOQ είναι ωστόσο αποδεκτή και τιμή απόκλισης μέχρι 20% (Οδηγία AOAC).

Επαναληψιμότητα (Repeatability)

Αποτελεί μέτρο της διασποράς των τιμών επαναλαμβανόμενων διαδοχικών ανεξάρτητων μετρήσεων στο ίδιο δείγμα που εκτελούνται υπό τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα. Επαναληψιμότητα είναι λοιπόν η διαδικασία παραγωγής των ίδιων αποτελεσμάτων όταν ένα δείγμα αναλυθεί πολλές φορές με την ίδια μέθοδο υπό τις ίδιες συνθήκες ανάλυσης (Οδηγία AOAC).

Υπολογίζονται ο μέσος όρος από 6-10 πλήρεις προσδιορισμούς στο ίδιο δείγμα, η τυπική απόκλιση των επαναλήψεων και η επαναληψιμότητα εκφράζεται ως: **$\%RSD_r$ σχετική τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας**.

Όσο μικρότερη είναι η $\%RSD_r$ τόσο κοντινότερα είναι τα αποτελέσματα των επαναλαμβανόμενων προσδιορισμών. Το πείραμα επαναληψιμότητας πρέπει να γίνεται σε τρεις περιοχές συγκεντρώσεων του μετρούμενου (χαμηλή, μέση και υψηλή) εφόσον αυτό είναι εφικτό.

Είναι δυνατό να προσεγγιστεί η **θεωρητικά αναμενόμενη επαναληψιμότητα** σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης από τον τύπο $RSD_r = C^{-0.15}$, όπου η συγκέντρωση εκφράζεται ως κλάσμα μάζας (g μετρούμενου / g δείγματος). Αποδεκτές τιμές επαναληψιμότητας είναι από 0,5-2 φορές η

υπολογιζόμενη. Παρακάτω δίνεται ενδεικτικός πίνακας με υπολογισμούς θεωρητικά αναμενόμενης επαναληψιμότητας για διάφορα επίπεδα μετρούμενου (Οδηγία AOAC).

Πίνακας 3.1: Υπολογισμοί θεωρητικά αναμενόμενης επαναληψιμότητας για διάφορα επίπεδα της προσδιοριζόμενης ουσίας

C	*C (g/g)*	*PRSDr=C$^{-0,15}$*	*Min RSDr=0,5* PRSDr*	*Max RSDr=2*P RSDr*	*Μέγιστη επιτρεπόμενη %RSDr*	
1μg/kg	*1,00E-08*	*15,8*	*7,9*	*31,7*	*Μέσες max ανά δύο επίπεδα*	*Εύρος συγκεντρώσεων*
10μg/kg	*1,00E-07*	*11,2*	*5,6*	*22,4*	*27*	*1-10μg/kg*
100μg/kg	*1,00E-06*	*7,9*	*4,0*	*15,9*	*19*	*10-100μg/kg*
1000μg/kg	*1,00E-05*	*5,6*	*2,8*	*11,2*	*14*	*100μg/kg-1mg/kg*
10mg/kg	*1,00E-04*	*4,0*	*2,0*	*8,0*	*10*	*1-10mg/kg*
100mg/kg	*1,00E-03*	*2,8*	*1,4*	*5,6*	*6,8*	*10-100mg/kg*
1g/kg	*1,00E-02*	*2,0*	*1,0*	*4,0*	*4,8*	*100mg/kg-1g/kg*
10g/kg	*1,00E-01*	*1,4*	*0,7*	*2,8*	*3,4*	*1g/kg-1%*
100g/kg	*1,00E+00*	*1,0*	*0,5*	*2,0*	*2,4*	*1-10%*
1000g/kg	*1,00E+01*	*0,7*	*0,4*	*1,4*	*1,7*	*10-100%*

Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility)

Είναι το μέτρο της διασποράς των τιμών επαναλαμβανόμενων ανεξάρτητων μετρήσεων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο, στο ίδιο δείγμα κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετική μέρα/χρόνος ή διαφορετικός αναλυτής).

Για την **αναμενόμενη αναπαραγωγιμότητα** ισχύει ο τύπος $PRSD_R = 2C^{-0.15}$ (Οδηγία AOAC)

Πίνακας 3.2: Υπολογισμοί θεωρητικά αναμενόμενης αναπαραγωγιμότητας για διάφορα επίπεδα της προσδιοριζόμενης ουσίας

C	*C (g/g)*	*$PRSD_R$= 2C$^{-0,15}$*	*Εύρος συγκεντρώσεων*	*Διάμεση $PRSD_R$ 2 επιπέδων*
1μg/kg	*1,00E-09*	*45*		
10μg/kg	*1,00E-08*	*32*	*1-10μg/kg*	*38*
100μg/kg	*1,00E-07*	*22*	*10-100μg/kg*	*27*
1mg/kg	*1,00E-06*	*16*	*100μg/kg-1mg/kg*	*19*
10mg/kg	*1,00E-05*	*11*	*1-10mg/kg*	*14*
100mg/kg	*1,00E-04*	*8*	*10-100mg/kg*	*10*
1g/kg	*1,00E-03*	*6*	*100mg/kg-1g/kg*	*7*

Ορθότητα (Trueness)

Προκειμένου μια μέθοδος να δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα πρέπει αυτά να είναι εκτός από επαναλήψιμα και ορθά. Δηλαδή οι συγκεντρώσεις που προσδιορίζονται να προσεγγίζουν τις ‘‘αληθείς τιμές’’ κατά το μέγιστο δυνατό. Η ορθότητα μιας μεθόδου μπορεί να προσδιοριστεί με δύο τρόπους (Reimann et al, 2008).

Ο καλύτερος τρόπος είναι με πιστοποιημένα υλικά αναφοράς (Certified Reference Materials) για τα οποία οι τιμές στόχοι είναι γνωστές από το πιστοποιητικό τους. Υπολογίζεται από επαναλαμβανόμενες αναλύσεις του CRM η **σχετική τυπική απόκλιση σφάλματος (ή ορθότητας) %RSD$_{bias}$**. Αυτή δίνεται από τον παρακάτω τύπο (Reimann et al, 2008,):

$$\%RSD_{bias} = \sqrt{[(u_{\mu} / \sqrt{n_{\mu}}) / \mu]^2 + [(u_x / \sqrt{n_x}) / x]^2}$$

όπου:

μ : η πιστοποιημένη τιμή,

u_{μ} : η τυπική απόκλιση της πιστοποιημένης τιμής,

n_{μ} : ο αριθμός μετρήσεων της πιστοποιημένης τιμής,

x : ο μέσος όρος της μετρούμενης τιμής στο εργαστήριό μας,

u_x: η τυπική απόκλιση της μετρούμενης τιμής,

n_x : ο αριθμός επαναλήψεων της μετρούμενης τιμής.

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά της μεθόδου υπολογίζονται αφενός για να παρατεθούν ως έχουν και να μπορεί να είναι δυνατή η σύγκριση της μεθόδου με άλλες, αλλά και για να χρησιμοποιηθούν στον υπολογισμό της αβεβαιότητας.

Για την **ορθότητα** ανάλογα με το επίπεδο του μετρούμενου υπάρχει ο ακόλουθος πίνακας (Πίνακας 3.3) για τα όρια ανάκτησης. Η % ανάκτηση ορίζεται ως εξής (Οδηγία AOAC):

Μετρούμενη πειραματική περιεκτικότητα*100 / Θεωρητική περιεκτικότητα

Πίνακας 3.3: Όρια της % ανάκτησης ανάλογα με το επίπεδο του μετρούμενου

Συγκέντρωση	*Όρια % ανάκτησης*
10 μg/kg	*70-125*
1 μg/g	*75-120*
10 μg/g	*80-115*
0,01% (100mg/kg)	*85-110*
0,1%(1000mg/kg)	*90-108*
1%	*92-105*
10%	*95-102*
100%	*98-101*

Όριο ανίχνευσης (detection limit) και όριο ποσοτικοποίησης (quantitation limit)

Ο ορισμός του ορίου ανίχνευσης (Detection Limit, DL ή LOD) και του ορίου ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit, QL ή LOQ) βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα του υποβάθρου ή θορύβου (Environmental Protection Agency, 2011).

Ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού ή όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση η οποία μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια και πιστότητα, ενώ ως όριο ανίχνευσης (LOD), η ποσότητα που μπορεί να ανιχνευτεί χωρίς, όμως, να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί (Environmental Protection Agency, 2011).

Διαδικασία προσδιορισμού ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (Environmental Protection Agency, 2011):

Η εκτίμηση του ορίου ανίχνευσης μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας ένα από τα παρακάτω:

ΒΗΜΑ 1:

α) Η τιμή της συγκέντρωσης που αντιστοιχεί σε σήμα/θόρυβο στο όργανο για εύρος από 2,5 έως 5.

β) Η τιμή της συγκέντρωσης που ισοδυναμεί με την τριπλάσια τυπική απόκλιση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του αναλύτη σε εργαστηριακό νερό υψηλής καθαρότητας (reagent water).

ΒΗΜΑ 2:

α) Εάν το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (MDL) πρόκειται να προσδιοριστεί σε εργαστηριακό νερό υψηλής καθαρότητας (reagent water), πρέπει να παρασκευαστεί ένα εργαστηριακό πρότυπο (του αναλύτη στο εργαστηριακό νερό) σε συγκέντρωση που είναι τουλάχιστον ίση ή βρίσκεται στην ίδια περιοχή συγκέντρωσης με το εκτιμώμενο όριο ανίχνευσης της μεθόδου (Προτείνεται μεταξύ 1 και 5 φορές το εκτιμώμενο όριο ανίχνευσης της μεθόδου). Συνέχεια στο Βήμα 3.

β) Εάν το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (MDL) πρόκειται να καθοριστεί σε άλλη μήτρα δείγματος, πρέπει να γίνει ανάλυση του δείγματος. Αν η μετρούμενη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας βρίσκεται στο συνιστώμενο εύρος από μία έως πέντε φορές το εκτιμώμενο όριο ανίχνευσης, προχωρούμε στο Βήμα 3.

Εάν η μετρούμενη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας είναι μικρότερη από το εκτιμώμενο όριο ανίχνευσης, προστίθεται μια γνωστή ποσότητα αναλυόμενης ουσίας για να φτάσει η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας σε ένα έως πέντε φορές το εκτιμώμενο όριο ανίχνευσης. Εάν το επίπεδο μέτρησης της αναλυόμενης ουσίας είναι μεγαλύτερο από το πενταπλάσιο του εκτιμώμενου ορίου ανίχνευσης, υπάρχουν δύο επιλογές:

- Να χρησιμοποιηθεί ένα άλλο δείγμα με χαμηλότερη συγκέντρωση αναλύτη, το οποίο όμως να έχει αν είναι δυνατόν, την ίδια μήτρα.
- Το δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έχει για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου εάν το επίπεδο της αναλυόμενης ουσίας δεν υπερβαίνει τις 10 φορές το όριο

ανίχνευσης της μεθόδου στο εργαστηριακό νερό υψηλής καθαρότητας. Η διακύμανση της αναλυτικής μεθόδου αλλάζει καθώς η συγκέντρωση του αναλύτη αυξάνεται (απομακρύνεται) από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, επομένως το όριο ανίχνευσης της μεθόδου που προσδιορίζεται κάτω από αυτές τις συνθήκες μπορεί να μην αντικατοπτρίζει πραγματικά τη διακύμανση της μεθόδου σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αναλύτη.

ΒΗΜΑ 3:

Λαμβάνονται τουλάχιστον επτά υποδείγματα του δείγματος που θα χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου και για καθένα γίνεται όλη η διαδικασία επεξεργασίας και ανάλυσής του. Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται είναι τυφλά δείγματα ή δείγματα με χαμηλές συγκεντρώσεις.

Πραγματοποιούνται όλοι οι υπολογισμοί σύμφωνα με την μέθοδο. Εάν απαιτείται μέτρηση τυφλού δείγματος για τον υπολογισμό της μετρούμενης συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας, λαμβάνεται χωριστή μέτρηση τυφλού δείγματος για κάθε υποδείγμα που αναλύεται. Τα τυφλά υποβάλλονται στις πλήρεις διαδικασίες των προσδιορισμών όπως και τα δείγματα. Υπολογίζεται η **τυπική απόκλιση** των προσδιορισμών (**sd**) και το όριο ανίχνευσης **LOD** δίνεται από τον τύπο:

$$\mathbf{LOD = t_{(n-1,1-\alpha=.99)} \times sd}$$

Όπου $t_{(n-1,1-\alpha=.99)}$ είναι η τμή του t students' τεστ για επίπεδο εμπιστοσύνης 99%
Και η τυπική απόκλιση (sd) είναι υπολογισμένη για n-1 βαθμούς ελευθερίας

Πίνακας 3.4: Πίνακας τιμών t (students'test) για επίπεδο εμπιστοσύνης 99% (Environmental Protection Agency, 2011)

Αριθμός Επαναλήψεων	Βαθμοί Ελευθερίας (n-1)	$t_{(n-1,1-\alpha=.99)}$
7	6	3,143
8	7	2,998
9	8	2,896
10	9	2,821
11	10	2,764
12	11	2,695

ενώ το όριο ποσοτικοποίησης **LOQ** δίνεται από τον τύπο:

$$\mathbf{LOQ = 10 \times sd}.$$

Γενικά δεν αναφέρουμε τιμές κάτω από το LOD και αναφέρουμε με επισήμανση τιμές μεταξύ LOD και LOQ. Όταν δεν θέλουμε να αφήσουμε κενές τιμές, για εκείνες που είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης τις αντικαθιστούμε με το μισό του ορίου ανίχνευσης (Reimann et al, 2008).

Το όριο ανίχνευσης (Detection Limit, DL ή LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit, QL ή LOQ) αποτελούν τις ποσοτικοποιήσεις της ανιχνευσιμότητας (Detectability). Η ανιχνευσιμότητα

εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει /ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη (Environmental Protection Agency, 2011).

Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα αναφέρεται στη γραμμική εξάρτηση της μετρούμενης ιδιότητας από τη συγκέντρωση και ελέγχεται με πρότυπα διαλύματα σε 6-8 επίπεδα συγκέντρωσης ενώ εκφράζεται με το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης (correlation coefficient r) ή το συντελεστή προσδιορισμού (coefficient of determination, r^2), οι οποίοι πρέπει να προσεγγίζουν τη μονάδα (Papadoyannis I.N. and Samanidou V.F., 2004). .

Εξετάζεται σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων (range) της αναλυτικής μεθόδου. Αποδεικνύεται με οπτική εξέταση του διαγράμματος αναλυτικό σήμα ως προς συγκέντρωση ή περιεκτικότητα του αναλύτη. Αξιολογείται με στατιστικές μεθόδους (ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων, least squares regression analysis) και υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης (Papadoyannis I.N. and Samanidou V.F., 2004). .

Ο συντελεστής συσχετίσεως (correlation coefficient), η τομή στον άξονα των y (y-intercept), η κλίση (slope) της ευθείας παλινδρόμησης και η τυπική απόκλιση των υπολοίπων (Sy/x) (τυπικό σφάλμα) υπολογίζονται για την μέθοδο.

Y = a (± Sa) +b (±Sb) X, r =……., Sy/x=……

Πορεία Ελέγχου Γραμμικότητας

Παρασκευάζεται περιοχή προτύπων, τουλάχιστον 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναλύτη, κατανεμημένων περίπου ομοιόμορφα και που καλύπτουν τουλάχιστον 50 – 150% την αναμενόμενη περιοχή εργασίας (Shah et al, 1992).

- Εκτελούνται τουλάχιστον 6 επαναλαμβανόμενες μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση.
- Τα πρότυπα παρασκευάζονται αν είναι δυνατόν στο ίδιο μητρικό υλικό με τα δείγματα.
- Τα πρότυπα αναλύονται με την αξιολογούμενη μέθοδο.
- Υπολογίζεται ο μέσος όρος (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD), και η σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD) για κάθε συγκέντρωση.
- Γίνεται το διάγραμμα (plot) μέσης απόκρισης (mean response) (y-άξονας) ως προς τη συγκέντρωση (x-άξονας). Υπολογίζεται η εξίσωση παλινδρόμησης (regression equation) (Y = a + b X), ο συντελεστής προσδιορισμού (coefficient of determination) r^2 και ο συντελεστής συσχέτισης (r).

Το διάγραμμα απόκριση – συγκέντρωση πρέπει να είναι ευθεία γραμμή με συντελεστή προσδιορισμού r^2>0,98 (προτιμάται 0,99 αλλά και 0,98 είναι αποδεκτό εξαρτώμενο από τις ανάγκες της μεθόδου) (Κουππάρης, 2015)

Ανθεκτικότητα (Ruggedness) **– Αντοχή** (Robustness)

Η ανθεκτικότητα της μεθόδου (Ruggedness) είναι μέτρο της ικανότητας της μεθόδου να παραμένει σταθερή και ανεπηρέαστη σε μικρές, αλλά σκόπιμες μεταβολές των λειτουργικών παραμέτρων, ενώ η αντοχή (Robustness) της μεθόδου αναφέρεται σε τυχαίες, μη σκόπιμες μεταβολές των παραμέτρων. Στην πράξη, οι δύο αυτοί όροι είναι αλληλένδετοι και πολλές φορές υπάρχει σύγχυση στη χρήση τους (Papadoyannis I.N. and Samanidou V.F., 2004).

Για να ελεγχθεί η ανθεκτικότητα της μεθόδου γίνεται πειραματικός σχεδιασμός ώστε να μελετηθούν διάφορες μεταβολές των πειραματικών παραμέτρων και εντοπίζονται ποιες από αυτές επηρεάζουν τη μέθοδο ώστε να τεθούν αυστηρές ανοχές και μέτρα ελέγχου τους. Από τα αποτελέσματα της ανθεκτικότητας θα διαμορφωθούν και οι έλεγχοι καταλληλότητας συστήματος για να εξασφαλισθεί η αξιοπιστία της μεθόδου κατά την εφαρμογή της (Κουππάρης, 2015).

Τυπικές μεταβολές παραμέτρων που μπορεί να επηράσουν την μέθοδο είναι:

- Σταθερότητα αναλυτικών διαλυμάτων

- Διαφορετικά όργανα

- Διαφορετικοί αναλυτές

Η ανθεκτικότητα δείχνει αξιοπιστία και συνέπεια (reliability) μιας ανάλυσης σε σχέση με προσχεδιασμένες μεταβολές ήσσονος σημασίας στις πειραματικής παραμέτρους της μεθόδου. Αποδεικνύει δηλαδή ότι δεν υπάρχουν διαφορές που να οφείλονται στην εμπειρία του αναλυτή, σε αντιδραστήρια και αναλώσιμα από διαφορετικούς προμηθευτές, και στις περιβαλλοντικές συνθήκες του εργαστηρίου. Για την αξιολόγηση μιας μεθόδου ως προς την ανθεκτικότητα της υπολογίζονται οι αντοχές της κατά τη μικρή μεταβολή των πειραματικών παραμέτρων, μέσω σύγκρισης μετρήσεων πριν την επιβολή των μεταβολών και μετά την επιβολή των μεταβολών (Taylor et al, 2002).

Αβεβαιότητα

Η αβεβαιότητα (Uncertainty) είναι σχετικά καινούριος όρος (μέσα δεκαετίας 1990) και ορίζεται ως το διάστημα για το αποτέλεσμα μέτρησης, το οποίο αναμένεται να περικλείει ένα μεγάλο ποσοστό της κατανομής των τιμών που μπορούν εύλογα να αποδοθούν στο μετρούμενο συστατικό (Reimann, 2008). Αβεβαιότητα είναι λοιπόν η απόκλιση του αποτελέσματος που παράγει το εργαστήριο από την πραγματική τιμή για ένα συγκεκριμένο δείγμα και εκφράζει την διασπορά των τιμών (De Bièvre, 2010, Eurachem/CITAC Guide CG4, 2000).

Η αβεβαιότητα της μέτρησης δεν πρέπει να συγχέεται με την έννοια του σφάλματος (error). Το σφάλμα είναι η διαφορά της μετρούμενης τιμής από την αληθινή τιμή, ενώ η αβεβαιότητα περιγράφει το εύρος των τιμών της μετρούμενης παραμέτρου (η αβεβαιότητα αναφέρεται στη διασπορά των τιμών γύρω από την αληθή τιμή). Το σφάλμα μπορεί να υπολογισθεί και να διορθωθεί. Ένα διορθωμένο αποτέλεσμα στερείται σφάλματος, αλλά η αβεβαιότητά του δεν εξαλείφεται.

Οι απαιτήσεις του προτύπου ISO 17025 για την αβεβαιότητα είναι (ISO Guide 98-3, 2008):

5.4.6.2: Τα Εργαστήρια δοκιμών πρέπει να έχουν και πρέπει να εφαρμόζουν διαδικασία για τον υπολογισμό αβεβαιότητας των μετρήσεων.

5.4.6.3: Κατά τον υπολογισμό της αβεβαιότητας της μέτρησης, όλες οι συνιστώσες της αβεβαιότητας που είναι σημαντικές για τη δεδομένη κατάσταση, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη χρησιμοποιώντας κατάλληλες μεθόδους ανάλυσης.

Η αβεβαιότητα μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες όπως η ομοιογένεια του δείγματος, την προκατεργασία του δείγματος, το σφάλμα ογκομέτρησης, το σφάλμα ζύγισης, τη βαθμονόμηση, την ανάλυση των CRMs, την τελική μέτρηση, την επεξεργασία αποτελεσμάτων κλπ. Ο όρος «αβεβαιότητα» αφορά τόσο την ίδια τη μέτρηση, όσο και την αναλυτική μέθοδο. Ο υπολογισμός της αβεβαιότητας είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την διαπίστευση και αφορά όλες τις ποσοτικές μετρήσεις και όχι τις ποιοτικές (ISO Guide 98-3, 2008, , Eurachem/CITAC Guide CG4, 2000).

Η αβεβαιότητα μέτρησης, μαθηματικά, μοιάζει με την τυπική απόκλιση διαφέρει όμως από αυτή στο ότι κατά τον υπολογισμό της δεν συμπεριλαμβάνονται μόνο τιμές επαναληπτικών μετρήσεων αλλά και μετρήσεις που προέρχονται από πιστοποιητικά διακριβώσεων, εμπειρικές μετρήσεις κ.α.

Υπάρχουν δύο τύποι αβεβαιότητας (ISO Guide 98-3, 2008):

Αβεβαιότητα τύπου Α. Εκτιμάται με σειρά επαναλαμβανομένων μετρήσεων με στατιστικές μεθόδους. Αφορά την πιστότητα και την ανάκτηση.

Αβεβαιότητα τύπου Β. Εκτιμάται με άλλες μεθόδους εκτός στατιστικής όπως πιστοποιητικά διακριβώσεων, με εμπειρικές μετρήσεις κ.α. Στη κλινική χημεία αφορά κυρίως την αβεβαιότητα των βαθμονομητών και των πιπεττών.

Η αβεβαιότητα συμβολίζεται ως U και όπως θα δούμε παρακάτω υπάρχουν πολλές διαφορετικές μορφές της. Τα πειράματα (αβεβαιότητα τύπου Α) και τα πιστοποιητικά υπολογίζουν την λεγόμενη τυπική αβεβαιότητα η οποία έχει την ίδιες μονάδες μέτρησης με τις μετρήσεις και αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο τιμών. Για τον υπολογισμό της ολικής αβεβαιότητας χρειάζεται όμως να εξαλειφθούν οι μονάδες μέτρησης καθώς επίσης αυτή να είναι ανεξάρτητη από το επίπεδο τιμών των μετρήσεων. Για τον λόγο αυτό η τυπική αβεβαιότητα μετατρέπεται σε σχετική αβεβαιότητα. Το άθροισμα των σχετικών αβεβαιοτήτων είναι η συνδυασμένη αβεβαιότητα. Αυτή όμως που τελικά λαμβάνεται υπόψη είναι η διευρυμένη αβεβαιότητα η οποία υπολογίζεται στο τέλος αυτής της αλυσίδας υπολογισμών και ισούνται συνήθως με το διπλάσιο της συνδυασμένης αβεβαιότητας (ISO Guide 98-3, 2008).

Για την ποσοτικοποίηση της αβεβαιότητας σε μια αναλυτική μέθοδο συνυπολογίζονται δεδομένα – πηγές αβεβαιότητας. Τα δεδομένα τύπου Α είναι στατιστικά στοιχεία από επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, πχ σχετική τυπική απόκλιση (ή αβεβαιότητα) επαναληψιμότητας ή αναπαραγωγιμότητας, σχετική τυπική αβεβαιότητα ορθότητας, σχετική τυπική αβεβαιότητα στη μετρούμενη συγκέντρωση λόγω καμπύλης βαθμονόμησης. Τα δεδομένα τύπου Β είναι συνεισφορές αβεβαιότητας από διακριβώσεις εξοπλισμού (πχ. αβεβαιότητα ζυγού και ογκομετρικών συσκευών κλπ.). Οι σχετικές τυπικές αβεβαιότητες ελέγχονται και υπολογίζεται σε κάθε περίπτωση το 1/5 της μεγαλύτερης συνιστώσας. Συνιστώσες όπου η σχετική τυπική αβεβαιότητα είναι μικρότερη από το 1/5 της μέγιστης δεν συμπεριλαμβάνονται στο ισοζύγιο αβεβαιότητας (ISO Guide 98-3, 2008).

Οι σχετικές τυπικές αβεβαιότητες των συνιστωσών που συμμετέχουν συνδυάζονται με βάση τον παρακάτω τύπο και υπολογίζεται η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα (Eurachem/CITAC Guide CG4, 2000:

$$u_{συνδ.σχετ.τυπική} = \sqrt{\sum_{i}^{n} (\frac{u_{xi}}{x_i})^2}$$

Η % διευρυμένη αβεβαιότητα δίνεται από τον τύπο:

$$\%U = 2*100* u_{συνδ.σχετ.τυπική}$$

Όπου 2 είναι ο συντελεστής κάλυψης για κανονική κατανομή και επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Σημειώνεται ότι ο συντελεστής κάλυψης επιλέγεται ανάλογα με τη χρήση των αποτελεσμάτων της μέτρησης. Στις περιβαλλοντικές έρευνες, το επίπεδο εμπιστοσύνης 95% θεωρείται ικανοποιητικό οπότε ο συντελεστής επιλέγεται ίσος με 2. Ο συντελεστής μπορεί να είναι ίσος με 3 για επίπεδο εμπιστοσύνης 99%

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

4.1 Μέθοδος ηλεκτροδίων

Τα Εκλεκτικά Ηλεκτρόδια Ιόντων (Ε.Η.Ι) είναι χημικοί αισθητήρες που μπορούν να προσδιορίζουν την ενεργότητα ενός συγκεκριμένου ιόντος σε υδατικά διαλύματα. Πιο συγκεκριμένα μετατρέπουν την ενεργότητα του διαλυμένου ιόντος-αναλύτη σε ηλεκτρικό δυναμικό, το οποίο μπορεί να μετρηθεί με ένα βολτόμετρο ή πεχάμετρο. Το αισθητήριο τμήμα του ΕΗΙ είναι συνήθως μία λεπτή, πορώδης, λιπόφιλη πολυμερική μεμβράνη επιλεκτική ως προς το ιόν-αναλύτη.

Τα νιτρικά ιόντα προσδιορίζονται ποτενσιομετρικά, χρησιμοποιώντας εκλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων στερεάς επαφής (ΕΗΙ) σε σύνδεση με ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl διπλής γέφυρας και ένα ηλεκτρόμετρο υψηλής εμπέδησης (R > 1012 Ω) (Εικόνα 4.1). Το ηλεκτρόδιο είναι κατάλληλο για μετρήσεις σε επίπεδα NO_3^- από 0,14 ως 1.400 mgNO_3^- - N/L (Geniatakis et al, 2003).

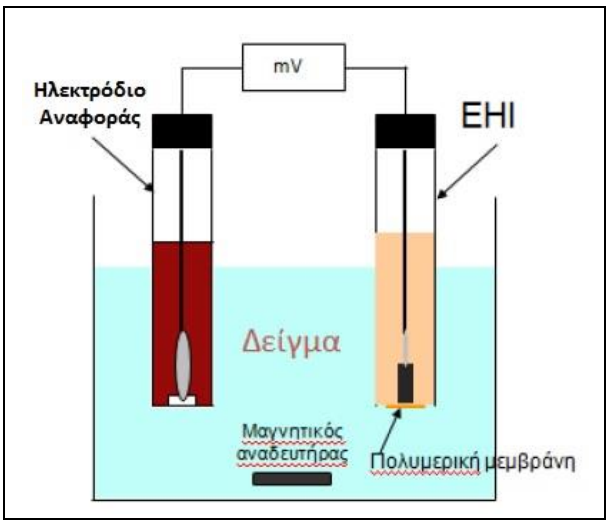
Οι παρεμποδίσεις από άλλα ιόντα (κυρίως Cl^-, HCO_3^-, NO_2^-), αντιμετωπίζονται επιτυχώς με τη προσθήκη στα εξεταζόμενα δείγματα κατάλληλων διαλυμάτων ρύθμισης της ιονικής ισχύος (Ion Strength Adjustor, ISA), προκειμένου να διατηρηθεί σταθερή η σχέση ανάμεσα στην ενεργότητα και στη συγκέντρωση του ιόντος κατά τη διάρκεια των μετρήσεων (Geniatakis et al, 2003).

Τα βασικά πλεονεκτήματα της χρήσης ηλεκτροδίων για τον προσδιορισμό των νιτρικών ιόντων είναι (Geniatakis et al, 2003):

- Η απλότητα και ο μικρός αριθμός των σταδίων προετοιμασίας του δείγματος.
- Η ταχύτητα της ανάλυσης.
- Χρησιμοποιούνται απλά και οικονομικά αντιδραστήρια.
- Σχετικά εύκολη αντιμετώπιση των παρεμποδίσεων από διάφορα ιόντα που υπάρχουν σε νερά, φυτικούς ιστούς και εδάφη, όπως Cl^-, NO_2^-, HCO_3^-, οργανική ύλη, με προσθήκη κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων, τα οποία παίζουν παράλληλα το ρόλο του ρυθμιστή της ιονικής ισχύος (ISA).
- Η μέθοδος δεν επηρεάζεται από έγχρωμα ή θολά διαλύματα.
- Είναι μη καταστρεπτική μέθοδος ανάλυσης.
- Μικρό σχετικά κόστος των ηλεκτροδίων, ενώ υπάρχει η δυνατότητα ελαχιστοποίησης του μεγέθους τους.
- Απλή και προσιτή οργανολογία.
- Δυνατότητα αυτοματοποίησης για τη συνεχή παρακολούθηση δειγμάτων συνεχούς ροής σε βιομηχανικές και κλινικές εφαρμογές.

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι (Geniatakis et al, 2003):

- Η μικρή αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων που δεν είναι καλύτερη από 1%. Απόκλιση 1 mV στη μέτρηση του δυναμικού ισοδυναμεί με 4% απόκλιση στον υπολογισμό της ενεργότητας των NO_3^-.
- σχετικά μικρός χρόνος ζωής των εμπορικά διαθεσίμων αισθητήρων.



Εικόνα 4.1: Εκλεκτικό ηλεκτρόδιο νιτρικών

4.2 Ιοντική χρωματογραφία

Ένα δείγμα νερού εγχύεται σε ένα ρεύμα διαλύματος ανθρακικών-όξινων ανθρακικών και περνά μέσα από μια σειρά από ιονανταλλάκτες. Τα ιόντα που μας ενδιαφέρουν διαχωρίζονται με βάση τη σχετική τους συγγένεια ως προς ένα ισχυρά βασικό ανιονανταλλακτικό υλικό. Τα διαχωρισμένα ανιόντα κατευθύνονται σε μια κατιονανταλλακτική μεμβράνη βυθισμένη σε ισχυρά όξινο υγρό. Εκεί μετατρέπονται στην περισσότερη αγώγιμη όξινη μορφή τους και με τη μορφή αυτή μετριούνται μέσω της αγωγιμότητας. Ταυτοποιούνται με βάση το χρόνο κατακράτησης και σύγκριση με πρότυπα διαλύματα που περιέχουν τα ανιόντα ενδιαφέροντος και η ποσοτικοποίηση γίνεται με μέτρηση ύψους ή εμβαδού της κορυφής που παράγουν στο χρωματογράφημα. Δεν εφαρμόζεται σε θαλασσινό νερό.

4.3 Μέθοδος Υπεριώδους Φασματοφωτομετρίας απευθείας

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται μόνο για την εξέταση δειγμάτων που έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανική ύλη, δηλαδή, μη ρυπασμένα φυσικά ύδατα και πόσιμο νερό. Βασίζεται στην αρχή ότι τα νιτρικά απορροφούν έντονα το υπεριώδες (UV) φως. Η καμπύλη βαθμονόμησης του NO_3^- ακολουθεί το νόμο του Beer μέχρι και 11mg N/L.Η μέτρηση της απορρόφησης της UV στα 220 nm επιτρέπει τον προσδιορισμό των NO_3^-, τα οποία παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Για την άρση των παρεμποδίσεων εκτός από τη μέτρηση της απορρόφησης στα 220 nm γίνεται και μέτρηση της απορρόφησης στα 275 nm. Η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωση νιτρικών επειδή τα νιτρικά ιόντα δεν απορροφούν στα 275 nm. Η οργανική ουσία όμως, που μπορεί να υπάρχει στο δείγμα, καθώς και άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες, όπως ενώσεις του σιδήρου, απορροφούν και σε αυτό το μήκος κύματος και έτσι η μέτρηση της απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας σε αυτό το μήκος κύματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διόρθωση των μετρήσεων.

Η έκταση αυτής της εμπειρικής διόρθωσης σχετίζεται με τη φύση και τη συγκέντρωση της οργανικής ύλης και μπορεί να διαφέρει ανάμεσα στα δείγματα. Κατά συνέπεια, η μέθοδος αυτή δεν συνίσταται εάν απαιτείται σημαντική διόρθωση για την απορρόφηση της οργανικής ύλης και μπορεί να είναι χρήσιμη στην παρακολούθηση των επιπέδων NO_3^- εντός ενός σώματος νερού με σταθερό τύπο οργανικής ύλης. Συντελεστές διόρθωσης για την απορρόφηση της οργανικής ύλης μπορεί να καθοριστούν με τη μέθοδο των γνωστών προσθηκών.

4.4 Φασματοφωτομετρική μέθοδος με σχηματισμό συμπλόκου - Συμβατική μέθοδος με αναγωγή νιτρικών με στήλη καδμίου (Cd)

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού των νιτρικών ιόντων σε υδατικά δείγματα στηρίζεται στην αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε νιτρώδη και μέτρηση της συγκέντρωσής τους φασματοφωτομετρικά μέσω της μεθόδου προσδιορισμού των νιτρωδών η οποία βασίζεται στην ιδιότητά τους να σχηματίζουν έγχρωμα συμπλόκα (διαζωνιακά άλατα) με αρωματικές αμίνες (Hansen and Koroleff, 1999).

Η αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε νιτρώδη πραγματοποιείται με την διέλευση του δείγματος που περιέχει νιτρικά ιόντα μέσα από στήλη με κόκκους καδμίου επικαλυμμένους με θειικό χαλκό. Τα νιτρικά ιόντα μετατρέπονται ποσοτικά σε νιτρώδη.

Το κάδμιο αντιδρά πολύ αργά με τα νιτρικά ιόντα, μετατρέποντάς τα σε νιτρώδη. Για να πραγματοποιηθεί πιο γρήγορα η αντίδραση, οι κόκκοι καδμίου καλύπτονται πιο πριν από χαλκό, οποίος δημιουργεί την κατάλληλη επιφάνεια ώστε να γίνει η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ στερεού και διαλύματος (Merino et al, 2000).

Οι αντιδράσεις οι οποίες πραγματοποιούνται είναι οι εξής:

$$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$$

Το δυναμικό της αντίδρασης είναι E_0 = 0,015 V σε pH = 7 έως αλκαλικό.

Τα ηλεκτρόνια προέρχονται από την οξείδωση του καδμίου:

$Cd \rightarrow Cd^{2+} + 2e^-$ και E_0 = -0,040 V

Το κάδμιο χρησιμοποιείται σαν επιχαλκωμένο κάδμιο:

$Cd^0 + NO_3^- + 2H^+ \rightarrow Cd^{2+} + NO_2^- + H_2O$ ΔE=-0,385 V

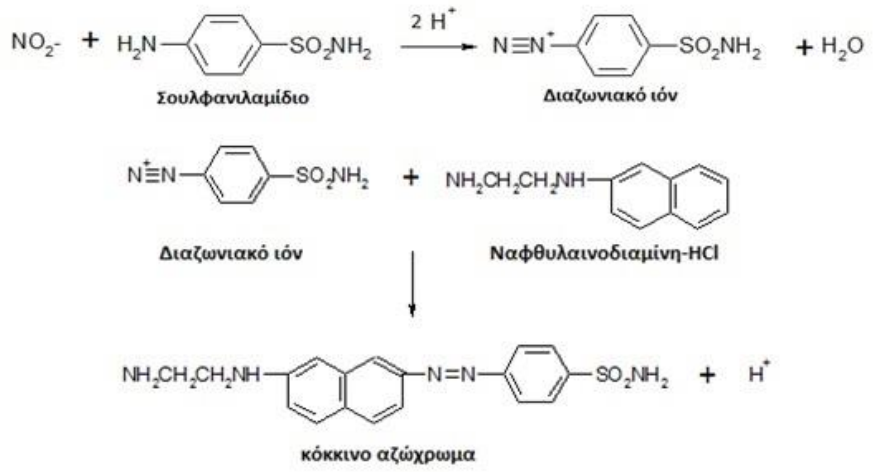
Η ρύθμιση του pH στα απαιτούμενα όρια για την πραγματοποίηση της αναγωγής, γίνεται με την προσθήκη χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl)

$2NH_4^+ \rightarrow 2NH_3 + 2H^+$

Τα ιόντα καδμίου απομακρύνονται με συμπλοκοποίηση, χρησιμοποιώντας NH_4Cl.

$Cd^{++} + 2NH_3 \rightarrow [Cd(NH_3)_2]^{++}$

Στη συνέχεια, τα νιτρώδη ιόντα αντιδρούν με τα διαζωνιακά άλατα και προκύπτουν έντονα αζωχρώματα, η συγκέντρωση των οποίων μετριέται φασματομετρικά στα 540-550nm. Στο δείγμα (που περιέχει τα νιτρώδη ιόντα πια), προστίθεται διάλυμα σουλφανιλαμιδίου. Παράγεται το διαζωνιακό ιόν, το οποίο στη συνέχεια ενώνεται με την υδροχλωρική ναφθυλαιθυλενοδιαμίνη (σε pH 2-2,5), οπότε σχηματίζεται κόκκινο αζώχρωμα, όπως φαίνεται από τις παρακάτω αντιδράσεις.



Πρότυπα διαλύματα NO_3^- διαβιβάζονται και αυτά από τη στήλη καδμίου. Από τις απορροφήσεις των προτύπων κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς (γραμμική εξίσωση) και από την απορρόφηση των δειγμάτων μέσω της καμπύλης προσδιορίζεται το άθροισμα των συγκεντρώσεων των νιτρικών και των νιτρωδών. Έτσι, αν από το άθροισμα αυτό αφαιρέσουμε τη συγκέντρωση των νιτρωδών, υπολογίζουμε τελικά τη συγκέντρωση των νιτρικών στα δείγματα.

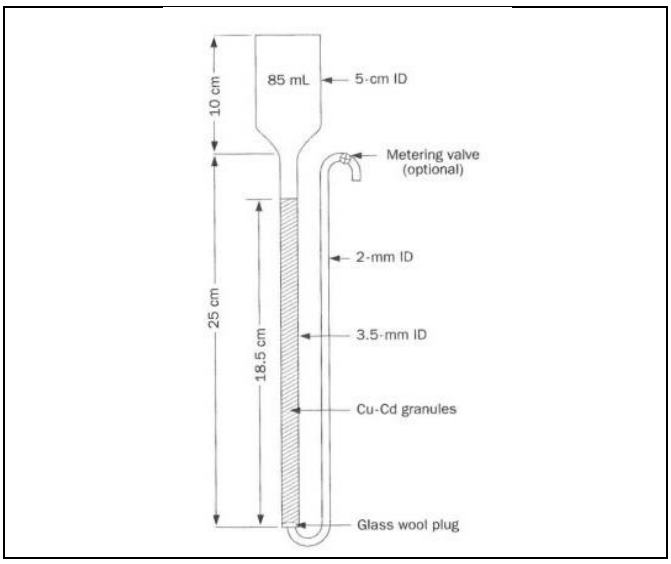
Η δυσκολία της μεθόδου συνίσταται στην ποσοτική αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε νιτρώδη. Η αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη γίνεται σε διάφορα δυναμικά οξειδοαναγωγής τα οποία εξαρτώνται έντονα από το pH. Πρέπει να επιλέξουμε το κατάλληλο αναγωγικό ώστε να αποφύγουμε περαιτέρω οξείδωση των νιτρικών προς NO οπότε να έχουμε αρνητικό σφάλμα.

Σε λίγο πιο όξινο pH πραγματοποιείται η εξής αντίδραση:

$$NO_2^- + 2H^+ + e^- \rightarrow NO + H_2O$$

Σε pH κοντά στο 7 η ημιαντίδραση αναγωγής είναι η εξής:

$$NO_3^- + H_2O + 2e^- \rightarrow NO_2^- + 2OH^- E_o = +0.015V$$



Εικόνα 4.2: Γυάλινη στήλη με μεταλλικό κάδμιο

4.4.1 Πορεία προσδιορισμού με στήλη Cd

α) Διαδικασία παρασκευής αναγωγικής στήλης: Στο εσωτερικό της βάσης προχοϊδας των 50 ml ή κατάλληλης γυάλινης στήλης με δοχείο πλήρωσης, τοποθετούμε λίγο υαλοβάμβακα. Ακολούθως γεμίζουμε την προχοϊδα με ρινίσματα Cd και διαβιβάζουμε σε αυτή διάλυμα $CuSO_4$. Κλείνουμε τη στρόφιγγα της προχοϊδας και αφήνουμε το διάλυμα $CuSO_4$ να παραμείνει για μια ώρα. Ακολούθως αδειάζουμε τη στήλη.

β) Διαδικασία έκλουσης δειγμάτων Σε 50 ml δείγμα προστίθεται 1 ml διαλύματος NH_4Cl. Το προκύπτον διαβιβάζεται στην αναγωγική στήλη καδμίου με ροή 1 σταγόνα ανά δευτερόλεπτο. Τα πρώτα 2 – 3 ml απορρίπτονται. Τα επόμενα 12 – 15 ml χρησιμοποιούνται για να ξεπλυθεί το σκεύος παραλαβής του διαλύματος. Ακολούθως συλλέγονται συνολικά 20 ml δείγματος στα οποίο προσδιορίζονται τα νιτρώδη που έχουν σχηματιστεί (συμπεριλαμβανομένων και των προϋπαρχόντων).

γ) Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml προστίθεται το εκλουσμένο δείγμα από τη στήλη καδμίου. Στη συνέχεια προστίθενται 2ml διαλύματος σουλφανιλαμιδίου, αναταράσουμε τη φιάλη και αναμένουμε 5 λεπτά ώστε να συμπληρωθεί η πρώτη αντίδραση. Ακολούθως προστίθενται 2 ml διυδροχλωρικής ναφθυλαιθυλενοδιαμίνης, συμπληρώνονται με απεσταγμένο νερό μέχρι τη χαραγή και αναμένουμε 10-20 λεπτά μέχρι να επιτευχθεί πλήρης ανάπτυξη του χρώματος. Τέλος, μετράμε τη διαπερατότητα του διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος 543 nm.

Στο εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος χρησιμοποιούταν μέχρι πρότινος η μέθοδος αυτή με μέτρηση της μοριακής απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-Vis Carry-1E.



Εικόνα 4.3: Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-VisCarry-1E

4.4.2 Προβλήματα με τη μεθοδολογία της στήλης Cd

Μειονεκτήματα της χρήσης στήλης καδμίου είναι η πιθανή τοξικότητα του μετάλλου αυτού και οι διακυμάνσεις στην απόδοση της αντίδρασης αναγωγής ανάλογα με τον αριθμό και τη φύση των δειγμάτων που διέρχονται από τη στήλη. Επίσης η διαθεσιμότητα αυτόματου αναλυτή δεν είναι ιδιαίτερα εύκολη λόγω αυξημένου κόστους αγοράς. Η κατασκευή ή αναγέννηση στήλης καδμίου για αυτόματο αναλυτή είναι ιδιαίτερα επίπονη και απαιτεί προσοχή λόγω της τοξικότητας του καδμίου, ενώ η αγορά έτοιμων προς χρήση στηλών είναι αρκετά ακριβή και υπάρχει και το πρόβλημα διάθεσής τους μετά τη χρήση γιατί είναι τοξικό απόβλητο. Για το χειρισμό του καδμίου για την πλήρωση γυάλινης στήλης είναι απολύτως απαραίτητη η χρήση προστατευτικών γαντιών και πρέπει

να γίνεται στον απαγωγό αερίων. Τέλος είναι σημαντικές οι δυσκολίες για την ανάλυση μικρών όγκων (πχ. νερό πόρων από θαλάσσια ιζήματα) και γιατί η παρουσία υδρόθειου ή αυξημένης οργανικής ύλης (χουμικά) μπορεί να προκαλεί μειωμένη απόδοση της αναγωγής στη στήλη αλλά και γιατί συχνά η ποσότητα δείγματος δεν επαρκεί για την κλασσική γυάλινη στήλη και απαιτείται εφαρμογή εναλλακτικής μεθόδου προσδιορισμού (Hansen and Koroleff, 1999).

4.5 Εναλλακτική μέθοδος αναγωγής νιτρικών με VCl_3

4.5.1 Αρχή μεθόδου

Πρόσφατα, για την αναγωγή των NO_3^- σε NO_2^- έχει προταθεί ως μία κατάλληλη μέθοδος η χρήση του βαναδίου (III). Ειδικότερα όξινο διάλυμα χλωριούχου βαναδίου χρησιμοποιείται για την αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε νιτρώδη αποφεύγοντας την χρήση της στήλης καδμίου και την τοξικότητα του μετάλλου. Τόσο τα ήδη υπάρχοντα νιτρώδη στο δείγμα όσο και αυτά που παράγονται κατά την αναγωγή μετρώνται από την γνωστή αντίδραση Griess (με σουλφανιλαμίδιο και ναφθυλ-αιθυλένο-διαμίνη). Η διαδικασία είναι εύκολη γατί μπορεί να γίνει με ένα μόνο μικτό αντιδραστήριο που προστίθεται στο δείγμα. Η μέθοδος απαιτεί μόνο ένα φασματοφωτόμετρο καθώς πρέπει να μετρηθεί η απορρόφηση των δειγμάτων στα 540nm και από τη σχετική βιβλιογραφία παρουσιάζεται απλή με μικρή επίδραση από σφάλματα (Doane and Horwath, 2003).

Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των νιτρικών ιόντων σε αρκετούς τύπους δειγμάτων, όπως αγροτικές απορροές, τεχνητό θαλασσινό νερό, υδατικά απόβλητα, στραγγίσματα υγροτόπων, δείγματα ορού γάλακτος και ούρων (Miranda et al, 2001)

Σύμφωνα με τους Beda and Nedospasov (2005) η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι:

$$NO_3^- + 2H^+ + 2V^{3+} \rightarrow NO_2^- + 2V^{4+} + H_2O$$

Και αυτή η μέθοδος αναγωγής μπορεί να έχει κάποια προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν ώστε τα αποτελέσματα που παράγονται να είναι αξιόπιστα. Δείγματα τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις φωσφορικών, θειικών ή διαλυτής οργανικής ύλης (πάνω από 100 ppm), μπορεί να μειώσουν την απόδοση της αντίδρασης αναγωγής των νιτρικών σε νιτρώδη με τη χρήση χλωριούχου βαναδίου, όταν οι συγκεντρώσεις των νιτρικών είναι χαμηλότερες από 0,05 ppm N. Αυτό το πρόβλημα λύνεται απλώς χρησιμοποιώντας περισσότερο όγκο αντιδραστηρίου (χλωριούχο βανάδιο, σουλφανιλαμίδιο και ναφθυλ-αιθυλένο-διαμίνη, μικτό αντιδραστήριο) (Miranda et al, 2001).

Επίσης, παρεμποδίσεις μπορούν να προκληθούν από φυσικώς χρωματισμένα δείγματα ή θολά δείγματα. Αυτές μπορούν να διορθωθούν ή να εξαλειφθούν με απλές μεθόδους (διήθηση ή μέτρηση σε διαφορετικό μήκος κύματος) (Miranda et al, 2001).

4.5.2 Προσδιορισμός νιτρικών ιόντων σε εδαφικά δείγματα

Ο προσδιορισμός του ανόργανου αζώτου (N), των αμμωνιακών (NH_4^+), των νιτρωδών (NO_2^-) και των νιτρικών ιόντων (NO_3^-) σε εκχυλίσματα εδάφους αποτελεί μια πολύ συνηθισμένη ανάλυση για την

αξιολόγηση της γονιμότητας του εδάφους, ιδιαίτερα όταν τα εδάφη υποβάλλονται σε αζωτο-λίπανση με οργανικής ή ανόργανης φύσης άζωτο.

Το ανόργανο Ν στα εδάφη βρίσκεται κατά κύριο λόγο με τις μορφές NO_3^- και NH_4^+. Τα νιτρώδη σπάνια υπάρχουν σε επίπεδα σχεδόν ανιχνεύσιμα στα δείγματα και ο προσδιορισμός τους συνήθως δεν κρίνεται απαραίτητος εκτός από τα ουδέτερα έως αλκαλικά εδάφη τα οποία λιπαίνονται (Keeney and Nelson 1982).

Τα νιτρικά ιόντα είναι υδατοδιαλυτά και ένα πλήθος διαλυμάτων, συμπεριλαμβανομένου και του νερού, έχουν χρησιμοποιηθεί ως εκχυλιστικά μέσα. Τέτοια είναι: κορεσμένο διάλυμα (0,35%) $CaSO_4$*$2H_20$ με 0,03 M NH_4F και 0,015 M H_2SO_4, διάλυμα 0,01 M $CaCl_2$, διάλυμα 0,5 M $NaHCO_3$ pH=8.5, διάλυμα 0,01 M $CuSO_4$, διάλυμα 0,01 M $CuSO_4$ που περιέχει Ag_2SO_4, και διάλυμα 1,0 M ή 2,0 M KCl (Soltanpour and Workman 1981, Keeney and Nelson 1982, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food 1986, Blakemore et al. 1987, Houba et al. 1988, Laverty and Bollo-Kamara 1988). Το πιο διαδεδομένο και ευρέως χρησιμοποιούμενο εκχυλιστικό μέσο για τα νιτρικά (αλλά και τα αμμωνιακά ιόντα) σε εδαφικά δείγματα είναι το 1,0 M KCl (Keeney and Nelson 1982, Maynard et al., 2008).

Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες μέθοδοι προσδιορισμού αυτών των ιόντων σε υδατικά εκχυλίσματα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου προσδιορισμού του Ν θα εξαρτηθεί από διάφορους παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα εξοπλισμού, τα αντιδραστήρια, το κόστος, ο χρόνος, η ευαισθησία και η ακρίβεια που επιθυμούμε, την ποσότητα των δειγμάτων και τη συχνότητα με την οποία θέλουμε να πραγματοποιούμε τις μετρήσεις (Mulvaney 1996).

4.5.3 Εκχύλιση NO_3-N από εδαφικά δείγματα

Για να προσδιοριστούν τα νιτρικά ιόντα σε εδαφικά δείγματα πρέπει αρχικά να υποστούν κατάλληλες διαδιακασίες προκατεργασίας, όπως ξήρανση (σε φούρνο ή ρεύμα αέρα) για να απομακρυνθεί η υγρασία και κοσκίνιση (σε κόσκινα διαμέτρου οπών από κάποια mm έως αρκετά μm, ανάλογα με την μέθοδο που θέλουμε να ακολουθήσουμε) και έπειτα να ακολουθήσει η διαδικασία της εκχύλισης με κατάλληλο εκχυλιστικό μέσο.

Για να αποφασιστεί η κατάλληλη διαδικασία ξήρανσης πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η ξήρανση σε ρεύμα αέρα μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλες αλλαγές στη συγκέντρωση των νιτρικών. Η πραγματοποίηση της εκχύλισης αμέσως μετά τη δειγματοληψία, όπου το έδαφος εσωκλείει την υγρασία του, είναι η ιδανική κατάσταση, ωστόσο, αυτό μπορεί να προκαλέσει προβλήματα όσον αφορά την αποθήκευση και την απόκτηση αντιπροσωπευτικού υποδείγματος.

Η χρήση υγρών εδαφών θα προτιμάται σε δείγματα που σχετίζονται με βιολογικές μελέτες (Haynes και Swift 1989). Για τις υπόλοιπες αναλύσεις, χρησιμοποιούνται τα εδαφικά δείγματα που στεγνώνουν σε αέρα σε χαμηλή θερμοκρασία (π.χ., θερμοκρασία δωματίου) σε περιβάλλον χωρίς NH_4.

Όπως τονίστηκε από τον Bremmer (1965) οι μέθοδοι εκχυλίσεως των NH_4^+, NO_3^- και NO_2^- ιόντων από τα εδάφη, πρέπει να πληρούν τις εξής προϋποθέσεις:

1. Η εκχύλισή τους πρέπει να είναι πραγματικά ποσοτική

2. Να μην προκαλούνται αλλαγές στην ποσότητα των μορφών αζώτου ως αποτέλεσμα βιολογικών επιδράσεων

3. Το εκχύλισμα να είναι συμβατό με την αναλυτική τεχνική προσδιορισμού των ανόργανων μορφών αζώτου

4. Το εκχύλισμα να είναι σταθερό και να μπορεί να αποθηκευτεί ώστε να αναλυθεί αργότερα

5. Σε αυτές προστέθηκε και η προϋπόθεση ότι η μέθοδος εκχύλισης και η αναλυτική τεχνική πρέπει να είναι απλή και ταχεία

Οι Bremmer και Keeney (1965) πρότεινε ως εκχυλιστικό διάλυμα KCl 2 M και μέτρηση των NH_4^+, NO_3^- και NO_2^- ιόντων με απόσταξη κατά Kjeldahl.

Αργότερα, προβλήθηκε το επιχείρημα ότι πολλά εργαστήρια δεν διαθέτουν συσκευή Kjeldahl και επιπλέον η διαδικασία δεν είναι αρκετά απλή, σε πολλές δε περιπτώσεις, τα εκχυλιζόμενα ποσά αζώτου δεν ποσοτικοποιούνται με ακρίβεια και πρότειναν ως εκχυλιστικό διάλυμα KCl 1 M και τον χρωματικό προσδιορισμό του NH_4^+-N και NO_3^--N (Norman et al, 1985). Το διάλυμα KCl 1 M εκχυλίζει τις ίδιες ποσότητες ανόργανων μορφών αζώτου, όπως και το διάλυμα KCl 2 M (Mulvaney, 1996).

Τα NH_4^+ μπορούν λοιπόν να εκχυλιστούν από τα εδαφικά δείγματα με ανακίνηση με 1,0 M KCl. Τα νιτρικά ιόντα είναι υδατοδιαλυτά και ως εκ τούτου μπορούν επίσης να εκχυλιστούν με τα ίδια 1,0 M KCl. Τα νιτρώδη σπάνια υπάρχουν σε ανιχνεύσιμες ποσότητες στο έδαφος και επομένως συνήθως δεν προσδιορίζονται σε εδαφικά εκχυλίσματα.

Παρατηρήσεις

1. Σημαντικές διαφοροποιήσεις στις ποσότητες των νιτρικών $N0_3$ μπορούν να πραγματοποιηθούν σε ξηρά δείγματα τα οποία αποθηκεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Το διηθητικό χαρτί μπορεί να περιέχει σημαντικές ποσότητες νιτρικών που μπορεί ενδεχομένως να επιμολύνουν τα εκχυλίσματα (Muneta 1980, Heffernan 1985, Sparrow και Masiak 1987), γι' αυτό και καλύτερο είναι τα δείγματα να φυγοκεντρούνται και να λαμβάνεται το υπερκείμενο.
3. Οι συγκεντρώσεις των νιτρικών σε εδαφικά εκχυλίσματα θα πρέπει να προσδιορίζονται εντός 24 ωρών από την εκχύλιση (Keeney and Nelson 1982). Αν τα εκχυλίσματα δεν μπορούν να αναλυθούν αμέσως θα πρέπει να ψυχθούν. Τα εδαφικά εκχυλίσματα με χλωριούχο κάλιο διατηρούνται απεριόριστα όταν καταψύχονται (Heffernan 1985).

4.5.4 Μέτρηση νιτρικών ιόντων στα εδαφικά εκχυλίσματα

Σε δείγματα με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις νιτρωδών ιόντων σε σχέση με τα νιτρικά ιόντα, αυτά πρέπει να υποστούν προκατεργασία με σουλφαμικό οξύ πριν από τη μέτρηση των νιτρικών ιόντων (Beda και Nedospasov, 2005).

Σύμφωνα με τον Mir (2008), όταν οι συγκεντρώσεις των νιτρωδών στα δείγματα είναι υψηλότερες από 200 μg/L N, πρέπει να απομακρυνθούν τα νιτρώδη με τη βοήθεια ουρίας.

Εδαφικά εκχυλίσματα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων σιδήρου πρέπει να χειρίζονται με προσοχή, καθώς έχει βρεθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων σιδήρου παρεμποδίζουν την μέτρηση των νιτρικών ιόντων προκαλώντας αρνητικό σφάλμα, είτε ολίσθηση της γραμμής βάσης (Horita et al., 1997, Colman et al., 2007, Davidson et al., 2008). Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι ότι τα ιόντα σιδήρου (Fe^{2+}) ανταγωνίζονται την N- (1-ναφθυλ)-αιθυλενοδιαμίνη (NED), το έγχρωμο αντιδραστήριο στην αντίδραση Griess-Ilosvay.

Τα ιόντα σιδήρου (Fe^{3+}) μπορούν να αναχθούν σε Fe^{2+} στη στήλη καδμίου (οπότε και αυτό είναι ακόμα ένα από τα μειονεκτήματα της χρήσης στήλης καδμίου) και να προκύψει παρεμπόδιση, ανεξάρτητα από την οξειδωτική κατάσταση του σιδήρου στο εδαφικό εκχύλισμα. Πειράματα με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων έδειξαν ότι μπορεί να προκύψει αλληλεπίδραση/παρεμπόδιση λόγω σιδήρου σε συγκεντρώσεις μετάλλου πάνω από 50 mg Fe/L (Colman et al.,2007, Davidson et al., 2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

5.1 Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια

Πρότυπα διαλύματα

Τα **αρχικά πρότυπα** από τα οποία παρασκευάζονταν τα πρότυπα εργασίας ήταν MERCK (ST-1000mgNO_3/L) και PANREAC (QC-1000mgNO_3/L). Αυτά αντιστοιχούν σε 16.129μmolN/L, όπως προκύπτει από τον παρακάτω υπολογισμό.

$$\frac{\frac{1000\text{mg}}{\text{L}}}{\frac{62.004\text{mg}}{\text{mmol}}}1000 = 16129\mu\text{mol}\frac{\text{N}}{\text{L}}$$

Από τα πυκνά πρότυπα ST και QC παρασκευάστηκαν **ενδιάμεσα πρότυπα** με συγκέντρωση 1000μmolN/L. Αυτά ονομάζονται ST-1000 και QC-1000. Η παρασκευή τους γινόταν σε ογκομετρική φιάλη των 50mL με βάση την αραίωση.

$$50\text{mL} \times \frac{1000\mu\text{mol}}{\text{L}} = \frac{16129\mu\text{mol}}{\text{L}} \times \text{X}$$

$$\text{X} = 3{,}1\text{mL}$$

Σε κάθε μέρα μέτρησης από αυτά τα δύο ενδιάμεσα πρότυπα παρασκευάζονταν η καμπύλη αναφοράς και το δείγμα QC10. Τα ενδιάμεσα πρότυπα (1000μmolN/L) παρασκευάζονταν φρέσκα κάθε βδομάδα.

Για να παρασκευαστούν τα **πρότυπα εργασίας** για την καμπύλη αναφοράς και τα δείγματα ελέγχου σε ογκομετρικές φιάλες των 50mL οι υπολογισμοί των όγκων έγιναν με βάση την εξίσωση:

$$\frac{1000\mu\text{mol}}{\text{L}} \times \text{X} = \text{Y} \times 50\text{mL}$$

όπου: Y=η συγκέντρωση των προτύπων και

X=mL του ενδιάμεσου προτύπου 1000μmol/L

Το αρχικό πρότυπο για τις καμπύλες αναφοράς είναι της εταιρείας Merck (ST-1000mgNO_3/L).

Πρότυπα βαθμονόμησης	Όγκος (mL)
ST-I-1000μmol/L	3,1
ST0	0 (απιονισμένο)
ST2	0,1
ST5	0,25
ST10	0,5
ST20	1
ST50	2,5
ST100	5

Για το πρότυπο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το αρχικό πρότυπο PANREAC 1000mg/L NO_3.

Τα πρότυπα εργασίας και ελέγχου παρασκευάζονταν φρέσκα κάθε μέρα αναλύσεων.

Πρότυπο ελέγχου	Όγκος (mL)
QC10	0,5

Αντιδραστήρια

- 1,0% w/v σουλφανιλαμίδιο

Διαλύονται 2,5 g σουλφανιλαμίδιο σε λίγο δισ-απεσταγμένο νερό (MilliQ) προστίθενται 25 ml πυκνό HCl και έπειτα στα 250 ml με δισ-απεσταγμένο νερό (MilliQ)

- 0,1% w/v διυδροχλωρική N-(1-ναφθυλ)-αιθυλένο-διαμίνη (NEDD)

Διαλύονται 0,25 g διυδροχλωρικής N-(1-ναφθυλ)-αιθυλένο-διαμίνης (NEDD) στα 250 mL με millQ.

- Διάλυμα χλωριούχου βαναδίου (III)

Διαλύεται 0,25 g χλωριούχου βαναδίου (III) (CAS Number 7718-98-1) σε 2,5 ml πυκνού HCl και προστίθενται έπειτα 25 mL MilliQ. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε φυγοκεντρικό σωλήνα. Το διάλυμα ανακινείται καλά.

Παρατήρηση

Η παρασκευή του διαλύματος πρέπει να γίνει γρήγορα, καθώς το στερεό χλωριούχο βανάδιο αντιδρά με τον ατμοσφαιρικό αέρα, δημιουργώντας οξείδια του βαναδίου (V_2O_4), (V_2O_3), (VO), (V_2O_5). Το χλωριούχο βανάδιο τείνει να εκλύει διαβρωτικές αναθυμιάσεις, ειδικά όταν εκτίθεται σε αέρα με υψηλό ποσοστό υγρασίας. Αφού ανοιχθεί, για να ελαχιστοποιηθεί η απορρόφηση υδρατμών στη φιάλη VCl_3 μπορεί να αποθηκευτεί σε μια μικρή ποσότητα αποξηραντικού (π.χ., άνυδρο θειικό ασβέστιο) σε ένα σφραγισμένο δοχείο. Αφού διαλυθεί το χλωριούχο βανάδιο (III) σε υδροχλώριο 1M, οι αναθυμιάσεις δεν θα εκπέμπονται πλέον. Εκτός από τα παραπάνω, δεν χρειάζεται να τηρούνται υπερβολικές προφυλάξεις καθώς το χλωριούχο βανάδιο (III) δεν ταξινομείται ως επιβλαβές για το περιβάλλον ή ως τοξικό.

- Μικτό αντιδραστήριο

Σε κωνική φιάλη ή ποτήρι ζέσεων προστίθενται 50 ml διαλύματος χλωριούχου βαναδίου (III). Προστίθενται 50 ml από το 1,0% w/v διάλυμα σουλφανιλαμίδιου. Προστίθενται 50 ml από το διάλυμα 0,1% w/v διυδροχλωρικής N-(1-ναφθυλ)-αιθυλένο-διαμίνης.
Το μικτό αντιδραστήριο μπορεί να παραμείνει στο ψυγείο μέχρι 15 μέρες.

- Χλωριούχο κάλιο 1M

Διαλύουμε 74,69g χλωριούχου καλίου σε 1 λίτρο δισ-απεσταγμένο νερό (MilliQ).

ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Υλικά Αναφοράς

Butrap:
Υλικό αναφοράς νερό βρύσης με κωδικό Butrap. Ο οργανισμός που το παρέχει είναι ο NRC-CNRC. Αυτό έχει πιστοποιημένη τιμή νιτρικών και νιτρωδών 1,95 ± 0,22mg/L ή 31,4 ± 3,6 μmol N/L.

Rainwater:
Υλικό αναφοράς, νερό βροχής με κωδικό ERM-CA408. Ο οργανισμός που το παρέχει είναι ο JRC-EU (Joint Research Centre). Αυτό έχει πιστοποιημένη τιμή νιτρικών και νιτρωδών 2,01 ± 0,09mg/L ή 32,4 ± 1,4 μmol N/L

Πραγματικά Υδατικά Δείγματα

Πηγή Αγίας Παρασκευής
Νερό από την πηγή Αγ.Παρασκευής της Θεσσαλίας, μετρήθηκε ως είχε (μετά από διήθηση).

Συνθετικά δείγματα

Παρασκευάστηκαν τα δείγματα Δ1, Δ2 και Δ3, ΤΑΡ1 και ΤΑΡ2 από νερό βρύσης με προσθήκες από το πρότυπο ST-NO_3 (1000μmolN/L) ή το αρχικό πρότυπο MERCK (ST-1000mgNO3/L) = 16.129μmolN/L, σε ογκομετρικές φιάλες των 250mL. Για τη λήψη όγκων από τα πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν ογκομετρικοί κύλινδροι και πιπέτα μεταβλητού όγκου (100-1000μL).

Για το **Δ1**:
16129μmol×X=250mL×(~300μmol)
X=4,65mL

Για το **Δ2**:
16129μmol×X=250mL×(~800μmol)
X=12,4mL

Για το **Δ3**:
1000μmol×X=250mL×(~10μmol)
X=2,5mL

Για το **ΤΑΡ1**:
1000μmol×X=250mL×(~26μmol)
X=6,5mL

Για το **ΤΑΡ2**:
1000μmol×X=250mL×(~80μmol)
X=20mL

5.2 Διαδικασία αναγωγής και μέτρησης νιτρικών ιόντων σε πρότυπα δείγματα και δείγματα υπόγειων νερών

Για να πραγματοποιηθεί η αναγωγή των νιτρικών ιόντων και μετέπειτα η μέτρησή τους ως νιτρώδη μετά την ανάπτυξη του αζωχρώματος, προσθέτουμε σε φυγοκεντρικό σωλήνα (falcon tube) των 15 ml, 2 ml μικτό αντιδραστήριο που περιέχει VCl_3, σουλφανιλαμίδιο και ναφθυλ-αιθυλένο-διαμίνη και 3ml δείγμα ή πρότυπο διάλυμα. Αραίωση με απιονισμένο μέχρι τα 6 ml.

Ανακινούμε τα δείγματα και έπειτα αφήνονται για την ανάπτυξη του χρώματος. Σε αυτό το σημείο είναι δυνατό να εφαρμοστούν δύο μεθοδολογίες για την ολοκλήρωση της αναγωγής και την ανάπτυξη του χρώματος που έχουν να κάνουν με διαφοροποιηση στο χρόνο και τη θερμοκρασία αντίδρασης.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η μέθοδος αναγωγής των νιτρικών σε νιτρώδη με VCl_3 με μεταβολή στις παραμέτρους:

- Θερμοκρασία αντίδρασης
- Χρόνος αντίδρασης

5.3 Ανάπτυξη μεθόδου και βελτιστοποίηση συνθηκών

Χρόνος και θερμοκρασία αντίδρασης

Συγκρίθηκαν οι απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων νιτρικών με δύο τρόπους για τη διαδικασία ανάπτυξης χρώματος.

Α) Αφενός έγινε χώνευση στους 60 ^{o}C των προτύπων με το αντιδραστήριο ανάπτυξης για διάφορους σύντομους χρόνους (από 30 λεπτά ως 2 ώρες) και

Β) έγινε ανάμιξη των προτύπων με το αντιδραστήριο ανάπτυξης χρώματος και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για παρατεταμένους χρόνους (από 7 ως 48 ώρες).

Όλες οι συγκεντρώσεις προτύπων μετρήθηκαν εις τριπλούν.

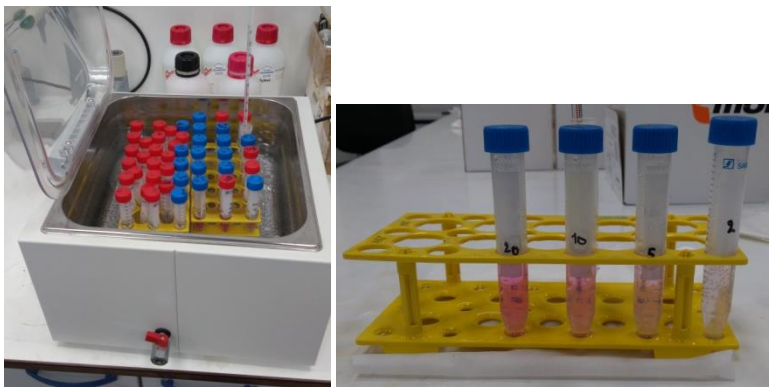
Πιο αναλυτικά,

Α) Για το πείραμα χώνευσης-χρόνου έγιναν καμπύλες αναφοράς νιτρικών (0-20-5-10-20-50-100 μmol/L) σε απιονισμένο νερό. Οι χρόνοι παραμονής στο υδατόλουτρο στους 60 ^{o}C για ανάπτυξη χρώματος ήταν 30-60-90 και 120 λεπτά.

Β) Στο πείραμα ανάμιξης των προτύπων με το αντιδραστήριο ανάπτυξης χρώματος και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου έγινε ανάπτυξη σε πρότυπα νιτρικών σε απιονισμένο νερό (0-20-5-10-20-50-100 μmol/L) τα οποία αφέθηκαν για αρκετές ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και μετρήθηκε μετά η απορρόφησή τους στο φασματοφωτόμετρο. Οι χρόνοι που εφαρμόστηκαν ήταν 7-10-15-20-24-30-38 και 48 ώρες.

Έπειτα σε όλα τα δείγματα μετριέται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 540 nm, σε κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm.

Αφού αποφασιστεί ποια μέθοδος αναγωγής (με θέρμανση ή χωρίς) και ποιος είναι ο κατάλληλος χρόνος, στην επιλεγμένη μέθοδο εφαρμόζονται τα πειράματα για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας, αναπαραγωγιμότητας και ορθότητας.



Εικόνα 5.1: Α. Καμπύλη νιτρικών και υδατικά δείγματα στο υδατόλουτρο, Β.Πρότυπα δείγματα νιτρικών μετά την χώνευση ανάπτυξη χρώματος στο υδατόλουτρο

5.4 Καμπύλες αναφοράς NO_2 με θέρμανση και με παραμονή χωρίς θέρμανση

Δεδομένου ότι η αντίδραση στην οποία βασίζεται η μέθοδος προσδιορισμού που εξετάζεται είναι η αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και η ποσοτικοποιήση των νιτρωδών, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η συμπεριφορά που έχουν διαλύματα νιτρωδών με τη θέρμανση ή την παραμονή με μικτό διάλυμα αναγωγής – ανάπτυξης (χλωριούχο βανάδιο - σουλφανιλαμίδιο - ναφθυλ-αιθυλένο διαμίνη). Άρα παρασκευάστηκαν πρότυπα νιτρωδών στις ίδιες συγκεντρώσεις με τα νιτρικά (2-5-10-20-50-100μmolN/L) και μετρήθηκαν εις τριπλούν με θέρμανση και με παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για συγκεκριμένο χρόνο, ώστε να βρεθεί αν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων για να επιλεγεί η κατάλληλη.

Επίσης έγινε σύγκριση της απόκρισης σε συγκεκριμένο χρόνο της χώνευσης των προτύπων νιτρικών με τα πρότυπα των νιτρωδών για τον υπολογισμό και της % αναγωγικής ικανότητας της αντίδρασης.

Τελικά στην μέθοδο ολοκλήρωσης της αντίδρασης και ανάπτυξης του χρώματος που επιλέχθηκε έγιναν τα παρακάτω πειράματα επαλήθευσης.

5.5 Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου προσδιορισμού νιτρικών ιόντων σε υδατικά δείγματα

Στην μέθοδο αναγωγής που επιλέχθηκε ως πιο κατάλληλη, προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

Μετρήθηκαν αραιά δείγματα παρασκευασμένα με νερό βρύσης και πολύ μικρές προσθήκες νιτρικών περίπου 0,5 και 1 μmolN/L με βάση τη μεθοδολογία EPA (Environmental Protection Agency, 2011, Part 136, Appendix B—Definition and Procedure for the determination of the method detection limit-Revision 1.11)

Έγιναν 10 μετρήσεις των χαμηλών δειγμάτων σε διαφορετικές μέρες, αλλά σε σχετικά σύντομο χρόνο ώστε να μην αλλοιωθούν τα δείγματα.
Το LOD δίνεται από τον τύπο:

$$LOD = stdev*t$$

όπου t, ο συντελεστής student για επίπεδο εμπιστοσύνης 99% και stdev η τυπική απόκλιση των συγκεντρώσεων από τις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις

Για 10 επαναλήψεις και άρα 9 βαθμούς ελευθερίας ο συντελεστής t με τον οποίο πολλαπλασιάζεται η τυπική απόκλιση των μετρήσεων είναι 2,821.

5.6 Ισοδυναμία μεθόδων αναγωγής νιτρικών ιόντων με στήλη Cd και VCl_3

Μετρήθηκε το ίδιο δείγμα νερού (Δ3) αφού έγινε η αναγωγή του σε στήλη καδμίου και μετά την αναγωγή του με χλωριούχο βανάδιο. Η αναγωγή με την κάθε μία από τις δύο μεθόδους έγινε >6 φορές. Για την κάθε μέθοδο υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η %RSD ώστε να υπολογιστεί αν υπάρχει κάποια στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων.

5.7 Ορθότητα (για υδατικά δείγματα)

Για τον υπολογισμό της ορθότητας πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και μέτρηση των νιτρικών ιόντων (μαζί με τα νιτρώδη) των πιστοποιημένων υλικών αναφοράς BURTAP και RAINWATER (ERM-CA408) σε διαφορετικές μέρες. Για κάθε μέτρηση υπολογίστηκε η **%** Ανάκτηση.

5.8 Επαναληψιμότητα (για υδατικά δείγματα)

Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και μέτρηση των νιτρικών ιόντων (μαζί με τα νιτρώδη) σε πολλαπλά υποδείγματα από κάθε δείγμα CRM (BURTAP, RAINWATER) ή από κάθε δείγμα που συλλέχθηκε ή παρασκευάστηκε με γνωστή προσθήκη (ΠΗΓΗ, Δ1, Δ2, ΤΑΡ1, ΤΑΡ2) την ίδια μέρα με ίδια καμπύλη αναφοράς. Για κάθε δείγμα υπολογίστηκαν η τυπική απόκλιση (SD) ο μέσος όρος (ΜΟ) και η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD).

5.9 Αναπαραγωγιμότητα (για υδατικά δείγματα)

Ανάπτυξη χρώματος σε πολλαπλά υποδείγματα από κάθε δείγμα (CRM: BURTAP, RAINWATER ή παρακευασμένο με γνωστή προσθήκη: ΤΑΡ1, ΤΑΡ2 ή συλλεχθέν ΠΗΓΗ) σε άλλες μέρες, δηλαδή με διαφορετικές καμπύλες.
Για κάθε δείγμα (ΤΑΡ1, ΤΑΡ2, BURTAP, RAINWATER, ΠΗΓΗ) υπολογίστηκαν η τυπική απόκλιση (SD) ο μέσος όρος (ΜΟ) και η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD).

5.10 Υπολογισμοί ισοζυγίων αβεβαιότητας (για υδατικά δείγματα)

Για την εκτίμηση της αβεβαιότητας του αποτελέσματος θα παρουσιαστούν δύο προσεγγίσεις. Στα δείγματα Δ1 και Δ2 είναι διαθέσιμα στοιχεία επαναληψιμότητας και ορθότητας. Για να είναι πληρέστερη η προσέγγιση της αβεβαιότητας θα υπολογιστούν και οι συνιστώσες αβεβαιότητας από τα ογκομετρικά σκεύη (μεταγγίσεις δειγμάτων και προτύπων) και η συνιστώσα από την καμπύλη βαθμονόμησης. Για να υπολογιστούν οι συνεισφορές αβεβαιότητας από τη μεταφορά όγκων στο φυγοκεντρικό σωλήνα έγιναν επαναλαμβανόμενες μεταφορές (n=16) όγκων 2 και 3 mL (απιονισμένου νερού) σε φυγοκεντρικούς σωλήνες και ζυγίστηκαν οι ποσότητες. Θεωρείται πυκνότητα 1g/L. Άρα οι ζυγίσεις μετατρέπονται απευθείας σε όγκους. Υπολογίζεται ο μέσος όρος όγκου και η τυπική απόκλιση για τα 2 mL και τα 3 mL. Για την επίδραση της θερμοκρασίας θεωρείται θερμοκρασιακή μεταβολή εργαστηρίου ± 8°C και Συντελεστής διαστολής του νερού : 2,1·10-4 $°C^{-1}$

Για τα υπόλοιπα δείγματα (επειδή υπάρχουν δεδομένα αναπαραγωγιμότητας-ορθότητας (μετρήσεις σε διαφορετικές μέρες με άλλες καμπύλες) και θεωρώντας ότι οι συνεισφορές αβεβαιότητας από τις μεταφορές όγκων δειγμάτων και προτύπων στους φυγοκεντρικούς σωλήνες και από την καμπύλη βαθμονόμησης εντάσσονται μέσα στην αναπαραγωγιμότητα αυτές δεν θα υπολογιστούν ξεχωριστά.

5.11 Αξιολόγηση στοιχείων επαναληψιμότητας – αναπαραγωγιμότητας – ορθότητας και αβεβαιότητας (για υδατικά δείγματα)

Για κάθε δείγμα (CRM ή παρακευασμένο με γνωστή προσθήκη TAP1, TAP2, BURTAP, RAINWATER, ΠΗΓΗ, Δ1, Δ2) υπολογίστηκαν τα:

- %RSD Επαναληψιμότητας
- %RSD Αναπαραγωγιμότητας
- Ορθότητα (Εύρος % Ανάκτησης)
- %Διευρυμένη αβεβαιότητα

Από τις οδηγίες του AOAC υπάρχουν τα όρια για την αξιολόγηση των στοιχείων επίδοσης μιας μεθόδου (επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα και ορθότητα). Τα όρια αυτά συγκρίνονται με τα όρια της παρούσας μεθόδου και εφόσον τα αποτελέσματα για κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων είναι εντός του ορίου που θέτει ο AOAC θα θεωρούνται ικανοποιητικά (AOAC 2016, Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements).

5. 12 Εδαφικά δείγματα

Υλικά Αναφοράς

ISE-919:
Υλικό αναφοράς ίζημα με κωδικό ISE-919. Είναι υπόλοιπο διεργαστηριακού δείγματος εδαφών που διοργανώνεται από τον οργανισμό WEPAL (Wageningen Evaluating programs for Analytical

Laboratories) του πανεπιστημίου Wageningen. Το υλικό αυτό έχει πιστοποιημένη τιμή νιτρικών και νιτρωδών 9,371±0,3mgN/kg.

ISE-997:
Υλικό αναφοράς ίζημα με κωδικό ISE-997. Είναι υπόλοιπο διεργαστηριακού δείγματος εδαφών που διοργανώνεται από τον οργανισμό WEPAL (Wageningen Evaluating programs for Analytical Laboratories) του πανεπιστημίου Wageningen. Το υλικό αυτό έχει πιστοποιημένη τιμή νιτρικών και νιτρωδών 62,06±0, 3mgN/kg.

ISE-961:
Υλικό αναφοράς ίζημα με κωδικό ISE-961. Είναι υπόλοιπο διεργαστηριακού δείγματος εδαφών που διοργανώνεται από τον οργανισμό WEPAL (Wageningen Evaluating programs for Analytical Laboratories) του πανεπιστημίου Wageningen. Το υλικό αυτό έχει πιστοποιημένη τιμή νιτρικών και νιτρωδών 21,43±0, 3mgN/kg.

Εδαφικά Δείγματα

- 17 Δείγματα αγροτικών εδαφών (AG1-AG17)
- Δείγματα από Αταλάντη 2mm και 100μm
- Δείγμα από Σκοπευτήριο Καισαριανής νωπό και ξηρό

5.13 Διαδικασία αναγωγής και μέτρησης νιτρικών ιόντων σε εκχυλίσματα εδαφικών δειγμάτων

Τα εδαφικά δείγματα αμέσως μετά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο ξηράνθηκαν σε εργαστηριακό φούρνο σε θερμοκρασία 40^{o}C όπου παρέμειναν για 72 ώρες. Στη συνέχεια κοσκινίστηκαν σε πλαστικό κόσκινο διαμέτρου οπής 2 mm και 100μm και φυλάχθηκαν κλειστά σε αριθμημένα πλαστικά σακουλάκια.

Για την εκχύλιση των νιτρικών ιόντων, 1 g εδαφικού δείγματος (κλάσμα <2m) ή δείγμα εδάφους-υλικό αναφοράς ζυγίστηκε με ακρίβεια σε φυγοκεντρικό σωλήνα και προστέθηκαν 10 ml KCl 1M. Ανακινήθηκαν για 1,5 ώρα σε τάραχτρο. Μετά το πέρας της ανακίνησης, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και από το υπερκείμενο συλλέχθηκε από το κάθε δείγμα 1 ml το οποίο μεταφέρθηκε σε έναν άλλο φυγοκεντρικό σωλήνα όπου γίνεται η αντίδραση αναγωγής και η ανάπτυξη χρώματος. Προστέθηκαν 3 ml milliQ ώστε το δείγμα να αραιωθεί και η τιμή του να είναι εντός της καμπύλης βαθμονόμησης.

Για να πραγματοποιηθεί η αναγωγή των νιτρικών ιόντων και μετέπειτα η μέτρησή τους ως νιτρώδη μετά την ανάπτυξη του αζωχρώματος, προσθέτουμε στο φυγοκεντρικό σωλήνα (falcon tube) των 15 ml με τα 4ml αραιωμένο δείγμα, 1500 μl μικτό αντιδραστήριο που περιέχει VCl_3, σουλφανιλαμίδιο και ναφθυλ-αιθυλένο-διαμίνη και αραιώνουμε στα 5ml με απιονισμένο νερό.

Για κάθε δείγμα υπολογίστηκε η μετρούμενη τιμή NO_3 (mg/kg) και σε επιλεγμένα δείγματα έγινε πολλαπλή ανάλυση και υπολογίστηκαν στοιχεία επαναληψιμότητας (μέσος όρος, τυπική απόκλιση, %σχετική τυπική απόκλιση).

5.14 Καμπύλες αναφοράς σε απιονισμένο νερό και σε χλωριούχο κάλιο (KCl) για την εφαρμογή της μεθόδου σε εδάφη

Έγιναν καμπύλες αναφοράς (0-2-5-10-20-50-100 μmolN/L) σε KCl και σε νερό. Οι μέσοι όροι συγκρίνονται με t-test. Ελέγχονται και οι κλίσεις των γραμμικών εξισώσεων στις καμπύλες αναφοράς ώστε να προσδιοριστεί ο κατάλληλος τρόπος κατασκευής της καμπύλης αναφοράς.

5.15 Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου προσδιορισμού νιτρικών ιόντων σε εδαφικά εκχυλίσματα

Καταγράφηκαν από διαφορετικές μέρες ανάπτυξης της καμπύλης αναφοράς οι απορροφήσεις τυφλών δειγμάτων σε KCl (n = 12). Υπολογίστηκε η συγκέντρωση στα τυφλά δείγματα (μmolN/L), ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων, η τυπική απόκλιση (SD) και το η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD).

Το όριο ανίχνευσης (LOD) σε μmolN/L δίνεται από τον τύπο:

$$LOD = stdev*t$$

όπου t, ο συντελεστής student για επίπεδο εμπιστοσύνης 99% και stdev η τυπική απόκλιση των συγκεντρώσεων από τις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις

Για 12 επαναλήψεις και άρα 11 βαθμούς ελευθερίας ο συντελεστής t με τον οποίο πολλαπλασιάζεται η τυπική απόκλιση των μετρήσεων είναι 2,821.

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) σε μmolN/L είναι η δεκαπλασιασμένη τιμή της τυπικής απόκλισης της συγκέντρωσης των τυφλών δειγμάτων (LOQ = 10*sd).

Τα παραπάνω όρια υπολογίστηκαν θεωρώντας εκχύλιση 1 g εδάφους σε 10mL KCl και μέτρηση χωρίς αραίωση.

5.16 Διερεύνηση χρόνου εκχύλισης

Έγιναν δοκιμές (εις τριπλούν) με έδαφος υλικό αναφοράς (ISE 997) και εκχύλιση / ανακίνηση 1 ώρα, 1,5 ώρες και 2 ώρες. Υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις στις 3 διαφορετικές συνθήκες και οι μέσοι όροι συγκρίθηκαν με t-test ώστε να βρεθούν διαφορές στατιστικά σημαντικές όσων αφορά το χρόνο εκχύλισης.

5.17 Σύγκριση αποτελεσμάτων με εκχύλιση σε νωπό και ξηρό δείγμα

Έγιναν δοκιμές (εις τριπλούν) στο ίδιο δείγμα εδάφους πριν και μετά την ξήρανσή του σε εργαστηριακό φούρνο στους 40^{o}C για 72 ώρες. Υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις και οι μέσοι όροι τους συγκρίθηκαν με με t-test ώστε να βρεθεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ νωπού και ξηρού δείγματος.

5.18 Σύγκριση αποτελεσμάτων με εκχύλιση σε εδάφη κοσκινισμένα από διαφορετικά μεγέθη οπής (<100μm και < 2mm)

Έγιναν μετρήσεις των νιτρικών ιόντων σε τρία διαφορετικά δείγματα (εις διπλούν στο καθένα), καθένα από τα οποία είχε κοσκινιστεί από δύο διαφορετικά μεγέθη οπής (<100μm και < 2mm). Υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις και οι μέσοι όροι τους συγκρίθηκαν με με t-test ώστε να αποδειχτεί αν υπάρχει στατιστική διαφορά στη μετρούμενη συγκέντρωση εκχυλίσιμων νιτρικών στα διαφορετικά κλάσματα εδάφους μετά από κοσκίνιση σε κόσκινο 2mm ή 100μm ώστε να βρεθεί πιο κλάσμα είναι το καταλληλότερο για τον προσδιορισμό των νιτρικών ιόντων.

5.19 Αναπαραγωγιμότητα σε εδαφικά εκχυλίσματα

Για τον υπολογισμό της αναπαραγωγιμότητας πραγματοποιήθηκε εκχύλιση, ανάπτυξη και μέτρηση των νιτρικών ιόντων (μαζί με τα νιτρώδη) των πιστοποιημένων υλικών αναφοράς ISE 919, 961 και 997 σε διαφορετικές μέρες, δηλαδή με διαφορετικές καμπύλες αναφοράς. Για κάθε υλικό αναφοράς (ISE 919, 961 και 997) υπολογίστηκαν η τυπική απόκλιση (SD) ο μέσος όρος (MO) και η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD).

5.20 Ορθότητα σε εδαφικά εκχυλίσματα

Για τον υπολογισμό της ορθότητας πραγματοποιήθηκε εκχύλιση, ανάπτυξη και μέτρηση των νιτρικών ιόντων (μαζί με τα νιτρώδη) των πιστοποιημένων υλικών αναφοράς ISE 919, 961 και 997 σε διαφορετικές μέρες, δηλαδή με διαφορετικές καμπύλες αναφοράς. Για κάθε μέτρηση υπολογίστηκε η % Ανάκτηση.
Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε υπολογιστικό φύλλο excel όπου εισάγεται η πιστοποιημένη τιμή των υλικών αναφοράς (παλιά δείγματα διεργαστηριακών), η τυπική απόκλιση της κάθε τιμής καθώς και ο μέσος όρο των τιμών που μετρήσαμε εμείς με την τυπική απόκλιση των 7 μετρήσεων μας. Από τους τύπους που αναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο 2 προκύπτει η % τυπική αβεβαιότητα της ορθότητας. Για να μετατραπεί σε τυπική αβεβαιότητα διαιρείται με 100.

5.21 Σύγκριση αναπαραγωγιμότητας και ορθότητας με μέτρηση εκχυλισμάτων με τη μέθοδο νιτρικών με στήλη Cd

Μια σειρά από 7 εκχυλίσματα του πιστοποιημένου υλικού αναφοράς ISE 997 αναλύθηκε με την προτεινόμενη διαδικασία με χλωριούχο βανάδιο και με αναγωγή σε στήλη καδμίου σε διαφορετικές ημέρες, από τον ίδιο αναλυτή χρησιμοποιώντας τον ίδιο εξοπλισμό και τα ίδια πρότυπα. Για κάθε ανάλυση χρησιμοποιήθηκε διαφορετική παρτίδα αντιδραστηρίου.
Για κάθε μέτρηση υπολογίστηκε η % Ανάκτηση και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών σε mg/kg N, η τυπική απόκλιση και % σχετική τυπική απόκλιση.

5.22 Πειράματα Ομοιογένειας

Επιλέχθηκε ένα δείγμα που ήταν διαθέσιμο σε μεγάλη ποσότητα (AG15). Επαρκής μάζα από το δείγμα αυτό απλώθηκε σε καθαρό χαρτί και από αυτή με διαδικασίες τεταρτοποίησης και πολύ καλό ανακάτεμα τελικά χωρίστηκε σε 10 τμήματα και καθένα από αυτά σε 2 επιμέρους. Λήφθησαν έτσι 20 υποδείγματα του 1g τα οποία υποβλήθηκαν στην διαδικασία εκχύλισης με KCl και τη μέτρηση των νιτρικών με τη μέθοδο που εφαρμόζεται στην παρούσα εργασία.
Υπολογίστηκε η επί τοις εκατό σχετική διαφορά μεταξύ των δύο υποδειγμάτων κάθε δείγματος (%RPD), ο συνολικός μέσος όρος όλων των μετρήσεων (mg/kg N) και η τυπική απόκλιση ομοιογένειας. Στα 20 δείγματα έγινε ανάλυση ANOVA single factor και προέκυψαν οι τιμές F, P, F-crit. Συγκρίθηκαν μεταξύ τους οι τιμές F και F-crit ώστε να ελεγχθεί η ομοιογένεια (αν F<Fcrit ή F>Fcrit).
Το τετράγωνο της τυπικής απόκλισης ομοιογένειας δίνεται από τον τύπο (n=2).

$$s_{hom}^2 = \frac{MS_{between} - MS_{within}}{n}$$

Έτσι υπολογίζεται η τυπική απόκλιση λόγω ομοιογένειας (σε mg/kg) και από τον συνολικό μέσο όρο υπολογίζεται η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση ομοιογένειας %RSDhom.

5.23 Υπολογισμοί ισοζυγίων αβεβαιότητας (για εδαφικά δείγματα)

Για την εκτίμηση της αβεβαιότητας του αποτελέσματος εκχυλίσιμων νιτρικών σε εδάφη λαμβάνονται υπόψη οι συνιστώσες αναπαραγωγιμότητας, ορθότητας και ομοιογένειας σε 3 επίπεδα συγκεντρώσεων (9, 20 και 62 mg/kg N) που είναι τα επίπεδα στα 3 υλικά αναφοράς ISE που χρησιμοποιήθηκαν. Θεωρώντας ότι οι συνεισφορές αβεβαιότητας από τις μεταφορές όγκων δειγμάτων και προτύπων στους φυγοκεντρικούς σωλήνες και από την καμπύλη βαθμονόμησης εντάσσονται μέσα στην αναπαραγωγιμότητα δεν θα συνεκτιμηθούν ξεχωριστά.

Υπολογίστηκαν τα ισοζύγια αβεβαιότητας για τα εξής επίπεδα εκχυλίσιμων νιτρικών:

- επίπεδο 9 mg/kg N (με εφαρμογή στο υλικό αναφοράς ISE 919)
- επίπεδο 1,7-10mg/kg N (εφαρμογή σε πραγματικό δείγμα AG9)
- επίπεδο 20 mg/kg N (με εφαρμογή στο υλικό αναφοράς ISE 961)
- επίπεδο 10-30mg/kg N (εφαρμογή σε πραγματικό δείγμα AG1)
- επίπεδο 60 mg/kg N (με εφαρμογή στο υλικό αναφοράς ISE 997)
- επίπεδο 10-30mg/kg N (εφαρμογή σε πραγματικό δείγμα AG13)

Για κάθε πηγή αβεβαιότητας υπολογίζεται η τυπική αβεβαιότητα [u(xi)] και η σχετική τυπική αβεβαιότητα [u(xi)/xi]. Τέλος υπολογίζεται η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα και η % Διευρυμένη αβεβαιότητα.

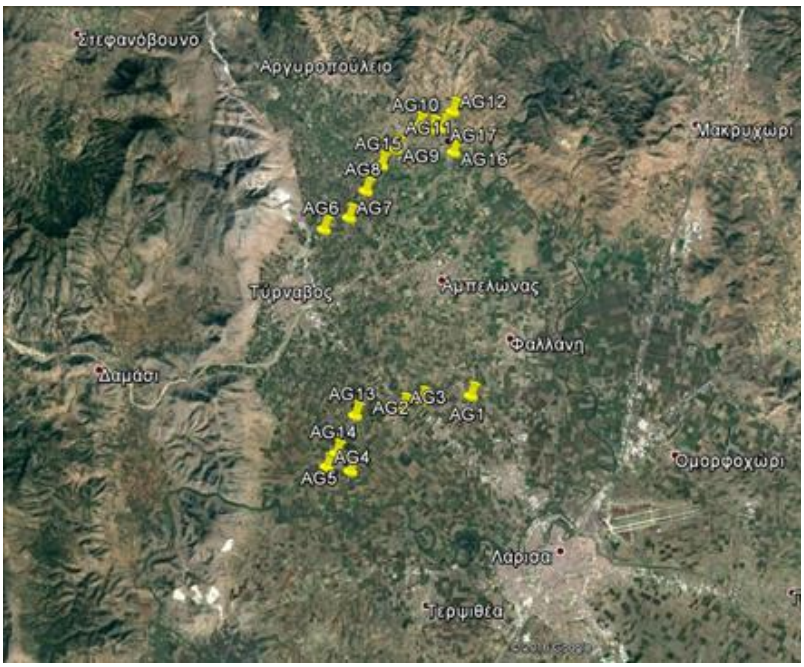
54.24 Στοιχεία για τα πραγματικά δείγματα εδαφών

Τα εδαφικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι 17 στο σύνολό τους και προέρχονται από την περιοχή του Τυρνάβου του νομού Λαρίσης (Εικόνα 5.2). Τα δείγματα μπορούν

να χωριστούν σε δύο ομάδες ανάλογα με τη θέση τους σε σχέση με τον Τύρναβο, στα δείγματα Βόρεια της περιοχής μελέτης και σε αυτά που βρίσκονται Νότια (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.2: Χάρτης του Νομού Λαρίσης-Περιοχή Τύρναβος



Εικόνα 5.3: Απεικόνιση της περιοχής μελέτης του Τυρνάβου με τα σημεία δειγματοληψίας των εδαφικών δειγμάτων

Γεωλογία και κοιτασματολογία Τυρνάβου

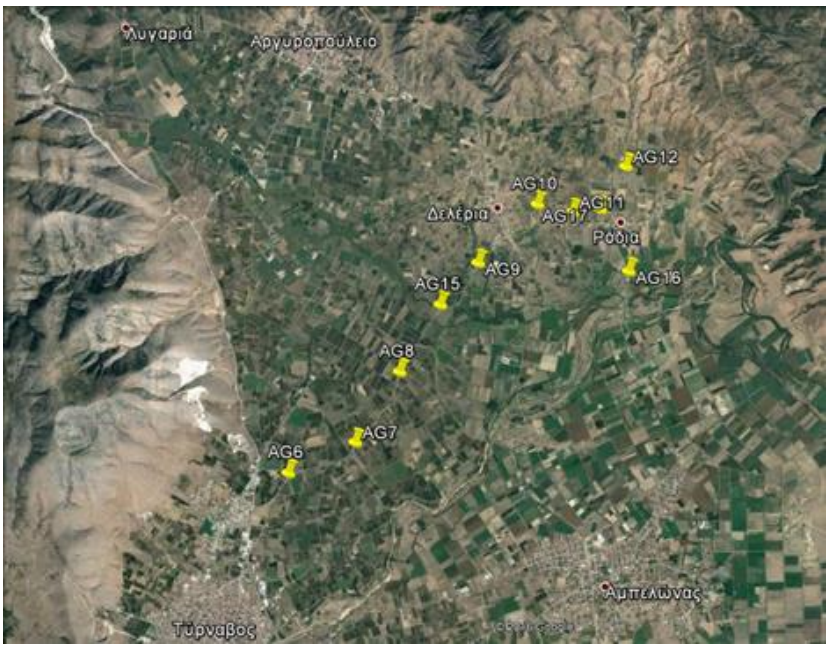
Η περιοχή νότια του Τυρνάβου, σύμφωνα με την στρωματογραφική στήλη της περιοχής απαρτίζεται από αλουβιακές αποθέσεις, επικλυσιγενή κροκαλοπαγή και κλαστικούς ασβεστόλιθους, μάρμαρα, μαρμαρυγικούς σχιστόλιθους, γνεύσιους και γνευσιοσχιστόλιθους. Αναλυτικότερα, τα 7 εδαφικά δείγματα που συλλέχθηκαν από αυτή την περιοχή (νότια του Τυρνάβου, Εικόνα 5.4) αποτελούνται από αλουβιακές αποθέσεις. Ασύνδετα υλικά από άργιλους, κροκαλολατύπες και

ποταμοχειμαρολιμναία υλικά που αποτέθηκαν στη λεκάνη της Λάρισας και σε μικρές εσωτερικές λεκάνες.

Τα υπόλοιπα 10 δείγματα συλλέχθηκαν βόρεια του Τυρνάβου (Εικόνα 5.5), κοντά στις περιοχές Ρόδια, Δελέρια και Κριτήρι. Η πλειοψηφία των δειγμάτων όσων αφορά το γεωλογικό υπόβαθρο προέρχονται από ποταμολιμνιαίες αποθέσεις της λεκάνης της Λάρισας. Καταλαμβάνουν μεγάλη έκταση των βορείων παρυφών της λεκάνης της Λάρισας και αποτελούνται κυρίως από αργίλους και άμμους με παρεμβολές στρωμάτων αδρομερών υλικών ποικίλου πάχους. Δειγματοληψία έγινε και στην περιοχή των αλλουβιακών αποθέσεων, στις ποτάμιες αναβαθμίδες. Εξαπλώνονται κατά μήκος των ποταμών Πηνειού και Τατιρήσιου και προέρχονται από ποτάμιες και ποταμολιμναίες αποθέσεις. Τοπικά αναπτύσσονται σε μεγάλη έκταση, γιατί προέρχονται από περιόδους πλημμυρών της περιοχής. Αποτελούνται κυρίως από άμμους και λιγότερο από κροκαλολατύπες και άργιλους. Η συνεχής αλλαγή της ροής του ποταμού Πηνειού δημιούργησε ανβαθμίδες που φτάνουν σε ύψος τα 5 μέτρα.



Εικόνα 5.4: Απεικόνιση των σημείων δειγματοληψίας Νότια του Τυρνάβου



Εικόνα 5.5: Απεικόνιση των σημείων δειγματοληψίας Βόρεια του Τυρνάβου

5.25 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το SPSS (έκδοση 17.0) καθώς έχει πολλές δυνατότητες όσον αφορά την επεξεργασία και παρουσίαση των δεδομένων μιας επιστημονικής έρευνας αλλά και μεγάλη αξιοπιστία. Για δύο ομάδες τιμών πραγματοποιήθηκε το t-test, ενώ για να γίνει σύγκριση μεταξύ περισσότερων από δύο ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το OneWayANOVA και το ειδικό τεστ Tukey test.

Το t-test για ανεξάρτητα δείγματα (independent samples t-test) χρησιμοποιείται για την σύγκριση των μέσων όρων δυο συνόλων τιμών που μπορεί να διαφέρουν όσον αφορά ένα χαρακτηριστικό (μεταβλητή). Η διατύπωση των υποθέσεων έχει την εξής μορφή:
Μηδενική υπόθεση (H_0): οι μέσοι όροι των δυο ομάδων δεν διαφέρουν μεταξύ τους
Εναλλακτική υπόθεση (H_1): οι μέσοι όροι διαφέρουν μεταξύ τους

Προυποθέσεις για τη χρήση του t-test είναι:

- Τα δεδομένα πρέπει να είναι παραμετρικά, να μετριούνται σε κλίμακα αναλογική ή ίσων διαστημάτων,
- Οι τιμές της μεταβλητής θα πρέπει να προέρχονται από πληθυσμό με κανονική κατανομή (normality tests, Historigram with normal curve)

Η Ανάλυση Διασποράς (Analysis of Variance, ANOVA) είναι μέθοδος στατιστικού ελέγχου υποθέσεων που αναφέρονται σε περισσότερους από δύο πληθυσμούς.
Για την εφαρμογή της μεθόδου υποθέτουμε ότι:

- Οι πληθυσμοί / επίπεδα από τους οποίους προέρχονται οι μετρήσεις έχουν την ίδια διασπορά

- Οι πληθυσμοί κατανέμονται κανονικά. Οι μετρήσεις σε κάθε δείγμα (επίπεδο) είναι ανεξάρτητες και κατανέμονται κανονικά.

Η υπόθεση που εξετάζεται είναι εάν οι μέσοι όλων των ομάδων είναι ίσοι μεταξύ τους, ή υπάρχει τουλάχιστον ένας μέσος που διαφέρει.
Σε περίπτωση που ο έλεγχος One-way ANOVA απορριφθεί, δεν είναι σε θέση να μας δώσει ποιος ήταν ο μέσος που διέφερε σε σχέση με τους υπόλοιπους. Για να προσδιοριστούν οι μέσοι που διαφέρουν μεταξύ τους, θα πρέπει να γίνουν πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων (ανά δύο). Επειδή θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η μείωση στο επίπεδο σημαντικότητας λόγω των πολλαπλών συγκρίσεων, έχουν διαμορφωθεί ορισμένες μέθοδοι, όπως:

- Έλεγχοι που βασίζονται σε προσεγγίσεις pairwise multiple comparisons tests ή range tests (Tukey, Hochberg's GT2, Gabriel, Scheffe),
- Έλεγχοι που κάνουν μόνο πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων τιμών ανά δύο (Bonferroni, Sidak, Dunnett C, LSD-Least Significant Difference).

Η πιο ευρέως διαδεδομένη είναι ο έλεγχος του Tukey (1953) (Tukey's method for paired comparisons), γνωστή και ως HSD test (Honestly Significant Difference test). Στη διαδικασία Tukey, όχι απλώς δεν μας «ξεφεύγει» η πιθανότητα να κάνουμε σφάλμα τύπου I (σφάλμα τύπου I είναι η εσφαλμένη απόρριψη μιας πραγματικής μηδενικής υπόθεσης "ψευδές θετικό", δηλαδή, η απόρριψη μιας αληθινής υπόθεσης θεωρώντας την λάθος) σε τουλάχιστον έναν από τους ελέγχους, αλλά το θέτουμε υπό τον έλεγχό μας, προκαθορίζοντάς το. Δηλαδή, η διαδικασία Tukey, επιτυγχάνει το εξής: η πιθανότητα, μια τουλάχιστον διαφορά i να αναδειχθεί, ενώ δεν είναι, στατιστικά σημαντική, να είναι ίση με α%, που εμείς καθορίσαμε και επομένως προσφέρει μεγάλη προστασία από σφάλματα τύπου I αλλά γι' αυτό θεωρείται (και είναι) συντηρητικός έλεγχος στην ανάδειξη στατιστικά σημαντικών διαφορών.

Ο έλεγχος ελάχιστης σημαντικής διαφοράς LSD (Least Significant Difference) (Fisher, 1935), είναι ο μόνος ο οποίος δε λαμβάνει υπόψη το σφάλμα τύπου I. Είναι ο πλέον ευαίσθητος στην ανάδειξη στατιστικά σημαντικών διαφορών, όμως παρέχει τη μικρότερη προστασία από σφάλματα τύπου I. Αν επιλέξουμε να τον εφαρμόσουμε, πρέπει αφενός οι συγκρίσεις να είναι λίγες, και αφετέρου, να έχει προηγηθεί έλεγχος ανάλυσης διασποράς της μηδενικής υπόθεσης H_0 και αυτή να έχει απορριφθεί (έτσι μπορεί να δικαιολογηθεί και η χρησιμοποίησή του).

Παρατήρηση: Παρότι, για την εφαρμογή των ελέγχων πολλαπλών συγκρίσεων δεν απαιτείται να έχει προηγηθεί έλεγχος ανάλυσης διασποράς της μηδενικής υπόθεσης H_0 και απόρριψή της, εντούτοις, συνηθίζεται να εφαρμόζονται μετά από έλεγχο ανάλυση διασποράς και απόρριψη της H_0. Όμως, ειδικά ο έλεγχος ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (LSD), πρέπει να εφαρμόζεται μόνο μετά από απόρριψη της H_0.

Το τεστ που χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των τιμών ως πιο κατάλληλο, όπως προκύπτει και από τα παραπάνω, είναι το Tukey test.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη διαδικασία ανάπτυξης μεθόδου, επαλήθευσης και υπολογισμού αβεβαιοτήτων στον προσδιορισμό νιτρικών με αναγωγή με VCl_3 σε γλυκό νερό και σε εχυλίσματα εδαφών. Το κεφάλαιο των αποτελεσμάτων χωρίζεται σε τρεις ενότητες:

Α. Ανάπτυξη μεθόδου

Β. Πειράματα σε γλυκό νερό

Γ.Πειράματα σε εκχυλίσματα εδάφους

Α. Ανάπτυξη μεθόδου

6.1 Ανάπτυξη μεθόδου και βελτιστοποίηση συνθηκών

Χρόνος και θερμοκρασία αντίδρασης

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο Κεφάλαιο,συγκρίθηκαν οι απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων νιτρικών με χώνευση στους 60 °C για διάφορους σύντομους χρόνους και με παραμονή για παρατεταμένους χρόνους (από 7ως 48 ώρες).

Καταγράφηκαν οι απορροφήσεις και έγινε σύγκριση με OneWayANOVA (SPSS 17).

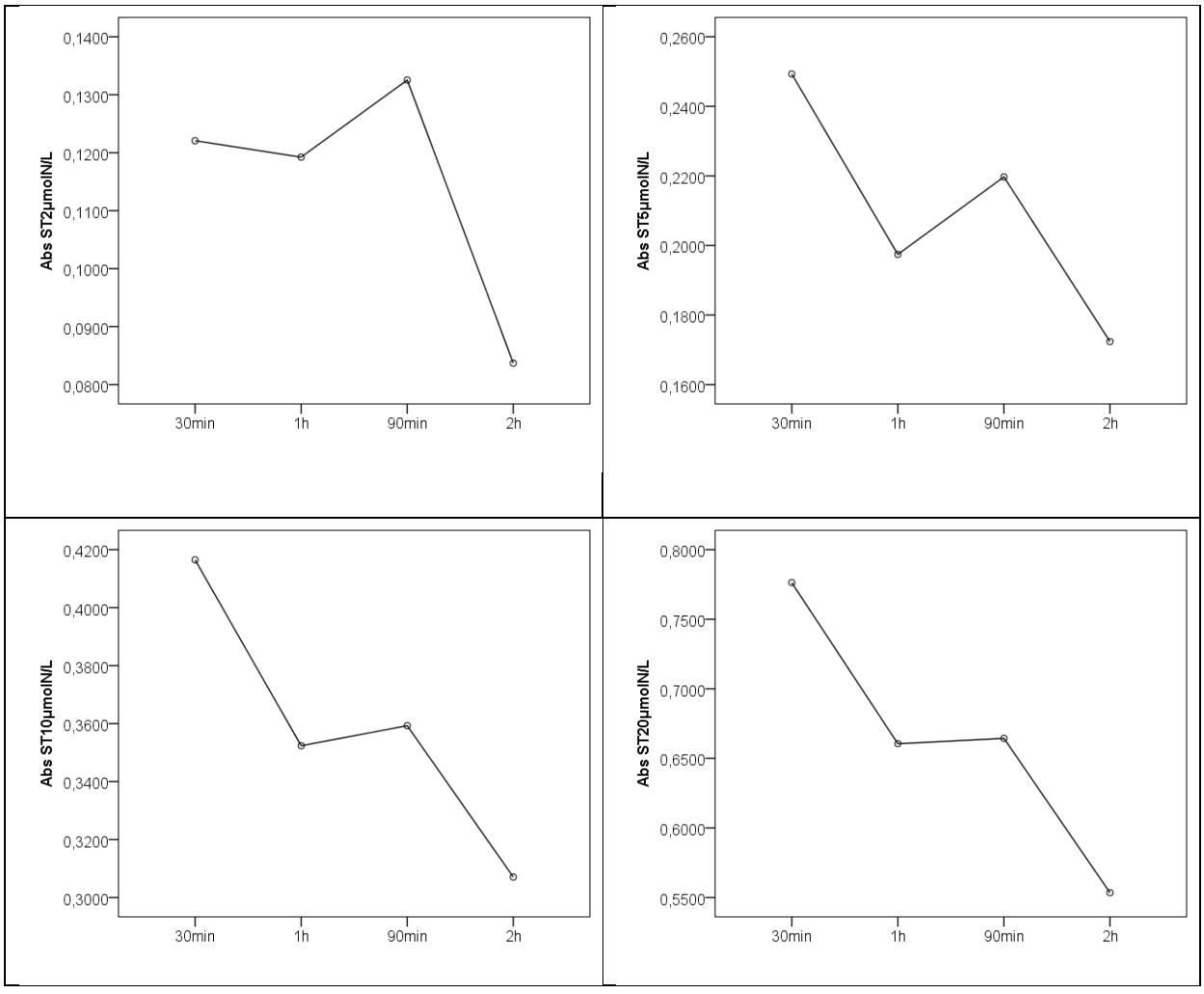
Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το SPSS (έκδοση 17.0) για να γίνει η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων. Για δύο ομάδες τιμών πραγματοποιήθηκε το t-test, ενώ για να γίνει σύγκριση μεταξύ περισσότερων από δύο ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το OneWayANOVA και το Tukey test.

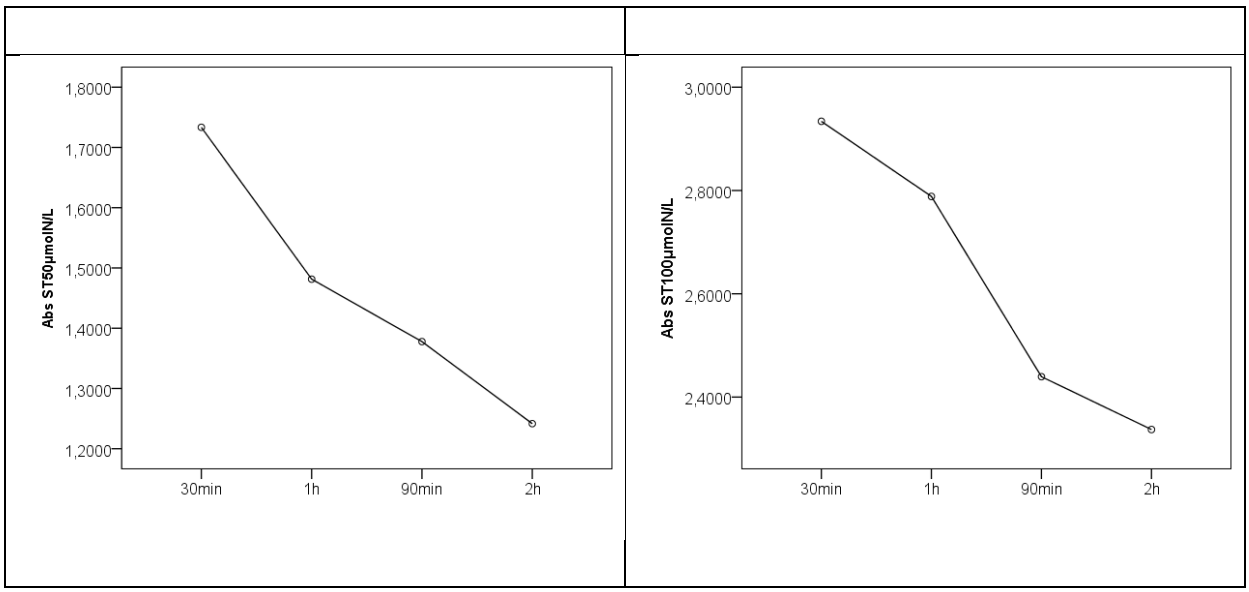
ΠΕΙΡΑΜΑ Α

Έγινε χώνευση στους 60 °C των προτύπων με το αντιδραστήριο ανάπτυξης για διάφορους σύντομους χρόνους (από 30 λεπτά ως 2 ώρες) . Για κάθε συγκέντρωση προτύπου που χωνεύθηκε στους 60°C με το αντιδραστήριο ανάπτυξης για 30-60-90 λεπτά και 2 ώρες παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.1 ο μέσος όρος των τιμών της απορρόφησης (όλες οι συγκεντρώσεις προτύπων μετρήθηκαν εις τριπλούν) και η σύγκριση των μέσων όρων που έγινε με Oneway ANOVA.

Πίνακας 6.1: Μέσος όρος της απορρόφησης κάθε προτύπου μετά από χώνευση στους 60°C για 30-60-90 λεπτά και 2 ώρες και σύγκριση των μέσων όρων με Oneway ANOVA.

Συγκέντρωση προτύπου (μmolN/L)	**Απορρόφηση 30min**	**Απορρόφηση 60 min**	**Απορρόφηση 90 min**	**Απορρόφηση 2h**
2	M.O. = 0,1221	M.O. = 0,1192	M.O. = 0,1325	M.O. = 0,0837
One way anova	***30min = 60 min = 90 min > 2h***			
5	M.O. =0,2493	M.O. =0,1974	M.O. =0,2197	M.O. =0,1724
One way anova	***30min > 90 min >60 min > 2h***			
10	M.O. = 0,4165	M.O. = 0,3524	M.O. = 0,3593	M.O. = 0,3071
One way anova	***30min >60 min = 90 min > 2h***			
20	M.O. = 0,7763	M.O. = 0,6605	M.O. = 0,6644	M.O. = 0,5534
One way anova	***30min >60 min = 90 min > 2h***			
50	M.O. =1,7334	M.O. = 1,4814	M.O. = 1,3778	M.O. = 1,2416
One way anova	***30min >60 min > 90 min > 2h***			
100	M.O. = 2,9339	M.O. = 2,7885	M.O. = 2,4395	M.O. = 2,3372
One way anova	***30min >60 min > 90 min > 2h***			





Εικόνα 6.1: Διαγράμματα means plots για κάθε πρότυπο για τους 4 χρόνους αντίδρασης

Πίνακας 6.2: Ανακτήσεις υλικών αναφοράς στους διαφορετικούς χρόνους χώνευσης

Υλικό / *Χρόνος*	**QC10** **% Ανάκτηση**	**BURTAP** **% Ανάκτηση**
30min	103	139
60min	100	110
90min	103	110
2h	99	109

Τελικά από τα παραπάνω αποτελέσματα, επιλέχθηκε ως χρόνος χώνευσης ένας ενδιάμεσος μεταξύ των 30 και 60 λεπτών, τα 45 λεπτά.

ΠΕΙΡΑΜΑ Β

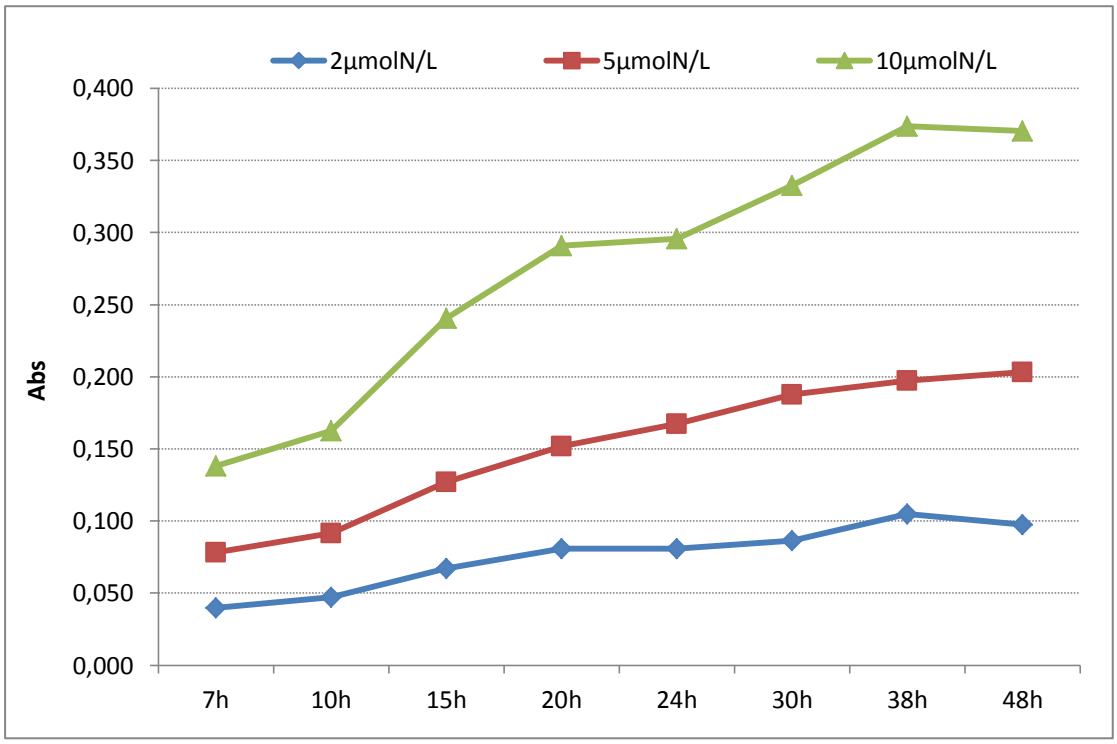
Έγινε ανάμιξη των προτύπων με το αντιδραστήριο ανάπτυξης χρώματος και παραμονή για παρατεταμένους χρόνους (από 7 ως 48 ώρες).

Στο πείραμα αυτό έγινε ανάπτυξη σε πρότυπα νιτρικών σε απιονισμένο νερό (0-20-5-10-20-50-100 μmol/L) εις τριπλούν, τα οποία αφέθηκαν για αρκετές ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και μετρήθηκε μετά η απορρόφησή τους στο φασματοφωτόμετρο. Οι χρόνοι που εφαρμόστηκαν ήταν 7-10-15-20-24-30-38 και 48 ώρες. Ο μέσος όρος των τιμών της απορρόφησης δίνεται στον Πίνακα 5.3.

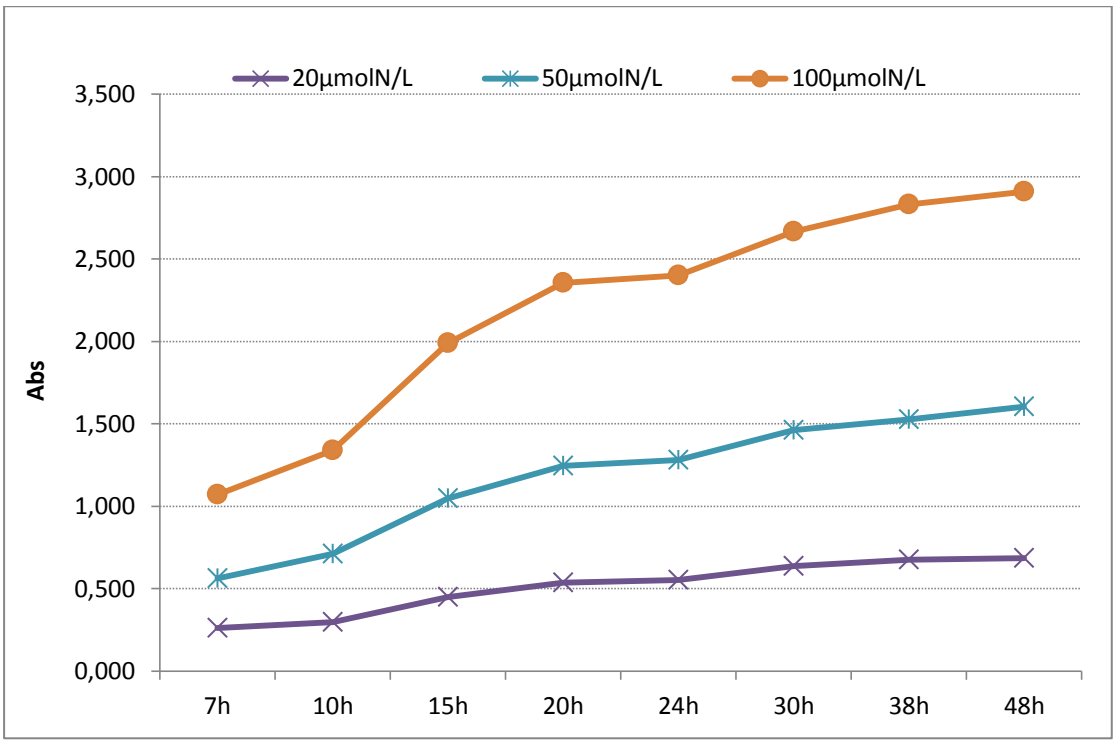
Πίνακας 6.3: Μέσος όρος της απορρόφησης των προτύπων νιτρικών μετά από ανάπτυξη σε απιονισμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου για διαφορετικά χρονικά διαστήματα

Συγκέντρωση προτύπου (μmolN/L)	**7h**	**10h**	**15h**	**20h**	**24h**	**30h**	**38h**	**48h**
2	M.O. =0,0398	M.O. =0,0473	M.O. =0,0672	M.O. =0,0809	M.O. =0,0808	M.O. =0,0863	M.O. =0,1048	M.O. =0,0974
5	M.O. =0,0782	M.O. =0,0916	M.O. =0,1270	M.O. =0,1519	M.O. =0,1672	M.O. =0,1876	M.O. =0,1972	M.O. =0,2031
10	M.O. =0,1381	M.O. =0,1624	M.O. =0,2407	M.O. =0,2910	M.O.= 0,2955	M.O. =0,3326	M.O. =0,3737	M.O. = 0,3705
20	M.O. = 0,2619	M.O. = 0,2982	M.O. =0,4493	M.O. =0,5372	M.O. = 0,5540	M.O. =0,6382	M.O. =0,6769	M.O. = 0,6840
50	M.O. = 0,5633	M.O. = 0,7124	M.O. =1,0474	M.O. =1,2444	M.O. =1,2809	M.O. = 1,4605	M.O. =1,5262	M.O. = 1,6058
100	M.O. = 1,0719	M.O. = 1,3381	M.O. =1,9908	M.O. =2,3559	M.O. = 2,3988	M.O. =2,6655	M.O. =2,8300	M.O. = 2,9098

Στα διαγράμματα που ακολουθούν φαίνεται η μεταβολή των μέσων απορροφήσεων των προτύπων με το χρόνο.



Εικόνα 6.2: Διαγράμματα μεταβολής των μέσων απορροφήσεων των προτύπων 2-5-10μmolN/L που αφέθηκαν για ανάπτυξη 7-10-15-20-24-30-38 και 48 ώρες με το χρόνο



Εικόνα 6.3: Διαγράμματα μεταβολής των μέσων απορροφήσεων των προτύπων 20-50-100μmol/L που αφέθηκαν για ανάπτυξη 7-10-15-20-24-30-38 και 48 ώρες με το χρόνο

Για κάθε συγκέντρωση προτύπου νιτρικών που χωνεύθηκε στους 60 °C για 1 ώρα (επιλεγμένος χρόνος) και των προτύπων που αναπτύχθηκαν σε απιονισμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου και αφέθηκε για ανάπτυξη 48 ώρες (επιλεγμένος χρόνος) παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.4 οι μέσοι όροι και το αποτέλεσμα της σύγκρισής τους με t-test.

Πίνακας 6.4: Μέσοι όροι της απορρόφησης των προτύπων μετά από Α) χώνευση στους 60°C για 1 ώρα και Β) ανάπτυξη σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες και το αποτέλεσμα της σύγκρισής τους με t-test

Συγκέντρωση προτύπου νιτρικών (μmolN/L)	**1ώρα χώνευση**	**48h (θ δωματίου)**	**t-test**
2	Μ.Ο. =0,1192	Μ.Ο. = 0,0974	ΙΣΑ
5	Μ.Ο. = 0,1974	Μ.Ο. = 0,2031	ΙΣΑ
10	Μ.Ο. = 0,3524	Μ.Ο. = 0,3705	ΑΝΙΣΑ
20	Μ.Ο. = 0,6605	Μ.Ο. = 0,6840	ΙΣΑ
50	Μ.Ο. = 1,4814	Μ.Ο. = 1,6058	ΑΝΙΣΑ
100	Μ.Ο. = 2,7885	Μ.Ο. = 2,9098	ΑΝΙΣΑ

Αποφασίστηκε τα υπόλοιπα πειράματα (επαναληψιμότητας, αναπαραγωγιμότητας και ορθότητας) καθώς και ο προσδιορισμός σε πραγματικά δείγματα να γίνουν με 45 λεπτά χώνευση για την ανάπτυξη του χρώματος προκειμένου να υπάρχει οικονομία χρόνου.

Δεδομένου ότι η αντίδραση στην οποία βασίζεται η μέθοδος προσδιορισμού που εξετάζεται είναι η αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και η ποσοτικοποιήση των νιτρωδών κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η συμπεριφορά που έχουν διαλύματα νιτρωδών με τη θέρμανση ή την παραμονή με μικτό διάλυμα αναγωγής – ανάπτυξης (χλωριούχο βανάδιο - σουλφανιλαμίδιο - ναφθυλ-αιθυλένο διαμίνη). Άρα παρασκευάστηκαν πρότυπα νιτρωδών στις ίδιες συγκεντρώσεις με τα νιτρικά (2-5-10-20-50-100μmolN/L) και μετρήθηκαν εις τριπλούν με θέρμανση 45 λεπτά και με παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.5

Πίνακας 6.5: Μέσοι όροι κάθε προτύπου NO_2 έπειτα από Α)θέρμανση για 45 λεπτά και Β) με παραμονή χωρίς θέρμανση για 45 λεπτά, και το αποτέλεσμα της σύγκρισής τους με t-test.

Συγκέντρωσηπροτύπου (μmolN/L)	**NO_2 45min χώνευση**	**NO_2 45 min παραμονή**	**t-test**
2	Μ.Ο. =0,1221	Μ.Ο. =0,0909	ΑΝΙΣΑ
5	Μ.Ο. = 0,2131	Μ.Ο. =0,1848	ΙΣΑ
10	Μ.Ο. =0,3455	Μ.Ο. =0,3375	ΙΣΑ
20	Μ.Ο. =0,6556	Μ.Ο. =0,6370	ΙΣΑ
50	Μ.Ο. =1,4395	Μ.Ο. =1,4728	ΙΣΑ

100	M.O. =2,6573	M.O. =2,6846	ΙΣΑ

Δεν παρατηρείται στατιστική διαφορά και μάλιστα η θέρμανση έχει σαν αποτέλεσμα την επίτευξη λίγο υψηλότερων απορροφήσεων.

Επίσης συγκρίθηκε η απόκριση σε 45 λεπτά χώνευσης προτύπων νιτρικών με πρότυπα νιτρωδών για τον υπολογισμό και της % αναγωγικής ικανότητας της αντίδρασης. Για κάθε πρότυπο παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.6 οι μέσοι όροι (καθώς οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν) και το αποτέλεσμα της σύγκρισής τους με t-test καθώς και η %αναγωγική ικανότητα της αντίδρασης

Πίνακας 6.6: Μέσοι όροι προτύπων NO_2 και NO_3 έπειτα από θέρμανση για 45 λεπτά, σύγκριση με t-test καθώς και %αναγωγική ικανότητα της αντίδρασης

Συγκέντρωση προτύπου (μmolN/L)	**NO_2 45min χώνευση**	**NO_3 45min χώνευση**	**t-test**	**% αναγωγική ικανότητα ($AbsNO_3$*100/$AbsNO_2$)**
2	ΜΟ = 0,1221	ΜΟ = 0,1229	ΙΣΑ	101
5	ΜΟ = 0,2131	ΜΟ = 0,2103	ΙΣΑ	99
10	ΜΟ = 0,3455	ΜΟ = 0,3640	ΑΝΙΣΑ	105
20	ΜΟ = 0,6556	ΜΟ = 0,6612	ΙΣΑ	101
50	ΜΟ = 1,4395	ΜΟ = 1,4114	ΙΣΑ	98
100	ΜΟ = 2,6573	ΜΟ = 2,5250	ΑΝΙΣΑ	95

Η θεωρητική απόκριση είναι η χώνευση νιτρικών να δίνει μικρότερες απορροφήσεις από τη χώνευση νιτρωδών λόγω μη πλήρους αντίδρασης. Φαίνεται όμως στα 3 πρότυπα οριακά αυξημένη απορρόφηση που δίνει % αναγωγική ικανότητα μεγαλύτερη από το 100. Αυτό πιθανά οφείλεται σε μικροσφάλματα σε όγκους κατά τις διάφορες αραιώσεις (είτε των προτύπων ή στην μεταφορά των διαλυμάτων και την τελική αραίωση στην ανάπτυξη του χρώματος ακόμα και στις διαφορές των φυγοκεντρικών σωλήνων μεταξύ τους). Φαίνεται πάντως πολύ καλή αναγωγική ικανότητα της αντίδρασης, μεγαλύτερη από 95%.

Β. Πειράματα σε γλυκό νερό

6.2 Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Στον Πίνακα 6.7 δίνεται το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης που προέκυψε από 10 μετρήσεις 2 χαμηλών δειγμάτων (περίπου 0,5 και 1 μmolN/L) έπειτα από χώνευσή τους για 45 λεπτά. Δίνονται επίσης οι ακριβείς τιμές και η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 6.7: Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, ακριβείς τιμές και τυπική απόκλιση που προέκυψαν από 10 μετρήσεις 2 χαμηλών δειγμάτων έπειτα από χώνευσή τους για 45 λεπτά.

ΧΑΜΗΛΟ ΔΕΙΓΜΑ 1	**ΧΑΜΗΛΟ ΔΕΙΓΜΑ 2**

4-9/5/2017	**μmolN/L**	**μmolN/L**
1	0,73	1,77
2	0,80	1,69
3	1,14	1,31
4	0,84	1,73
5	0,71	1,17
6	0,67	1,38
7	0,98	1,46
8	1,04	1,43
9	0,97	1,50
10	0,97	1,77
Τυπική απόκλιση	0,16	0,20
LOD	**0,45**	**0,57**
LOQ = 3,3*LOD	**1,47**	**1,87**

Από τα 2 αποτελέσματα LOD, το πρώτο (Πίνακας 6.7) είναι μάλλον πολύ χαμηλό. **Άρα επιλέγεται το όριο ανίχνευσης 0,6 μmolN/L και το ποσοτικοποίησης τα 2μmolN/L που είναι και το πρώτο πρότυπο της καμπύλης αναφοράς.**

Τιμές μεταξύ 0,6 και 2μmolN/L θα δίνονται όπως μετρούνται με την επισήμανση ότι είναι μικρότερες από το όριο ποσοτικοποίησης και τιμές μικρότερες από 0,6 μmolN/L θα δίνονται ίσες με αυτό το όριο ανίχνευσης.

6.3 Περιγραφή υδατικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα επαλήθευσης

Στον Πίνακα 6.8 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις νιτρικών και νιτρωδών σε Δείγματα, Συνθετικά δείγματα και Υλικά αναφοράς, καθώς και το είδος των πειραμάτων και η χρονική διάρκειά τους.

Πίνακας 6.8: Συγκεντρώσεις νιτρικών και νιτρωδών σε Δείγματα / Συνθετικά δείγματα / Υλικά αναφοράς, καθώς και το είδος των πειραμάτων και η χρονική διάρκειά τους

ΥΛΙΚΟ	**NO_3+NO_2 σε ($mgNO_3$/L)//(μmol N/L)**	**Πειράματα-Διάρκεια**
ΠΗΓΗ ΑΓΙΑΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ (Θεσσαλία)	-	Επαναληψιμότητα + Αναπαραγωγιμότητα (21-24/7/2015)
Δ1 (νερό βρύσης με προσθήκη νιτρικών)	~ 20mg/L // (333 μmol/L)	Επαναληψιμότητα (22/7/2015)
Δ2 (νερό βρύσης με προσθήκη	~50mg/L // (806μmol/L)	Επαναληψιμότητα

νιτρικών)		(22/7/2015)
Δ3 (νερό βρύσης με προσθήκη νιτρικών)	~10μmol/L	Ισοδυναμία μεθόδων προσδιορισμού νιτρικών με στήλη Cd και VCl_3
TAP1 (νερό βρύσης με προσθήκη νιτρικών)	~ 2mg/L // (30μmol/L)	Επαναληψιμότητα + Αναπαραγωγιμότητα (Ιαν-Φεβ 2016)
TAP2 (νερό βρύσης με προσθήκη νιτρικών)	~ 6mg/L // (80μmol/L)	Επαναληψιμότητα + Αναπαραγωγιμότητα (Ιαν-Φεβ 2016)
BURTAP (CRM νερό βρύσης)	1,95 ± 0,22mg/L // (31,4 ± 3,6 μmol/L)	Επαναληψιμότητα + Αναπαραγωγιμότητα (Ιαν-Φεβ 2016)
ERM-CA408 (CRM βρόχινο νερό)	2,01 ± 0,09mg/L // (32,4 ± 1,4 μmol/L)	Επαναληψιμότητα + Αναπαραγωγιμότητα (Ιαν-Φεβ 2016)
QC10	Παρασκευάζεται από πυκνό πρότυπο νιτρικών ανεξάρτητο από αυτό που χρησιμοποιείται για τα πρότυπα εργασίας	

6.4 Κλίσεις και τομές σε καμπύλες αναφοράς νιτρικών

Οι κλίσεις και οι τομές των καμπυλών αναφοράς των νιτρικών ιόντων δίνονται ώστε να έχουμε ένα εύρος για επιτρεπτές κλίσεις και να σχολιάσουμε τη γραμμικότητα (από τον συντελεστή R). Όλες οι μετρήσεις έγιναν με νερό στη θέση αναφοράς.

Πίνακας 6.9: Κλίσεις ,τομές και συντελεστής συσχέτισης Pearson σε καμπύλες αναφοράς νιτρικών οι οποίες μετρήθηκαν διαφορετικές μέρες. Δίνεται επίσης η τυπική απόκλιση των μετρήσεων, ο μέσος όρος, η μέση κλίση (ή μέση τομή ή μέσος R^2)-2SD και +2SD αντίστοιχα

A/A	Ημερομηνία	Κλίση (a)	Τομή (b)	R^2	A/A	Ημερομηνία	Κλίση (a)	Τομή (b)	R^2
1	13/1/2016	0,0285	0,1103	0,998	20	22/7/2017	0,0212	0,0399	0,9992
2	13/1/2016	0,027	0,0797	0,9993	21	23/7/2017	0,0227	0,0347	0,9996
3	13/1/2016	0,0283	0,0846	0,9991	22	23/7/2015	0,0235	0,0252	0,9999
4	14/1/2016	0,0253	0,1006	0,9979	23	24/7/2015	0,0207	0,0324	0,9981
5	14/1/2016	0,0264	0,09	0,9985	24	24/7/2015	0,0204	0,0361	0,9983
6	14/1/2016	0,0286	0,0902	0,9984	25	27/4/2017	0,0185	0,0404	0,9996
7	15/1/2016	0,0265	0,0834	0,9986	26	4/5/2017	0,019	0,0474	0,9988
8	15/1/2016	0,0257	0,122	0,9967	27	31/5/2017	0,0194	0,0632	0,9989
9	21/1/2016	0,027	0,1001	0,9979	28	31/5/2017	0,0185	0,0653	0,9985
10	26/1/2016	0,0251	0,0889	0,9957	29	1/6/2017	0,0177	0,0506	0,9988
11	27/1/2016	0,0241	0,0819	0,9983	30	2/6/2017	0,0199	0,0579	0,9995
12	29/1/2016	0,0251	0,0871	0,9956	31	14/6/2017	0,0186	0,0914	0,9973
13	2/2/2016	0,0263	0,0624	0,999	32	14/6/2017	0,02	0,0683	0,9978
14	7/2/2016	0,0261	0,0776	0,9962	33	15/6/2017	0,0183	0,0676	0,9981
15	17/2/2016	0,0254	0,0701	0,9981	34	27/6/2017	0,0207	0,0413	0,9999
16	23/2/2016	0,0248	0,0821	0,9978	35	28/6/2017	0,0178	0,0661	0,9996
17	24/2/2016	0,0268	0,0813	0,9978	36	28/6/2017	0,0192	0,0599	0,9997
18	21/7/2015	0,0224	0,023	0,9997	37	4/7/2017	0,0174	0,1134	0,9945
19	22/7/2015	0,0227	0,0188	0,9997	38	5/7/2017	0,0203	0,0779	0,9989

Τυπική απόκλιση (SD)	0,0036	0,0262	0,0013
Μέσος όρος	**0,0228**	**0,0688**	**0,9984**
Μέση Κλίση (ή μέση τομή ή μέσοςR^2)-2SD	**0,0157**	**0,0163**	**0,9958**
Μέση Κλίση (ή μέση τομήή μέσοςR^2) +2SD	**0,0299**	**0,1212**	**1,0000**

6.5 Ισοδυναμία μεθόδων προσδιορισμού νιτρικών με στήλη Cd και VCl_3

Μετρήθηκε η απορρόφηση του ίδιου δείγματος νερού (Δ3) αφού έγινε η αναγωγή του σε στήλη καδμίου και μετά την αναγωγή του με χλωριούχο βανάδιο και υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις νιτρικών (μmolN/L) που περιέχει. Η αναγωγή με την κάθε μία από τις δύο μεθόδους έγινε >6 φορές. Για την κάθε μέθοδο υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών και η %RSD ώστε να υπολογιστεί αν υπάρχει κάποια στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων μετά από τη σύγκρισή τους με t-test. Τα παραπάνω παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.10.

Πίνακας 6.10: Σύγκριση συγκεντρώσεων νιτρικών, μέσος όρος και %RSD στο ίδιο δείγμα νερού μετά την αναγωγή του Α. σε στήλη καδμίου και Β. με χλωριούχο βανάδιο

Δείγμα νερού (μmolN/L)		
Με στήλη Cd (1)	**Με στήλη Cd (2)**	**Με VCl_3**
10,7	10,7	11,5
9,3	10,9	10,2
10,2	10,8	11,0
8,3	10,7	11,6
	10,4	10,2
		10,8
ΜΟ =10,2		M.O. = 10,9
%RSD = 8,4		%RSD = 5,6
t-test ΙΣΑ		

Από την σύγκριση των δύο πληθυσμών με t-test προέκυψε ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων. Άρα και οι δύο μέθοδοι παράγουν τα ίδια αποτέλεσματα.
Λόγω όμως των μειονεκτημάτων της στήλης καδμίου που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο (πιθανή τοξικότητα του μετάλλου, διακυμάνσεις στην απόδοση της αντίδρασης αναγωγής ανάλογα με τον αριθμό και τη φύση των δειγμάτων που διέρχονται από τη στήλη, δυσκολίες στην ανάλυση μικρών όγκων κλπ), **η μέθοδος που επιλέγεται πλέον στο εργαστήριο για την αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε νιτρώδη λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων της είναι το χλωριούχο βανάδιο και η αντίδραση Griess (με σουλφανιλαμίδιο και ναφθυλ-αιθυλένο-διαμίνη)**.

6.6 Ορθότητα

Για τον υπολογισμό της ορθότητας πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και μέτρηση των νιτρικών ιόντων (μαζί με τα νιτρώδη) των πιστοποιημένων υλικών αναφοράς BURTAP (CRM νερό βρύσης) και RAINWATER (ERM-CA408) σε διαφορετικές μέρες. Για κάθε μέτρηση υπολογίστηκε η **%** Ανάκτηση.

Πίνακας 6.11: Ανάπτυξη και μέτρηση BURTAP και RAINWATER σε διαφορετικές μέρες

A/A	**BURTAP**		**RAINWATER**	
	Μετρούμενη NO_3+NO_2 (μmolN/L)	**% Ανάκτηση**	**Μετρούμενη NO_3+NO_2 (μmolN/L)**	**% Ανάκτηση**
1	30,55	97	35,25	109
2	31,29	99	32,60	101
3	31,49	100	32,14	99
4	31,36	99	32,45	100
5	32,24	102	34,41	106
6	30,35	96	34,25	106
7	30,65	97	35,00	108
8	34,25	109	36,51	113
9	32,07	102	33,19	102
10	31,90	101	33,17	102
11	33,63	107	34,23	106
12	33,43	106	34,49	106
13	32,37	103	35,23	109
14	32,97	104	34,41	106
ΜΟ	**32,04**	**102**	**34,10**	**105**

6.7 Επαναληψιμότητα

Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και μέτρηση των νιτρικών ιόντων (μαζί με τα νιτρώδη) σε πολλαπλά υποδείγματα από κάθε δείγμα που συλλέχθηκε ή παρασκευάστηκε (ΠΗΓΗ, Δ1, Δ2) την ίδια μέρα με ίδια καμπύλη αναφοράς. Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.12, για κάθε δείγμα (ΠΗΓΗ, Δ1, Δ2) υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι, τυπική απόκλιση (SD) και %σχετική τυπική απόκλιση (%RSD).

Έγινε επίσης ανάπτυξη χρώματος σε πολλαπλά υποδείγματα από κάθε δείγμα (CRM ή παρακευασμένο με γνωστή προσθήκη TAP1, TAP2, BURTAP, RAINWATER) την ίδια μέρα με ίδια καμπύλη αναφοράς. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.13, για κάθε δείγμα (TAP1, TAP2, BURTAP, RAINWATER) υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι, τυπική απόκλιση (SD) και %σχετική τυπική απόκλιση (%RSD).

Πίνακας 6.12: Ανάπτυξη χρώματος σε πολλαπλά υποδείγματα από κάθε δείγμα που συλλέχθηκε ή παρασκευάστηκε (ΠΗΓΗ, Δ1, Δ2) την ίδια μέρα με ίδια καμπύλη αναφοράς τον Ιούλιο 2015.

ΔΕΙΓΜΑ	**ΠΗΓΗ**	**Δ1**	**Δ2**
Επανάληψη	**NO_3+NO_2 (μmol N/L)**		
1	14,6	299,9	752,7
2	15,0	283,3	783,9
3	14,3	293,5	778,7
4	14,0	284,1	779,6
5	14,2	301,4	779,1
6	14,4	295,6	800,2
7	14,0	299,0	768,3
Τυπ. απόκλ. (SD)	**0,35**	**74**	**14,5**
Μέσος όρος (MO)	**14,37**	**293,8**	**777,5**
%RSD (SD×100/MO)	**2,4**	**2,5**	**1,9**

Πίνακας 6.13: Ανάπτυξη χρώματος σε πολλαπλά υποδείγματα από κάθε δείγμα (TAP1, TAP2, BURTAP, RAINWATER) την ίδια μέρα με ίδια καμπύλη αναφοράς τον Ιανουάριο 2016.

ΔΕΙΓΜΑ	**TAP1**	**BURTAP**	**RAINWATER**	**TAP2**
Επανάληψη	**NO_3+NO_2 (μmol N/L)**			
1	26,55	30,55	35,3	79,6
2	27,04	31,29	32,6	80,9
3	26,25	31,49	32,1	81,9
4	26,35	31,36	32,4	80,4
5	27,10	32,24	34,4	81,5
6	26,55	30,35	34,3	79,7
7	26,69	30,65	35,0	80,9
Τυπ. απόκλ. (SD)	**0,32**	**1,03**	**1,30**	**0,87**
Μέσος όρος (MO)	**26,64**	**31,13**	**33,73**	**80,70**
%RSD (SD×100/MO)	**1,2**	**2,1**	**3,8**	**1,1**

6.8 Αναπαραγωγιμότητα

Για τον υπολογισμό της αναπαραγωγιμότητας έγινε ανάπτυξη χρώματος σε πολλαπλά υποδείγματα από κάθε δείγμα (CRM ή παρακευασμένο με γνωστή προσθήκη ΤΑΡ1, ΤΑΡ2, BURTAP, RAINWATER, ΠΗΓΗ) σε άλλες μέρες, δηλαδή με διαφορετικές καμπύλες αναφοράς. Για κάθε δείγμα (ΠΗΓΗ, ΤΑΡ1, ΤΑΡ2, BURTAP, RAINWATER) υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι, τυπική απόκλιση (SD) και %σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) και δίνονται στον Πίνακα 6.14.

Πίνακας 6.14: Ανάπτυξη χρώματος σε πολλαπλά υποδείγματα από κάθε δείγμα (ΠΗΓΗ, ΤΑΡ1, ΤΑΡ2, BURTAP, RAINWATER) σε άλλες μέρες, δηλαδή με διαφορετικές καμπύλες τον Ιούλιο 2015 και τον Ιανουάριο 2016.

ΔΕΙΓΜΑ	**ΠΗΓΗ**	**ΤΑΡ1**	**BURTAP**	**RAINWATER**	**ΤΑΡ2**
Επανάληψη	**NO_3+NO_2 (μmol N/L)**				
1	14,37	26,64	31,13	33,73	80,70
2	12,9	26,11	34,25	36,51	77,62
3	13,3	27,53	32,07	33,19	78,91
4	12,4	26,67	31,90	33,17	80,89
5	14,1	26,66	33,63	34,23	81,32
6	12,4	26,66	33,43	34,49	80,53
7	13,6	25,49	32,37	35,23	78,60
8	-	24,86	32,97	34,41	
Τυπ. απόκλ. (SD)	**0,84**	**0,83**	**1,03**	**1,11**	**1,4**
Μέσος όρος (ΜΟ)	**13,28**	**26,33**	**32,72**	**34,37**	**79,8**
%RSD (SD×100/ΜΟ)	**6,4**	**3,1**	**3,2**	**3,2**	**1,8**

6.9 Υπολογισμοί ισοζυγίων αβεβαιότητας

Για την εκτίμηση της αβεβαιότητας του αποτελέσματος θα παρουσιαστούν δύο προσεγγίσεις. Στα δείγματα Δ1 και Δ2 είναι διαθέσιμα στοιχεία επαναληψιμότητας και ορθότητας. Για να είναι πληρέστερη η προσέγγιση της αβεβαιότητας θα υπολογιστούν και οι συνιστώσες αβεβαιότητας από τα ογκομετρικά σκεύη (μεταγγίσεις δειγμάτων και προτύπων) και η συνιστώσα από την καμπύλη βαθμονόμησης. Για τα υπόλοιπα δείγματα (επειδή υπάρχουν δεδομένα αναπαραγωγιμότητας-ορθότητας (μετρήσεις σε διαφορετικές μέρες με άλλες καμπύλες) και θεωρώντας ότι οι συνεισφορές αβεβαιότητας από τις μεταφορές όγκων δειγμάτων και προτύπων στους φυγοκεντρικούς σωλήνες και από την καμπύλη βαθμονόμησης εντάσσονται μέσα στην αναπαραγωγιμότητα αυτές δεν θα υπολογιστούν ξεχωριστά.

6.9.1 Ισοζύγια αβεβαιότητας για τα δείγματα BURTAP-RAINWATER- ΠΗΓΗ-ΤΑΡ1-ΤΑΡ2

Συνιστώσες ισοζυγίου

Για τα δείγματα BURTAP-RAINWATER-ΠΗΓΗ-ΤΑΡ1-ΤΑΡ2:

- Αναπαραγωγιμότητα,
- Αβεβαιότητα μεταφοράς όγκων δείγματος και μικτού αντιδραστηρίου
- Ορθότητα

Α. Επίπεδο δειγμάτων BURTAP-RAINWATER

- ***Αναπαραγωγιμότητα***

Η %σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) ήταν και για τα δύο δείγματα 3,2%. Αυτό μετετρέπεται σε σχετική τυπική αβεβαιότητα αναπαραγωγιμότητας 0,0320.

- ***Συνεισφορές αβεβαιότητας από τη μεταφορά όγκων στο φυγοκεντρικό σωλήνα***

Έγιναν επαναλαμβανόμενες μεταφορές (n=16) όγκων 2 και 3 mL (απιονισμένου νερού) σε φυγοκεντρικούς σωλήνες και ζυγίστηκαν οι ποσότητες. Θεωρείται πυκνότητα 1g/L. Άρα οι ζυγίσεις μετατρέπονται απευθείας σε όγκους. Ο μέσος όρος όγκου για τα 2 mL ήταν 1,971mL με τυπική απόκλιση 0,0367mL. Ο μέσος όρος όγκου για τα 3 mL ήταν 2,966mL με τυπική απόκλιση 0,0508mL.

Επίδραση θερμοκρασίας : θερμοκρασιακή μεταβολή εργαστηρίου ± 8°C και Συντελεστής διαστολής του νερού : 2,1·10-4 $°C^{-1}$

2mL	3mL
$u_{temp,1} = \frac{1{,}971 \times 8 \times 2{,}1 \cdot 10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0{,}0019$ mL	$u_{temp,1} = \frac{2{,}966 \times 8 \times 2{,}1 \cdot 10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0{,}0029$ mL

$$u_{vol-1} = \sqrt{{u_{sd1}}^2 + {u_{temp,1}}^2} = \sqrt{0{,}0367^2 + 0{,}0019^2} = \sqrt{0{,}0014} = 0{,}0367 \text{ mL}$$

$$u_{vol-2} = \sqrt{u_{sd2}{}^2 + u_{temp,2}{}^2} = \sqrt{0{,}0508^2 + 0{,}0029^2} = \sqrt{0{,}0026} = 0{,}0509 \text{ mL}$$

- ***Ορθότητα***

Οι πιστοποιημένες τιμές νιτρικών για τα υλικά αναφοράς BURTAP και RAINWATER είναι: για το BURTAP (CRM νερό βρύσης) 31,4 ± 3,6 μmol/L και για το ERM-CA408 (CRM βρόχινο νερό) 32,4 ± 1,4 μmol/L. Με βάση τα πιστοποιητικά των υλικών τα εύρη 3,6 και 1,4 μmolN/L είναι διευρυμένες αβεβαιότητες και αναφέρεται ότι πρέπει να διαιρεθούν με k=2 (συντελεστής για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% στην κανονική κατανομή) προκειμένου να μετατραπεί σε τυπική αβεβαιότητα (τυπική απόκλιση).

Χρησιμοποιούμε υπολογιστικό φύλλο Excel (το οποίο φαίνεται στην Εικόνα 6.4) και εισάγουμε τις πιστοποιημένες τιμές των υλικών, τις τυπικές αποκλίσεις τους (1/2 της διευρυμένης αβεβαιότητας στα πιστοποιητικά), καθώς και το μέσο όρο των τιμών που μετρήθηκαν στο εργαστήριο με την τυπική απόκλιση των 14 μετρήσεων. Ορίζουμε επίσης 14 και τον αριθμό των επαναλήψεων της πιστοποιημένης τιμής. Από τους τύπους που αναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο 3 προκύπτει η % τυπική αβεβαιότητα της ορθότητας. Για να μετατραπεί σε τυπική αβεβαιότητα διαιρείται με 100. Επειδή τα επίπεδα αζώτου είναι παρόμοια και στα δύο υλικά, υπολογίστηκε ο μέσος όρος από τις δύο RSDbias (0,0183 και 0,0117) που είναι 0,0150.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΕΚΠΑ

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ CRM

Συμπληρώνονται μόνο τα κίτρινα πεδία.

Ημερομηνία :

Είδος δοκιμής : **Προσδιορισμός αθροίσματος νιτρικών-νιτρωδών σε γλυκό νερό**

Κωδικός CRM :	**BURTAP**					
Πιστοποιημένη τιμή (μ)	= 31,4		μ	=	31,4	
SD πιστοποιημένης τιμής (u_μ)	= 1,8		$(u_\mu)/SQRT(n_\mu)$	=	0,48107	
Αριθμ. μετρήσεων πιστοπ. τιμής (n_μ)	= 14					
Μέσος όρος μετρούμενης τιμής (x)	= 32,04		x	=	32,04	
SD μετρούμενης τιμής (u_x)	= 1,20		$(u_x)/SQRT(n_x)$	=	0,32069	
Αριθμ. επαναλήψεων εργαστ. (n_x)	= 14					
$(u_\mu/SQRT(n_\mu))/\mu$	= 0,015321					
$(u_x/SQRT(n_x))/x$	= 0,010009		**% RSD_{bias}**	=	**1,83**	%
SQRT(SUMSQ)	= 0,018300		**RSD_{bias}**	=	**0,0183**	
Κωδικός CRM :	**RAINWATER**					
Πιστοποιημένη τιμή (μ)	= 32,4		μ	=	32,4	
SD πιστοποιημένης τιμής (u_μ)	= 0,7		$(u_\mu)/SQRT(n_\mu)$	=	0,18708	
Αριθμ. μετρήσεων πιστοπ. τιμής (n_μ)	= 14					
Μέσος όρος μετρούμενης τιμής (x)	= 34,07		x	=	34,0716	
SD μετρούμενης τιμής (u_x)	= 1,29		$(u_x)/SQRT(n_x)$	=	0,34532	
Αριθμ. επαναλήψεων εργαστ. (n_x)	= 14					
$(u_\mu/SQRT(n_\mu))/\mu$	= 0,005774					
$(u_x/SQRT(n_x))/x$	= 0,010135		**% RSD_{bias}**	=	**1,17**	%
SQRT(SUMSQ)	= 0,011665		**RSD_{bias}**	=	**0,0117**	

Εικόνα 6.4: Εκτίμηση ορθότητας με υλικά αναφοράς

Αφού υπολογίστηκαν οι συνιστώσες του ισοζυγίου για τα υλικά αναφοράς BURTAP και RAINWATER γίνεται το ισοζύγιο αβεβαιότητας για τα δύο επίπεδα των νιτρικών ιόντων (31 και 34 μmolN/L), όπως φαίνεται και στον Πίνακα 6.15.

Πίνακας 6.15: Ισοζύγιο αβεβαιότητας για επίπεδο αζώτου (νιτρικών) 31 και 34 μmolN/L, όπως προέκυψε από τα δύο υλικά αναφοράς BURTAP και RAINWATER

Πηγές Αβεβαιότητας Επίπεδα (31 και 34 μmol/L)	**Τιμή (x_i)**	**Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)$]**	**Σχετική Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)/x_i$]**
Αναπαραγωγιμότητα	1	0,0320	0,0320
Αβεβαιότητα ορθότητας	1	0,0150	0,0150
Μεταφορά δείγματος 3mL σε φυγοκεντρικό σωλήνα	2,966	0,0509	0,0172
Μεταφορά μικτού 2mL σε φυγοκεντρικό σωλήνα	1,971	0,0367	0,0186
Μέγιστη/5	0,0102		
Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα :			0,044
% Διευρυμένη αβεβαιότητα :			9

Β. Δείγματα ΠΗΓΗ, TAP1 και TAP2

Για τα δείγματα ΠΗΓΗ, TAP1 και TAP2 ισχύουν τα παραπάνω όπως για τα BURTAP και RAINWATER για τη συνεισφορά αβεβαιότητας από τη μεταφορά όγκων στο φυγοκεντρικό σωλήνα καθώς και για τη συνεισφορά ορθότητας. Άρα προκύπτουν οι εξής πίνακες ισοζυγίων για κάθε ένα από τα τρία δείγματα (ΠΗΓΗ, TAP1 και TAP2):

Πίνακας 6.16: Ισοζύγιο αβεβαιότητας για επίπεδο αζώτου (νιτρικών) ~ 14 μmolN/L

Πηγές Αβεβαιότητας Δείγμα ΠΗΓΗ, Επίπεδο ~ 14 μmolN/L	**Τιμή (x_i)**	**Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)$]**	**Σχετική Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)/x_i$]**
Αναπαραγωγιμότητα	1	0,0636	0,0636
Αβεβαιότητα ορθότητας	1	0,0150	0,0150
Μεταφορά δείγματος 3mL σε φυγοκεντρικό σωλήνα	2,966	0,0509	0,0172
Μεταφορά μικτού 2mL σε φυγοκεντρικό σωλήνα	1,971	0,0367	0,0186
Μέγιστη/5	0,0127		
Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα :			0,070
% Διευρυμένη αβεβαιότητα :			14

Πίνακας 6.17: Ισοζύγιο αβεβαιότητας για επίπεδο αζώτου (νιτρικών) ~ 26,5μmolN/L

Πηγές Αβεβαιότητας Δείγμα TAP1, Επίπεδο ~ 26,5 μmolN/L	**Τιμή (x_i)**	**Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)$]**	**Σχετική Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)/x_i$]**
Αναπαραγωγιμότητα	1	0,0314	0,0314
Αβεβαιότητα ορθότητας	1	0,0150	0,0150
Μεταφορά δείγματος 3mL σε φυγοκεντρικό σωλήνα	2,966	0,0509	0,0172
Μεταφορά μικτού 2mL σε φυγοκεντρικό σωλήνα	1,971	0,0367	0,0186
Μέγιστη/5	0,0102		
Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα :			0,043
% Διευρυμένη αβεβαιότητα :			9

Πίνακας 6.18: Ισοζύγιο αβεβαιότητας για επίπεδο αζώτου (νιτρικών) ~ 80μmolN/L

Πηγές Αβεβαιότητας Δείγμα ΤΑΡ2, Επίπεδο ~ 80 μmolN/L	**Τιμή (x_i)**	**Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)$]**	**Σχετική Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)/x_i$]**
Αναπαραγωγιμότητα	1	0,0176	0,0176
Αβεβαιότητα ορθότητας	1	0,0150	0,0150
Μεταφορά δείγματος 3mL σε φυγοκεντρικό σωλήνα	2,966	0,0509	0,0172
Μεταφορά μικτού 2mL σε φυγοκεντρικό σωλήνα	1,971	0,0367	0,0186
Μέγιστη/5	0,0102		
Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα :			0,034
% Διευρυμένη αβεβαιότητα :			7

6.9.2 Ισοζύγια αβεβαιότητας για τα δείγματα Δ1 και Δ2

Για τα δείγματα αυτά δεν υπάρχουν στοιχεία αναπαγωγιμότητας. Έτσι οι συνιστώσες των ισοζυγίων αβεβαιότητας θα είναι:

- Επαναληψιμότητα,
- Ορθότητα,
- Καμπύλη βαθμονόμησης,
- Αβεβαιότητα μεταφοράς όγκων δείγματος (3mL) και μικτού αντιδραστηρίου (2 mL) στον φυγοκεντρικό

Άρα για την ορθότητα και τις ογκομετρικές συνεισφορές (αβεβαιότητα μεταφοράς όγκων δείγματος και μικτού αντιδραστηρίου στον φυγοκεντρικό) ισχύει ότι και στις προηγούμενες περιπτώσεις δειγμάτων που εξετάστηκαν. Οι τυπικές αβεβαιότητες επαναληψιμότητας είναι για το δείγμα Δ1 είναι 0,025 και για το δείγμα Δ2 είναι 0,019.

Αβεβαιότητα καμπύλης βαθμονόμησης

Με χρήση υπολογιστικού φύλλου Excel υπολογίζεται η αβεβαιότητα στη μετρούμενη μέση τιμή των δύο δειγμάτων Δ1 (Εικόνα 6.5) και Δ2 (Εικόνα 6.6) από την καμπύλη βαθμονόμησης τη μέρα μέτρησης. Στις εικόνες δίνονται οι υπολογισμοί για καθένα από τα δύο αυτά δείγματα.

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ — *Σελίδα 1 από 1*

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ — ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΟΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΟ

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

Συμπληρώνονται μόνο τα κίτρινα πεδία.

Ημερομηνία : 22/7/2015

C_j : επίπεδα συγκέντρωσης της μετρούμενης ουσίας

Y_j : οι διακεκριμένες τιμές απόκρισης ανά επίπεδο συγκέντρωσης

W_j : ο αριθμός των μετρήσεων για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης C_j (επαναλήψεις)

C_j	Y_j	W_j	W_j*C_j	C_j-C	$W_j*(C_j-C)^2$	$a*C_j+b$	$(Y_{ij}-(a*C_i+b))^2$
0	0,021	2	0	-14,5	420,5	0,018781	4,92384E-06
2	0,0727	2	4	-12,5	312,5	0,064223	7,18642E-05
5	0,1226	2	10	-9,5	180,5	0,132385	9,57515E-05
10	0,249	2	20	-4,5	40,5	0,24599	9,06302E-06
20	0,4666	2	40	5,5	60,5	0,473198	4,35336E-05
50	1,1575	2	100	35,5	2520,5	1,154823	7,16386E-06

Εξίσωση ευθείας y=ax+b

a = 0,022721

b = 0,018781

Page 1

$n = \Sigma W_j$ = 12

$\Sigma W_j C_j$ = 174

$C = \Sigma W_j C_j / n$ = 14,5

$Sc = \Sigma W_j (C_j-C)^2$ = 3535

$\Sigma\Sigma((Y_{ij}-(a*C_j+b))^2)$ = 0,0002323

$Sw = SQRT(\Sigma\Sigma((Y_{ij}-(a*C_j+b))^2)/(n-2))$ = 0,004819752

Υπολογισμός σχετικής τυπικής αβεβαιότητας u(Co)/Co

Sw =	0,00482	Sw/a =	0,212129	
a =	0,022721			m: ο αριθμός των μετρήσεων
m =	8	1/m =	0,125	για το επίπεδο συγκέντρω-
n =	12	1/n =	0,0833333	σης Co.
Co =	24,70	$(Co-C)^2$ =	104,04	
C =	14,5	$((Co-C)^2)/Sc$ =	0,0294314	
Sc =	3535			
		$1/m+1/n+((Co-C)^2)/Sc$ =	0,2377647	
u(Co) =	0,10344	**u(Co)/Co =**	**0,004188**	

Εικόνα 6.5: Αβεβαιότητα Καμπύλης Βαθμονόμησης για το δείγμα Δ1 (~ 300μmolN/L αραιωμένο 12 φορές)

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ — *Σελίδα 1 από 1*

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ — ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΟΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΟ

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

Συμπληρώνονται μόνο τα κίτρινα πεδία.

Ημερομηνία : 22/7/2015

C_j : επίπεδα συγκέντρωσης της μετρούμενης ουσίας

Y_j : οι διακεκριμένες τιμές απόκρισης ανά επίπεδο συγκέντρωσης

W_j : ο αριθμός των μετρήσεων για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης C_j (επαναλήψεις)

C_j	Y_j	W_j	W_j*C_j	C_j-C	$W_j*(C_j-C)^2$	$a*C_j+b$	$(Y_{ij}-(a*C_i+b))^2$
0	0,021	2	0	-30,8333333	1901,3889	0,042852	0,000477511
5	0,1369	2	10	-25,8333333	1334,7222	0,1487	0,000139248
10	0,2516	2	20	-20,8333333	868,05556	0,254549	8,69461E-06
20	0,4901	2	40	-10,8333333	234,72222	0,466245	0,000569046
50	1,1346	2	100	19,16666667	734,72222	1,101335	0,001106545
100	2,1393	2	200	69,16666667	9568,0556	2,159818	0,000421006

Εξίσωση ευθείας y=ax+b

a = 0,02117

b = 0,042852

Page 1

$n = \Sigma W_j$ = 12

$\Sigma W_j C_j$ = 370

$C = \Sigma W_j C_j / n$ = 30,83333333

$Sc = \Sigma W_j (C_j-C)^2$ = 14641,66667

$\Sigma\Sigma((Y_{ij}-(a*C_j+b))^2)$ = 0,002722051

$Sw = SQRT(\Sigma\Sigma((Y_{ij}-(a*C_j+b))^2)/(n-2))$ = 0,01649864

Υπολογισμός σχετικής τυπικής αβεβαιότητας u(Co)/Co

Sw =	0,016499	Sw/a =	0,7793529	
a =	0,02117			m: ο αριθμός των μετρήσεων για το επίπεδο συγκέντρωσης Co.
m =	7	1/m =	0,1428571	
n =	12	1/n =	0,0833333	
Co =	64,80	$(Co-C)^2$ =	1153,7344	
C =	30,83333	$((Co-C)^2)/Sc$ =	0,078798	
Sc =	14641,67			
		$1/m+1/n+((Co-C)^2)/Sc$ =	0,3049885	
u(Co) =	0,4304	**u(Co)/Co =**	**0,006642**	

Εικόνα 6.6: Αβεβαιότητα Καμπύλης Βαθμονόμησης για το δείγμα Δ2 (~ 800μmolN/L αραιωμένο 12 φορές)

Αφού υπολογίστηκαν οι συνιστώσες του ισοζυγίου για τα δείγματα Δ1 και Δ2 γίνεται το ισοζύγιο αβεβαιότητας για τα δύο επίπεδα των νιτρικών ιόντων (300 και 800 μmolN/L), όπως φαίνεται και στους Πίνακες 6.19 και 6.20.

Πίνακας 6.19: Ισοζύγιο αβεβαιότητας για επίπεδο ~ 300μmol/L (αραιωμένο 12 φορές)

Πηγές Αβεβαιότητας **Δείγμα Δ1, Επίπεδο ~ 300 μmolN/L**	**Τιμή (x_i)**	**Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)$]**	**Σχετική Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)/x_i$]**
Επαναληψιμότητα	1	0,0253	0,0253
Αβεβαιότητα ορθότητας	1	0,0150	0,0150
Μεταφορά δείγματος 3mL σε φυγοκεντρικό σωλήνα	2,966	0,0509	0,0172
Μεταφορά μικτού 2mL σε φυγοκεντρικό σωλήνα	1,971	0,0367	0,0186
Αβεβαιότητα καμπύλης βαθμονόμησης	-	-	~~0,0042~~
Μέγιστη/5	0,0102		
Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα :			0,0388
% Διευρυμένη αβεβαιότητα :			8

Πίνακας 6.20: Ισοζύγιο αβεβαιότητας για επίπεδο ~ 800μmol/L (αραιωμένο 12 φορές)

Πηγές Αβεβαιότητας **Δείγμα Δ2, Επίπεδο ~ 800 μmolN/L**	**Τιμή (x_i)**	**Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)$]**	**Σχετική Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)/x_i$]**
Επαναληψιμότητα	1	0,0186	0,0186
Αβεβαιότητα ορθότητας	1	0,0150	0,0150
Μεταφορά δείγματος 3mL σε φυγοκεντρικό σωλήνα	2,966	0,0509	0,0172
Μεταφορά μικτού 2mL σε φυγοκεντρικό σωλήνα	1,971	0,0367	0,0186
Αβεβαιότητα καμπύλης βαθμονόμησης	-	-	~~0,0066~~
Μέγιστη/5	0,0102		
Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα :			0,0348
% Διευρυμένη αβεβαιότητα :			7

6.10 Αξιολόγηση στοιχείων επαναληψιμότητας – αναπαραγωγιμότητας – ορθότητας και αβεβαιότητας

Για κάθε δείγμα (ΠΗΓΗ, ΤΑΡ1, BURTAR, RAINWATER, ΤΑΡ2, Δ1 ΚΑΙ Δ2) δίνεται στον Πίνακα 6.21 η τιμή διαφόρων στοιχείων επίδοσης της μεθόδου (%σχετική τυπική απόκλιση της επαναληψιμότητας και της ανπαραγωγιμότητας, ορθότητα-ως εύρος %ανάκτησης και %διευρυμένη αβεβαιότητα).

Πίνακας 6.21: Στοιχεία επίδοσης μεθόδου για τα δείγματα ΠΗΓΗ, ΤΑΡ1, BURTAR, RAINWATER, ΤΑΡ2, Δ1 ΚΑΙ Δ2

Δείγμα / Επίπεδο ($mgNO_3/L$) Στοιχείο Επίδοσης μεθόδου	ΠΗΓΗ / 0,9 mg/L (14μmol/L)	ΤΑΡ1 / 1,7 mg/L (26μmol/L)	BURTAP 2mg/L (31μmol/L)	RAINWATER 2,1mg/L (34μmol/L)	ΤΑΡ2 5,0mg/L (80μmol/L)	Δ1 18mg/L (300μmol/L)	Δ2 48mg/L (800μmol/L)
%RSD Επαναληψιμότητας	2,4	1,2	2,1	3,8	1,1	2,5	1,9
%RSD Αναπαραγωγιμότητας	6,4	3,1	3,2	3,2	1,8	-	-
Ορθότητα (Εύρος % Ανάκτησης)	-	-	97-109%	99-113%			
%Διευρυμένη αβεβαιότητα	14	9	7	9	9	8	7

Παρατηρείται ότι όσο αυξάνει το επίπεδο συγκέντρωσης νιτρικών μειώνεται η διευρυμένη αβεβαιότητα, αλλά επίσης ότι τα πολύ πυκνά δείγματα έχουν παρόμοια αβεβαιότητα με τα χαμηλότερα γιατί η αραίωση που απαιτούν προκειμένου να μετρηθούν τα φέρνει στα επίπεδα των μεσαίων δειγμάτων (20-30μmol/L).

Σύμφωνα με τις οδηγίες του AOAC (AOAC, 2016) σχετικά με την ορθότητα εφόσον τα αποτελέσματα είναι εντός του ορίου 80-115 θεωρούνται ικανοποιητικά.

Οι επαναληψιμότητες που προέκυψαν (1,1-3,8%) είναι μικρότερες από το εύρος 14-6,8% που είναι το μέγιστο επιτρεπόμενο για συγκεντρώσεις από 0,1-100mg/L και άρα απόλυτα αποδεκτές και τέλος οι αναπαραγωγιμότητες (1,8-6,4%) είναι εντός του 6,8-3,4% που είναι το μέγιστο επιτρεπόμενο για συγκεντρώσεις από 0,1-100mg/L.

Γ. Πειράματα σε εκχυλίσματα εδαφών

6.11 Περιγραφή δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα επαλήθευσης

Στον Πίνακα 6.22 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις νιτρικών σε υλικά αναφοράς, καθώς και ο αριθμός και το είδος των πραγματικών δειγμάτων που αναλύθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 6.22: Συγκεντρώσεις νιτρικών σε υλικά αναφοράς, αριθμός και είδος των πραγματικών δειγμάτων που αναλύθηκαν

ΥΛΙΚΟ	**NO_3 εκχυλίσιμα με KCl (mg/kgN)**
Υλικό αναφοράς ISE 919	9,371
Υλικό αναφοράς ISE 961	21,43
Υλικό αναφοράς ISE 997	62,06
17 Δείγματα αγροτικών εδαφών AG1-AG17	
Δείγματα από Αταλάντη 2mm και 100μm	
Δείγμα από Σκοπευτήριο νωπό και ξηρό	

6.12 Καμπύλες αναφοράς σε απιονισμένο νερό και σε χλωριούχο κάλιο (KCl) για την εφαρμογή της μεθόδου σε εδάφη

Έγιναν καμπύλες αναφοράς (0-2-5-10-20-50-100 μmolN/L) σε KCl και σε υπερκάθαρο νερό (milliQ) και οι τιμές της απορρόφησης δίνονται στον Πίνακα 6.23. Οι μέσοι όροι των τιμών για κάθε επίπεδο συγέντρωσης συγκρίθηκαν με t-test. Ελέγχονται και οι κλίσεις των γραμμικών εξισώσεων στις καμπύλες αναφοράς ώστε να προσδιοριστεί ο κατάλληλος τρόπος κατασκευής της καμπύλης αναφοράς.

Πίνακας 6.23: Καμπύλες σε KCl και σε υπερκάθαρο νερό (milliQ) και σύγκριση των τιμών με t-test

	Abs σε KCl			Abs σε απιονισμένο			
C (μmolN/L)	KCl/1	KCl/2	KCl/3	H_2O/1	H_2O/2	H_2O/3	Σύγκριση μέσων όρων με t-test
0	0,1126	0,1023	0,1110	0,0394	0,0466	0,0430	ΑΝΙΣΟΙ
2	0,1584	0,1537	0,1563	0,1356	0,12175	0,1482	ΙΣΟΙ
5	0,2446	0,2537	0,2508	0,2226	0,2097	0,2147	ΑΝΙΣΟΙ
10	0,3736	0,3831	0,3848	0,3698	0,3704	0,3810	ΙΣΟΙ
20	0,7103	0,6993	0,7019	0,6600	0,6656	0,6906	ΑΝΙΣΟΙ

	Abs σε KCl			Abs σε απιονισμένο			
C (μmolN/L)	KCl/1	KCl/2	KCl/3	H_2O/1	H_2O/2	H_2O/3	Σύγκριση μέσων όρων με t-test
50	1,5026	1,5264	1,5123	1,4119	1,46095	1,5908	ΙΣΟΙ
100	2,6955	2,7235	2,7468	2,5943	2,70015	2,9055	ΙΣΟΙ
Κλίση a y=ax+b	0,0261	0,0264	0,0265	0,0253	0,0264	0,0286	ΙΣΟΙ
Τομή y=ax+b	0,1323	0,1296	0,1291	0,1006	0,0900	0,0902	ΑΝΙΣΟΙ
Κλίση a y=ax	0,0264	0,0267	0,0268	0,0262	0,0271	0,0292	ΙΣΟΙ

Επειδή οι κλίσεις των καμπυλών είναι ίσες αλλά διαφέρουν οι σταθεροί όροι των γραμμικών εξισώσεων στις καμπύλες αναφοράς, για τα εδάφη αποφασίστηκε η μέτρηση να γίνεται ως εξής:

Καμπύλη αναφοράς σε απιονισμένο νερό, να υπολογίζονται καμπύλες αναφοράς της μορφής y= ax με τυφλό στη θέση αναφοράς απιονισμένο και να μετριέται και τυφλό KCl που η συγκέντρωσή του να αφαιρείται από τα δείγματα.

6.13 Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης νιτρικών σε εδάφη

Καταγράφηκαν από διαφορετικές μέρες ανάπτυξης της καμπύλης αναφοράς οι απορροφήσεις τυφλών δειγμάτων σε KCl (n = 12). Υπολογίστηκε η συγκέντρωση στα τυφλά δείγματα (μmolN/L), ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων, η τυπική απόκλιση (SD) και το η % σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.24.
Το όριο ανίχνευσης (LOD) σε μmolN/L δίνεται από τον τύπο:

$$LOD = stdev*t$$

όπου t, ο συντελεστής student για επίπεδο εμπιστοσύνης 99% και stdev η τυπική απόκλιση των συγκεντρώσεων από τις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις

Για 12 επαναλήψεις και άρα 11 βαθμούς ελευθερίας ο συντελεστής t με τον οποίο πολλαπλασιάζεται η τυπική απόκλιση των μετρήσεων είναι 2,695.

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) σε μmolN/L είναι η δεκαπλασιασμένη τιμή της τυπικής απόκλισης της συγκέντρωσης των τυφλών δειγμάτων (LOQ = 10* sd).
Τα παραπάνω όρια υπολογίστηκαν θεωρώντας εκχύλιση 1 g εδάφους σε 10mL KCl και μέτρηση χωρίς αραίωση.

Πίνακας 6.24: Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης νιτρικών σε εδάφη

Ημερομηνία ανάλυσης	Abs blank KCl	Συγκέντρωση στο τυφλό (μmolN/L)	
14/1/2016	0,1126	4,3	
14/1/2016	0,1023	3,8	
14/1/2016	0,1110	4,1	
21/1/2016	0,1783	6,4	
26/1/2016	0,1105	4,3	
27/1/2016	0,1518	6,1	
29/1/2016	0,1102	4,3	
2/2/2016	0,0769	2,9	
7/2/2016	0,0858	3,2	
17/2/2016	0,1201	4,5	
23/2/2016	0,0705	2,8	
24/2/2016	0,0691	2,5	
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ	**0,1082**	**4,1**	
ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ (sd)		**1,22**	
%RSD		**29,7**	
Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης		**σε μmolN/L**	**σε mg/kg***
	LOD = stdev*t	**3,3**	**0,4**
	LOQ = 10*sd	**12,2**	**1,7**

6.14 Διερεύνηση χρόνου εκχύλισης

Έγιναν δοκιμές (εις τριπλούν) με έδαφος υλικό αναφοράς (ISE 997) και εκχύλιση / ανακίνηση 1 ώρα, 1,5 ώρες και 2 ώρες. Υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις στις 3 διαφορετικές συνθήκες και οι μέσοι όροι συγκρίθηκαν με t-test ώστε να βρεθούν διαφορές στατιστικά σημαντικές όσων αφορά το χρόνο εκχύλισης. Στον Πίνακα 5.25 παρουσιάζονται οι ανακτήσεις στις 3 διαφορετικές συνθήκες οι οποίες συγκρίθηκαν με t-test και δεν ήταν διαφορετικές.

Πίνακας 6.25: Ανακτήσεις του υλικού αναφοράς ISE 997 σε 3 διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης μετά από δοκιμές εις τριπλούν και σύγκρισή τους με t-test

Α/Α	1	2	3	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ
1 ώρα	96	109	106	103
1,5 ώρες	107	97	100	101

2 ώρες	96	76	85	86
Σύγκριση μέσων όρων με t-test				
Όλοι ίσοι μεταξύ τους				

Εφόσον δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των 3 χρόνων εκχύλισης αποφασίστηκε να τηρείται χρόνος ανακίνησης / εκχύλισης 1,5 ώρες.

6.15 Σύγκριση αποτελεσμάτων με εκχύλιση σε νωπό και ξηρό δείγμα

Έγιναν δοκιμές (εις τριπλούν) στο ίδιο δείγμα εδάφους πριν και μετά την ξήρανσή του σε εργαστηριακό φούρνο στους 40^{o}C για 72 ώρες. Υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις και οι μέσοι όροι τους συγκρίθηκαν με με t-test ώστε να βρεθεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ νωπού και ξηρού δείγματος. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 6.26.

Πίνακας 6.26: Συγκεντρώσεις νωπού και ξηρού δείγματος Σκοπευτηρίου

ΔΕΙΓΜΑ και Α/Α	1	2	3	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ
ΣΚΟΠΕΥΤΗΡΙΟ ΝΩΠΟ	16,59	14,77	12,97	14,78
ΣΚΟΠΕΥΤΗΡΙΟ ΞΗΡΟ	15,41	14,93	16,81	15,71
Σύγκριση μέσων όρων με t-test: ΙΣΟΙ				

Ο μέρος όρος των συγκεντρώσεων νιτρικών ιόντων που προσδιορίστηκαν στο ξηρό δείγμα είναι ελαφρά υψηλότερος από τον αντίστοιχο του νωπού δείγματος, χωρίς όμως να προκύπτει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά από το t-test. **Έτσι, ο προσδιορισμός των νιτρικών ιόντων μπορεί να γίνει είτε σε νωπό, είτε σε ξηρό δείγμα, χωρίς να υπάρχει κάποια στατιστική διαφορά.**

6.16 Σύγκριση αποτελεσμάτων με εκχύλιση σε εδάφη κοσκινισμένα από διαφορετικά μεγέθη οπής (<100mm και <2mm)

Έγιναν μετρήσεις των νιτρικών ιόντων σε τρία διαφορετικά δείγματα (εις διπλούν στο καθένα), καθένα από τα οποία είχε κοσκινιστεί από δύο διαφορετικά μεγέθη οπής (όπου Α είναι έδαφος <100μm και Β έδαφος <2mm). Υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις και οι μέσοι όροι τους συγκρίθηκαν με με t-test ώστε να αποδειχτεί αν υπάρχει στατιστική διαφορά στη μετρούμενη συγκέντρωση εκχυλίσιμων νιτρικών στα διαφορετικά κλάσματα εδάφους μετά από κοσκίνιση σε κόσκινο 2mm ή 100μm ώστε να βρεθεί πιο κλάσμα είναι το καταλληλότερο για τον προσδιορισμό των νιτρικών ιόντων. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 6.27.

Πίνακας 6.27: Συγκεντρώσεις νιτρικών σε τρία δείγματα εδαφών κοσκινισμένα από διαφορετικά μεγέθη οπής (<100mm και <2mm) και σύγκριση των μέσων όρων με t-test

Α/Α	ΑΤΑΛΑΝΤΗ 1	ΑΤΑΛΑΝΤΗ 2	ΑΤΑΛΑΝΤΗ 3
Α (<100μm) / 1	4,40	6,38	4,97
Α (<100μm) / 2	5,21	6,09	4,92
Μ.Ο.	**4,81**	**6,24**	**4,94**
Β (< 2mm) / 1	3,68	5,86	5,01
Β (< 2mm) / 2	4,11	5,97	6,19
Μ.Ο.	**3,90**	**5,91**	**5,6**
T-test Μ.Ο.	**ΙΣΟΙ**	**ΙΣΟΙ**	**ΙΣΟΙ**

Δεν αποδείχθηκε διαφορά στη μετρούμενη συγκέντρωση εκχυλίσιμων νιτρικών στα διαφορετικά κλάσματα εδάφους μετά από κοσκίνιση σε κόσκινο 2mm ή 100μm. Άρα η ανάλυση μπορεί να γίνεται σε όποιο από τα δύο κλάσματα είναι διαθέσιμο.

6.17 Ορθότητα και Αναπαραγωγιμότητα σε εδαφικά εκχυλίσματα

Για τον υπολογισμό της ορθότητας πραγματοποιήθηκε εκχύλιση, ανάπτυξη και μέτρηση των νιτρικών ιόντων (μαζί με τα νιτρώδη) των πιστοποιημένων υλικών αναφοράς ISE 919, 961 και 997 σε διαφορετικές μέρες, δηλαδή με διαφορετικές καμπύλες αναφοράς. Για κάθε μέτρηση υπολογίστηκε η % Ανάκτηση και δίνεται στον Πίνακα 6.28.

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε υπολογιστικό φύλλο excel (Εικόνα 6.7) όπου εισάγεται η πιστοποιημένη τιμή των υλικών αναφοράς (παλιά δείγματα διεργαστηριακών), η τυπική απόκλιση της κάθε τιμής καθώς και ο μέσος όρο των τιμών που μετρήσαμε εμείς με την τυπική απόκλιση των 7 μετρήσεων μας. Από τους τύπους που αναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο 2 προκύπτει η % τυπική αβεβαιότητα της ορθότητας. Για να μετατραπεί σε τυπική αβεβαιότητα διαιρείται με 100.

Για τον υπολογισμό της αναπαραγωγιμότητας πραγματοποιήθηκε εκχύλιση, ανάπτυξη και μέτρηση των νιτρικών ιόντων (μαζί με τα νιτρώδη) των πιστοποιημένων υλικών αναφοράς ISE 919, 961 και 997 σε διαφορετικές μέρες, δηλαδή με διαφορετικές καμπύλες αναφοράς. Για κάθε υλικό αναφοράς (ISE 919, 961 και 997) υπολογίστηκαν η τυπική απόκλιση (SD) ο μέσος όρος (MO) και η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) και δίνονται στον Πίνακα 6.28.

Πίνακας 6.28: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων (μαζί με τα νιτρώδη) των πιστοποιημένων υλικών αναφοράς ISE 919, 961 και 997 σε διαφορετικές μέρες. Δίνεται η % Ανάκτηση, η τυπική απόκλιση (SD) ο μέσος όρος (ΜΟ) και η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD)

Α/Α	**ISE 919**		**ISE 961**		**ISE 997**	
	Μετρούμενη NO_3 (mg/kg)	**% Ανάκτηση**	**Μετρούμενη NO_3 (mg/kg)**	**% Ανάκτηση**	**Μετρούμενη NO_3 (mg/kg)**	**% Ανάκτηση**
1	8,32	***89***	20,64	***96***	64,1	***103***
2	8,30	***89***	22,62	***106***	57,35	***92***
3	9,75	***104***	19,78	***92***	56,84	***92***
4	10,80	***115***	23,32	***109***	57,89	***93***
5	8,04	***86***	18,30	***85***	60,14	***97***
6	8,99	***96***	19,97	***93***	60,01	***97***
7	7,90	***84***	20,56	***96***	54,54	***88***
Μ.Ο.	**8,87**	**95**	**20,74**	**97**	**58,70**	**95**
Τυπ. Απόκ.	**1,06**	**-**	**1,72**	**-**	**3,08**	**-**
%RSD	**12**		**8**		**5**	

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΕΚΠΑ

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ CRM

Συμπληρώνονται μόνο τα κίτρινα πεδία.

Ημερομηνία :

Είδος δοκιμής : Προσδιορισμός εκχυλίσιμων νιτρικών (KCl) σε εδάφη

Κωδικός CRM :	**ISE-919**					
Πιστοποιημένη τιμή (μ)	=	9,371	μ	=	9,371	
SD πιστοποιημένης τιμής (u_μ)	=	1,215	$(u_\mu)/SQRT(n_\mu)$	=	0,459227	
Αριθμ. μετρήσεων πιστοπ. τιμής (n_μ)	=	7				
Μέσος όρος μετρούμενης τιμής (x)	=	8,87	x	=	8,870289	
SD μετρούμενης τιμής (u_x)	=	1,06	$(u_x)/SQRT(n_x)$	=	0,401158	
Αριθμ. επαναλήψεων εργαστ. (n_x)	=	7				
$(u_\mu/SQRT(n_\mu))/\mu$	=	0,049005				
$(u_x/SQRT(n_x))/x$	=	0,045225	**% RSD_{bias}**	=	**6,67**	%
SQRT(SUMSQ)	=	0,066684	**RSD_{bias}**	=	**0,0667**	
Κωδικός CRM :	**ISE-961**					
Πιστοποιημένη τιμή (μ)	=	21,43	μ	=	21,43	
SD πιστοποιημένης τιμής (u_μ)	=	3,1	$(u_\mu)/SQRT(n_\mu)$	=	1,17169	
Αριθμ. μετρήσεων πιστοπ. τιμής (n_μ)	=	7				
Μέσος όρος μετρούμενης τιμής (x)	=	20,74	x	=	20,74082	
SD μετρούμενης τιμής (u_x)	=	1,72	$(u_x)/SQRT(n_x)$	=	0,649184	
Αριθμ. επαναλήψεων εργαστ. (n_x)	=	7				
$(u_\mu/SQRT(n_\mu))/\mu$	=	0,054675				
$(u_x/SQRT(n_x))/x$	=	0,031300	**% RSD_{bias}**	=	**6,30**	%
SQRT(SUMSQ)	=	0,063000	**RSD_{bias}**	=	**0,0630**	
Κωδικός CRM :	**ISE-997**					
Πιστοποιημένη τιμή (μ)	=	62,06	μ	=	62,06	
SD πιστοποιημένης τιμής (u_μ)	=	3,85	$(u_\mu)/SQRT(n_\mu)$	=	1,455163	
Αριθμ. μετρήσεων πιστοπ. τιμής (n_μ)	=	7				
Μέσος όρος μετρούμενης τιμής (x)	=	58,70	x	=	58,70132	
SD μετρούμενης τιμής (u_x)	=	3,08	$(u_x)/SQRT(n_x)$	=	1,162479	
Αριθμ. επαναλήψεων εργαστ. (n_x)	=	7				
$(u_\mu/SQRT(n_\mu))/\mu$	=	0,023448				
$(u_x/SQRT(n_x))/x$	=	0,019803	**% RSD_{bias}**	=	**3,07**	%
SQRT(SUMSQ)	=	0,030691	**RSD_{bias}**	=	**0,0307**	

Εικόνα 6.7 Εκτίμηση ορθότητας με υλικά αναφοράς

6.18 Ισοδυναμία προσδιορισμού νιτρικών σε εκχυλίσματα εδάφους με στήλη Cd και με VCl_3

Μια σειρά από 7 εκχυλίσματα του πιστοποιημένου υλικού αναφοράς ISE 997 αναλύθηκε με την προτεινόμενη διαδικασία με χλωριούχο βανάδιο και με αναγωγή σε στήλη καδμίου σε διαφορετικές ημέρες, από τον ίδιο αναλυτή χρησιμοποιώντας τον ίδιο εξοπλισμό και τα ίδια πρότυπα. Για κάθε ανάλυση χρησιμοποιήθηκε διαφορετική παρτίδα αντιδραστηρίου. Για κάθε μέτρηση υπολογίστηκε η %Ανάκτηση και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών σε mg/kg N, η τυπική απόκλιση και %σχετική τυπική απόκλιση και δίνονται στον Πίνακα 6.29.

Πίνακας 6.29: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων (σε mg/kg N) και % Ανάκτηση του ISE 997 έπειτα από αναγωγή του σε στήλη καδμίου σε διαφορετικές ημέρες. Δίνεται ο μέσος όρος των τιμών, η τυπική απόκλιση και % σχετική τυπική απόκλιση

ISE 997 (εκχ. NO_3 με στήλη Cd σε mg/kg N)	**% Ανάκτηση**
55,35	89
59,38	96
61,65	99
63,76	103
64,89	105
65,70	106
68,96	111
Τυπική απόκλιση = 4,47	
Μέσος Όρος = 62,81	
%RSD = 7	

Φαίνεται ότι η αναπαραγωγιμότητα του προσδιορισμού εκχυλίσιμων νιτρικών με τη στήλη καδμίου είναι χειρότερη καθώς παρατηρήθηκε μεγαλύτερη διασπορά στις μετρούμενες τιμές (7% έναντι 5% για τη μέθοδο που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία) ενώ ως προς την ορθότητα οι δύο μέθοδοι αποδεικνύονται εφάμιλλες με καλές ανακτήσεις εντός του εύρους 85-115% που θεωρείται ικανοποιητικό για μεθόδους σε στερεά υποστρώματα και αρκετά βήματα επεξεργασιών.

6.19 Πειράματα Ομοιογένειας

Επιλέχθηκε ένα δείγμα που ήταν διαθέσιμο σε μεγάλη ποσότητα (AG15). Επαρκής μάζα από το δείγμα αυτό απλώθηκε σε καθαρό χαρτί και από αυτή με διαδικασίες τεταρτοποίησης και πολύ καλό ανακάτεμα τελικά χωρίστηκε σε 10 τμήματα και καθένα από αυτά σε 2 επιμέρους. Λήφθησαν έτσι 20 υποδείγματα του 1g τα οποία υποβλήθηκαν στην διαδικασία εκχύλισης με KCl και τη μέτρηση των νιτρικών με τη μέθοδο που εφαρμόζεται στην παρούσα εργασία.

Τα αποτελέσματα των 10 δειγμάτων και 20 συνολικά επαναλήψεων δίνονται στον Πίνακα 6.30 μαζί με την επί τοις εκατό σχετική διαφορά μεταξύ των δύο υποδειγμάτων κάθε δείγματος (%RPD).

Πίνακας 6.30: Αποτελέσματα ομοιογένειας (εκχυλίσιμα νιτρικά με KCl σε mg/kgN)

Δείγμα	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Επαν/1	17,29	19,08	17,45	21,96	17,59	17,77	19,76	21,68	22,72	21,34
Επαν/2	21,68	21,34	17,25	18,48	21,42	18,37	20,47	21,84	21,39	23,81
%RPD	***22***	***11***	***1***	***17***	***20***	***3***	***4***	***1***	***6***	***11***

Ο συνολικός μέσος όρος αυτών των μετρήσεων είναι **20,1 mg/kg N**.

Από αυτές τις μετρήσεις προσδιορίστηκε η τυπική απόκλιση ομοιογένειας με την διαδικασία που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 5. Από τον παραπάνω πίνακα αποτελεσμάτων στα 20 δείγματα στο excel έγινε ανάλυση ANOVA single factor και παράχθηκε ο ακόλουθος πίνακας.

Πίνακας 6.31: Ανάλυση ANOVA single factor των 10 δειγμάτων και 20 συνολικά επαναλήψεων

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	50,26011	9	5,584456	1,8637	0,172955	3,020383
Within Groups	29,96436	10	2,996436			
Total	80,22446	19				

insignificant result of homogeneity because F<Fcrit

Το τετράγωνο της τυπικής απόκλισης ομοιογένειας δίνεται από τον τύπο (n=2).

$$s_{hom}^2 = \frac{MS_{between} - MS_{within}}{n}$$

Έτσι η τυπική απόκλιση λόγω ομοιογένειας υπολογίζεται 1,14mg/kg και από τον συνολικό μέσο όρο υπολογίζεται η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση ομοιογένειας **%RSD$_{hom}$ = 5,65%.**

6.20 Υπολογισμοί ισοζυγίων αβεβαιότητας

Για την εκτίμηση της αβεβαιότητας του αποτελέσματος εκχυλίσιμων νιτρικών σε εδάφη λαμβάνονται υπόψη οι συνιστώσες αναπαραγωγιμότητας, ορθότητας και ομοιογένειας σε 3 επίπεδα συγκεντρώσεων (9, 20 και 62 mg/kg N) που είναι τα επίπεδα στα 3 υλικά αναφοράς ISE που χρησιμοποιήθηκαν. Θεωρώντας ότι οι συνεισφορές αβεβαιότητας από τις μεταφορές όγκων δειγμάτων και προτύπων στους φυγοκεντρικούς σωλήνες και από την

καμπύλη βαθμονόμησης εντάσσονται μέσα στην αναπαραγωγιμότητα δεν θα συνεκτιμηθούν ξεχωριστά.

Υπολογίστηκαν τα ισοζύγια αβεβαιότητας για τα εξής επίπεδα εκχυλίσιμων νιτρικών:

- επίπεδο 9 mg/kg N (με εφαρμογή στο υλικό αναφοράς ISE 919)-Πίνακας 5.32
- επίπεδο 1,7-10mg/kg N (εφαρμογή σε πραγματικό δείγμα AG9)-Πίνακας 5.33
- επίπεδο 20 mg/kg N (εφαρμογή στο υλικό αναφοράς ISE 961-Πίνακας 5.34
- επίπεδο 10-30mg/kg N (εφαρμογή σε πραγματικό δείγμα AG1)-Πίνακας 5.35
- επίπεδο 60 mg/kg N (εφαρμογή στο υλικό αναφοράς ISE 997))-Πίνακας 5.36
- επίπεδο 10-30mg/kg N (εφαρμογή σε πραγματικό δείγμα AG13)-Πίνακας 5.37

Για κάθε πηγή αβεβαιότητας υπολογίζεται η τυπική αβεβαιότητα [u(xi)] και η σχετική τυπική αβεβαιότητα [u(xi)/xi]. Τέλος υπολογίζεται η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα και η % Διευρυμένη αβεβαιότητα.

Πίνακας 6.32: Ισοζύγιο αβεβαιότητας για επίπεδο 9 mg/kg N (με εφαρμογή στο υλικό αναφοράς ISE 919)

Πηγές Αβεβαιότητας Επίπεδο 9 mg/kg N	**Τιμή (x_i)**	**Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)$]**	**Σχετική Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)/x_i$]**
Αναπαραγωγιμότητα	1	0,1197	0,1197
Αβεβαιότητα ορθότητας με υλικό ISE 919	1	0,0667	0,0644
Ομοιογένεια δείγματος	1	0,0565	0,0565
Μέγιστη/5	0,0239		
Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα :			0,1481
% Διευρυμένη αβεβαιότητα :			30

Πίνακας 6.33: Ισοζύγιο αβεβαιότητας για επίπεδο εκχυλίσιμων νιτρικών 1,7-10mg/kg N (εφαρμογή σε πραγματικό δείγμα AG9)

Πηγές Αβεβαιότητας Επίπεδο 1,7-10 mg/kg N	**Τιμή (x_i)**	**Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)$]**	**Σχετική Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)/x_i$]**
Αναπαραγωγιμότητα πραγματικού δείγματος	1	0,1175	0,1175
Αβεβαιότητα ορθότητας με υλικό ISE 919	1	0,0667	0,0667
Ομοιογένεια δείγματος	1	0,0565	0,0565
Μέγιστη/5	0,0235		
Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα :			0,1464
% Διευρυμένη αβεβαιότητα :			29

Πίνακας 6.34: Ισοζύγιο αβεβαιότητας για επίπεδο 20 mg/kg N (με εφαρμογή στο υλικό αναφοράς ISE 961)

Πηγές Αβεβαιότητας Επίπεδο 20 mg/kg N	**Τιμή (x_i)**	**Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)$]**	**Σχετική Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)/x_i$]**
Αναπαραγωγιμότητα	1	0,0828	0,0828
Αβεβαιότητα ορθότητας με υλικό ISE 961	1	0,0630	0,0630
Ομοιογένεια δείγματος	1	0,0565	0,0565
Μέγιστη/5	0,0166		
Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα :			0,1184
% Διευρυμένη αβεβαιότητα :			24

Πίνακας 6.35: Ισοζύγιο αβεβαιότητας για επίπεδο εκχυλίσιμων νιτρικών 10-30mg/kg N (εφαρμογή σε πραγματικό δείγμα AG1)

Πηγές Αβεβαιότητας Επίπεδο 10-30 mg/kg N	**Τιμή (x_i)**	**Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)$]**	**Σχετική Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)/x_i$]**
Αναπαραγωγιμότητα πραγματικού δείγματος	1	0,0620	0, 0620
Αβεβαιότητα ορθότητας με υλικό ISE 961	1	0,0630	0,0630
Ομοιογένεια δείγματος	1	0,0565	0,0565
Μέγιστη/5	0,0124		
Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα :			0,1049
% Διευρυμένη αβεβαιότητα :			21

Πίνακας 6.36: Ισοζύγιο αβεβαιότητας για επίπεδο 60 mg/kg N (με εφαρμογή στο υλικό αναφοράς ISE 997)

Πηγές Αβεβαιότητας Επίπεδο 60 mg/kg N	**Τιμή (x_i)**	**Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)$]**	**Σχετική Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)/x_i$]**
Αναπαραγωγιμότητα	1	0,0524	0,0524
Αβεβαιότητα ορθότητας με υλικό ISE 997	1	0,0307	0,0307
Ομοιογένεια δείγματος	1	0,0565	0,0565
Μέγιστη/5	0,0166		
Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα :			0,0829
% Διευρυμένη αβεβαιότητα :			17

Πίνακας 6.37: Ισοζύγιο αβεβαιότητας για επίπεδο εκχυλίσιμων νιτρικών 10-30mg/kg N (εφαρμογή σε πραγματικό δείγμα AG13)

Πηγές Αβεβαιότητας Επίπεδο 10-30 mg/kg N	**Τιμή (x_i)**	**Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)$]**	**Σχετική Τυπική Αβεβαιότητα [$u(x_i)/x_i$]**
Αναπαραγωγιμότητα πραγματικού δείγματος	1	0,0620	0, 0620
Αβεβαιότητα ορθότητας με υλικό ISE 997	1	0,0307	0,0307
Ομοιογένεια δείγματος	1	0,0565	0,0565
Μέγιστη/5	0,0124		
Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα :			0,0798
% Διευρυμένη αβεβαιότητα :			16

6.21 Αξιολόγηση στοιχείων επαναληψιμότητας – αναπαραγωγιμότητας – ορθότητας και αβεβαιότητας

Για τα τρία υλικά αναφοράς (ISE 919, ISE 961, ISE 997) δίνεται στον Πίνακα 6.38 η τιμή διαφόρων στοιχείων επίδοσης της μεθόδου (%σχετική τυπική απόκλιση της επαναληψιμότητας και της ανπαραγωγιμότητας, ορθότητα-ως εύρος %ανάκτησης και %διευρυμένη αβεβαιότητα).

Πίνακας 6.38: Στοιχεία επίδοσης μεθόδου για τα δείγματα ISE 919, ISE 961, ISE 997

Δείγμα / Επίπεδο (mgN/kg) / Στοιχείο Επίδοσης μεθόδου	ISE 919 / 9,4 mgN/kg	ISE 961 / 21 mgN/kg	ISE 997 / 62mgN/kg
%RSD Αναπαραγωγιμότητας	12	8	5
Ορθότητα (Εύρος % Ανάκτησης)	84-115%	85-109%	88-103%
%Διευρυμένη αβεβαιότητα	30	24	17

Παρατηρείται ότι όσο αυξάνει το επίπεδο συγκέντρωσης νιτρικών μειώνεται η διευρυμένη αβεβαιότητα.

Οι αναπαραγωγιμότητες (5-12%) είναι χαμηλότερες του εύρους 10-14% που είναι το μέγιστο επιτρεπόμενο για συγκεντρώσεις από 1-100mg/kg σύμφωνα με τον AOAC (Πίνακας 3.2, παρούσα εργασία).
Επίσης σύμφωνα με τις οδηγίες του AOAC (AOAC, 2016) σχετικά με την ορθότητα εφόσον τα αποτελέσματα είναι εντός του ορίου 80-115 θεωρούνται ικανοποιητικά.

6.22 Αποτελέσματα στα πραγματικά δείγματα

Τα εδαφικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι 17 στο σύνολό τους και προέρχονται από την περιοχή του Τυρνάβου του νομού Λαρίσης. Στον Πίνακα 6.39 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των νιτρικών ιόντων (σε mg/kg) στα πραγματικά δείγματα. Δίνονται επίσης στοιχεία επαναληψιμότητας από πολλαπλή ανάλυση σε επιλεγμένα δείγματα (μέσος όρος, τυπική απόκλιση και % σχετική τυπική απόκλιση)

Πίνακας 6.39: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων νιτρικών ιόντων (mg/kg) στα πραγματικά δείγματα

ΔΕΙΓΜΑ	**Μετρούμενη NO_3 (mg/kg)**	**Στοιχεία επαναληψιμότητας από πολλαπλή ανάλυση σε επιλεγμένα δείγματα (Μ.Ο., Τυπ. Απόκλιση, %RSD)**
AG1	18,17	
AG 2	8,15	
AG 3	20,60 19,16 18,22	*19,32* *1,20* *6*
AG 4	12,37	
AG 5	11,12	
AG 6	29,43	
AG 7	16,84	
AG8	8,88	
AG9	16,95	
AG10	11,18	
AG11	6,98 6,06 5,55	*6,20* *0,73* *12*
AG12	20,39	
AG13	56,06 51,18 52,75	*53,27* *2,52* *5*
AG14	5,30	
AG15	33,84 41,71	*38,53* *4,15*

	40,05	*11*
AG16	32,98	
AG17	8,01	

Πίνακας 6.40: Φυσικοχημικές ιδιότητες των πραγματικών δειγμάτων*

Δείγμα	**pH**	**Carbonates (%)**	**TOC (%)**
AG1	6,1	0,3	0,6
AG2	6,9	0,7	0,8
AG3	7,1	0,6	0,5
AG4	5,7	0,72	0,6
AG5	6,2	0,6	0,5
AG6	7,4	0,7	1,3
AG7	5,8	0,4	0,7
AG8	6,5	0,7	0,5
AG9	4,8	0,2	0,8
AG10	6,1	0,6	0,7
AG11	6,2	0,4	0,6
AG12	5,7	0,6	0,9
AG13	5,8	0,2	1,6
AG14	7,0	0,7	1,1
AG15	7,9	0,7	2,8
AG16	8,6	0,7	0,9
AG17	7,2	0,4	0,8

*Τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.40 προέρχονται από την εργασία διπλώματος ειδίκευσης στην Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος της Μ.Α.Τριγώνη με τίτλο «Επίπεδα και κινητικότητα μετάλλων σε μεταλλευτικά και αγροτικά εδάφη της Ελλάδας», 2017.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων για τα αγροτικά εδάφη (πραγματικά δείγματα) όσον αφορά το pH, τον οργανικό άνθρακα και τα ανθρακικά, έγινε με βάση τους παρακάτω Πίνακες.

Πίνακας 6.41: Χαρακτηρισμός των εδαφικών δειγμάτων με βάση το pH (MAFF 1988, Μήτσιος 2000)

pH	**Χαρακτηρισμός**
< 4,5	Υπερβολικά όξινο
4,6-5,0	Πολύ ισχυρά όξινο
5,1-5,5	Ισχυρά όξινο
5,6-6,0	Μέτρια όξινο
6,1-6,5	Ελαφρά όξινο
6,6-7,3	Ουδέτερο

7,3-7,8	Ελαφρά αλκαλικό
7,9-8,4	Μέτρια αλκαλικό
8,5-9,0	Ισχυρά αλκαλικό
> 9,0	Πολύ ισχυρά αλκαλικό

Πίνακας 6.42: Ταξινόμηση εδαφών με βάση το ποσοστό οργανικού άνθρακα που περιέχουν (Schroeder, 1984)

0,5 %	Low
0,5 – 1%	Medium Low
1 – 2 %	Medium
2 – 4 %	High
4 – 8 %	Rich
8 – 15 %	Muck
>15 %	Peat

Πίνακας 6.43: Χαρακτηρισμός εδάφους με βάση τη περιεκτικότητα σε $CaCO_3$

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ $CaCO_3$
Ανεπαρκής περιεκτικότητα	<0,5
Μέτρια περιεκτικότητα	0,5-2
Καλή περιεκτικότητα	2,1-20
Αυξημένη περιεκτικότητα	21-40
Ασβεστούχος περιεκτικότητα	>40

Τα αγροτικά δείγματα ως προς το pH χαρακτηρίζονται ως ελαφρά όξινα σύμφωνα με τη κατάταξη του Πίνακα 6.41 καθώς η τιμή της διαμέσου είναι 6,2. Ο οργανικός άνθρακας με διάμεσο τιμή 0,8% χαρακτηρίζεται ως μέτρια χαμηλός. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι εδάφη με διάμεσο τιμή 0,5% και κάτω υποδεικνύει εξάντληση των αποθεμάτων σε οργανική ουσία και συνίσταται η αλλαγή συστήματος καλλιέργειας για αποφυγή της υποβάθμισης των φυσικών ιδιοτήτων του εδάφους. Γι' αυτό το λόγο είναι σημαντικό να παρακολουθείται αυτός ο παράγοντας για πιθανή υποβάθμιση των εδαφών στο μέλλον. Τα επίπεδα των ανθρακικών χαρακτηρίζονται μέτριας περιεκτικότητας, με τιμή διαμέσου 0,6. (Πίνακας 6.43).

Από στοιχεία που συλλέχθηκαν κατά τη δειγματοληψία στα δείγματα AG1 και AG4 είναι καλλιεργημένα με σιτάρι. Άριστο pH για αυτή τη καλλιέργεια είναι μεταξύ του 4,1-7,4. Οι τιμές και στις δύο θέσεις δειγματοληψίας κρίνονται καλές για την εφαρμογή αυτής της καλλιέργειας. Το ίδιο παρατηρείται και για τα δείγματα AG3 και AG6 που καλλιεργούνται με αραβόσιτο με εύρος άριστου pH 5,6-7,5. Στη θέση δειγματοληψίας AG2 που καλλιεργείται με τριφύλλι το ιδανικό pH του πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 5,3-7,4 οπότε και το έδαφος αυτό έχει το κατάλληλο pH. Για τα υπόλοιπα δείγματα δεν υπάρχει κάποια πληροφορία όσον αφορά την εφαρμογή συγκεκριμένης καλλιέργειας στα σημεία αυτά.

Πίνακας 6.44: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων νιτρικών ιόντων (mg/kg), pH, %ανθρακικών και %TOC στα σημεία που βρίσκονται βόρεια του Τυρνάβου

Σημεία Βόρεια του Τυρνάβου				
ΔΕΙΓΜΑ	**NO_3 (mg/kg)**	**pH**	**Carbonates (%)**	**TOC (%)**
AG 6	29,43	7,4	0,7	1,3
AG 7	16,84	5,8	0,4	0,7
AG8	8,88	6,5	0,7	0,5
AG9	16,95	4,8	0,2	0,8
AG10	11,18	6,1	0,6	0,7
AG11	6,2	6,2	0,4	0,6
AG12	20,39	5,7	0,6	0,9
AG15	38,53	7,9	0,7	2,8
AG16	32,98	8,6	0,7	0,9
AG17	8,01	7,2	0,4	0,8
μέσος όρος	**18,939**	**6,62**	**0,54**	**1,0**
ελάχιστο	**6,2**	**4,8**	**0,2**	**0,5**
μέγιστο	**38,53**	**8,6**	**0,7**	**2,8**

Πίνακας 6.45: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων νιτρικών ιόντων (mg/kg), pH, %ανθρακικών και %TOC στα σημεία που βρίσκονται νότια του Τυρνάβου

Σημεία Νότια του Τυρνάβου				
ΔΕΙΓΜΑ	**NO_3 (mg/kg)**	**pH**	**Carbonates (%)**	**TOC (%)**
AG1	18,17	6,1	0,3	0,6
AG 2	8,15	6,9	0,7	0,8
AG 3	19,3	7,1	0,6	0,5
AG 4	12,37	5,7	0,72	0,6
AG 5	11,12	6,2	0,6	0,5
AG13	53,27	5,8	0,2	1,6
AG14	5,3	7	0,7	1,1
μέσος όρος	**18,24**	**6,4**	**0,55**	**0,81**
ελάχιστο	**5,3**	**5,7**	**0,2**	**0,5**
μέγιστο	**53,27**	**7,1**	**0,72**	**1,6**

Πίνακας 6.46: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας

Περιοχή	**Εύρος NO_3 (mg/kg)**	**μέση τιμή (mg/kg)**	**Αναφορά**
Εδάφη βόρεια του Τυρνάβου	6,3-38,5	18,9	Παρούσα εργασία
Εδάφη νότια του Τυρνάβου	5,3-53,3	18,2	Παρούσα εργασία
Ελασσόνα (εδάφη με καπνα και αραβόσιτο)	1,68-408,65	67,48	Δημάκας 2004
Καρποχώρι Καρδίτσας	2,5-334,8	168,65	Μέρμηγκας 2002
Καλλιφώνιο Καρδίτσας	3,0-318,5	160,5	Μέρμηγκας 2002
Άμπελος Καρδίτσας	3,6-276,6	139,8	Μέρμηγκας 2002
Δασοχώρι Καρδίτσας	3,1-137,5	70,01	Μέρμηγκας 2002
Αλμυρός Μαγνησίας	13,4-44,5	23,5	Δερμάτη 2009
Αγ.Δημήτριος Μαγνησίας	12,5-40,12	28,4	Δερμάτη 2009
Δρυμώνας Μαγνησίας	18,56-62,86	35,25	Δερμάτη 2009
Σούρπη Μαγνησίας	12,35-36,59	28,08	Δερμάτη 2009
Μικροθήβες Μαγνησίας	16,5-26,3	21,6	Δερμάτη 2009
Αρμένιο Θεσσαλίας	5,0-62,5	19,98	Λιόλιου 2008
Νίκη Θεσσαλίας	10,3-42,0	19,3	Λιόλιου 2008
Μελία Θεσσαλίας	9,65-36,5	22,24	Λιόλιου 2008

Περιοχή	**Εύρος NO_3 (mg/kg)**	**μέση τιμή (mg/kg)**	**Αναφορά**
Μέλισσα Θεσσαλίας	14,5-27,6	20,9	Λιόλιου 2008
Καστρί Θεσσαλίας	12,5-34,1	22,2	Λιόλιου 2008
Αχίλλειο Θεσσαλίας	17,6-24,9	20,98	Λιόλιου 2008

Παρατηρείται ότι ο οι μέσοι όροι των δειγμάτων βόρεια και νότια του Τυρνάβου δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους, καθώς οι τιμές ήταν παρόμοιες (18,9-18,2 mg/kg). Η μέγιστη μετρούμενη τιμή νιτρικών ιόντων νότια του Τυρνάβου ήταν μεγαλύτερη από την τιμή που προσδιορίστηκε βόρεια του Τυρνάβου.

Παρατηρείται ότι οι μέσοι όροι στην περιοχή μελέτης Τυρνάβου ήταν αρκετά μικρότεροι από τα εδάφη της Ελασσόνας και της Καρδίτσας, λίγο χαμηλότεροι από τις τιμές σε εδάφη της Μαγνησίας και παρόμοιοι με τις τιμές από τις τιμές των εδαφών της Θεσσαλίας.

6.23 Συνοπτική αξιολόγηση απόδοσης εναλλακτικής μεθόδου

Ο προσδιορισμός των νιτρικών ιόντων σε υδατικά δείγματα μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαφορετικές αναλυτικές μεθόδους, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Η εναλλακτική μέθοδος αναγωγής των νιτρικών με χλωριούχο βανάδιο και μέτρησή τους με την αντίδραση Griess που αναπτύχθηκε κατά την παρούσα εργασία, τόσο για δείγματα υπόγειων νερών, όσο και για εδαφικά εκχυλίσματα, αποδείχτηκε ότι δίνει τα επιθυμητά και αξιόπιστα αποτελέσματα ως προς την αναλυτική επίδοση (καλή επαναληψιμότητα, ορθότητα και αναπαραγωγιμότητα) και για τα δύο υποστρώματα.

Εκτός από την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, η διαδικασία προσδιορισμού των νιτρικών ιόντων που προτείνεται από την παρούσα εργασία παρουσιάζει και αρκετά ακόμα πλεονεκτήματα:

- είναι αρκετά εύκολη καθώς δεν έχει πολλά στάδια προκατεργασίας των δειγμάτων, ούτε και πολλά ενδιάμεσα στάδια πριν την τελική μέτρηση
- η οργανολογία επίσης που απαιτείται είναι σχετικά απλή, καθώς απαιτείται μόνο ένα φασματοφωτόμετρο ώστε να μετρηθεί η απορρόφηση των δειγμάτων στα 540nm
- ο χρόνος που απαιτείται για την ανάλυση είναι σχετικά μικρός,
- μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των νιτρικών ιόντων σε αρκετούς τύπους δειγμάτων, όπως αγροτικές απορροές, τεχνητό θαλασσινό νερό, υδατικά απόβλητα, στραγγίσματα υγροτόπων, δείγματα ορού γάλακτος και ούρων

Από τη σύγκριση των τιμών των δειγμάτων υπόγειων νερών και εκχυλισμάτων εδαφών που αναλύθηκαν τόσο με την εναλλακτική μέθοδο όσο και με την μέθοδο αναγωγής με στήλη καδμίου, αποδείχθηκε η καταλληλότητα της πρώτης μεθόδου, καθώς ο χρόνος ανάλυσης και η αξιοπιστία της εναλλακτικής μεθόδου ήταν καλύτερα και επίσης αποφεύγεται η τοξικότητα του καδμίου (για τον αναλυτή και το περιβάλλον).

Όπως όλες οι αναλυτικές μέθοδοι, έτσι και η εξεταζόμενη μέθοδος μπορεί να έχει κάποια προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν ώστε τα αποτελέσματα που παράγονται να είναι αξιόπιστα. Τα προβλήματα όμως που έχει η συγκεκριμένη μέθοδος είναι εύκολο να αντιμετωπιστούν. Τέτοια είναι:

- δείγματα τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις φωσφορικών, θειικών ή διαλυτής οργανικής ύλης (πάνω από 100 ppm), μπορεί να μειώσουν την απόδοση της αντίδρασης αναγωγής των νιτρικών σε νιτρώδη με τη χρήση χλωριούχου βαναδίου, όταν οι συγκεντρώσεις των νιτρικών είναι χαμηλότερες από 0,05 ppm N. Αυτό το πρόβλημα λύνεται απλώς χρησιμοποιώντας περισσότερο όγκο αντιδραστηρίου (χλωριούχο βανάδιο, σουλφανιλαμίδιο και ναφθυλ-αιθυλένο-διαμίνη, μικτό αντιδραστήριο)
- παρεμποδίσεις μπορούν να προκληθούν από φυσικώς χρωματισμένα δείγματα ή θολά δείγματα. Αυτές μπορούν να διορθωθούν ή να εξαλειφθούν με απλές μεθόδους (διήθηση ή μέτρηση σε διαφορετικό μήκος κύματος)

Για την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου σε διαφορετικά υποστρώματα θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας κάποιους πρόσθετους προσδιορισμούς που πρέπει να πραγματοποιηθούν, όπως για παράδειγμα η πραγματοποίηση μιας συστηματικής έρευνας με ποικιλία πραγματικών δειγμάτων, η οποία θα εμπλουτίσει την εμπειρική βάση δεδομένων για την αξιολόγηση της αποδοτηκότητά της.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να γίνει επικύρωση/επαλήθευση της νέας εναλλακτικής μεθόδου προσδιορισμού νιτρικών και να αποδειχτεί ότι α) μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία με το διαθέσιμο εξοπλισμό του Εργαστηρίου Χημείας Περιβάλλοντος και β) ότι η εφαρμογή της όχι μόνο σε δείγματα υπόγειων νερών αλλά και σε εκχυλίσματα εδαφών δίνει τα επιθυμητά και αξιόπιστα αποτελέσματα ως προς την αναλυτική επίδοση (καλή επαναληψιμότητα και ορθότητα).

Τα συμπεράσματα που εξήχθησαν είναι τα εξής:

- Οι βέλτιστες συνθήκες αναγωγής με VCl_3 για τον προσδιορισμό των νιτρικών ιόντων σε πραγματικά δείγματα είναι 45 λεπτά χώνευση στους 60^{o}C.

- Για λόγους ευκολίας αλλά και ομοιογένειας στους προσδιορισμούς είτε εκείνοι είναι για υδατικά δείγματα είτε για εδαφικά εκχυλίσματα αποφασίστηκε η μέτρηση να γίνεται ως εξής: Καμπύλη αναφοράς σε απιονισμένο νερό, να υπολογίζονται καμπύλες αναφοράς της μορφής y= ax με τυφλό στη θέση αναφοράς απιονισμένο και για τα εδαφικά δείγματα να μετριέται και τυφλό KCl που η συγκέντρωσή του να αφαιρείται.

- Η μέθοδος αναγωγής νιτρικών με VCl_3 και η μέθοδος με στήλη καδμίου βρέθηκαν ισοδύναμες για τα υδατικά δείγματα, ενώ για τα εδαφικά εκχυλίσματα είναι πιο αξιόπιστη η μέθοδος του χλωριούχου βαναδίου. Επιπλέον, λόγω των μειονεκτημάτων της στήλης καδμίου, επιλέγεται πλέον στο εργαστήριο η μέθοδος του χλωριούχου βαναδίου.

- Το όριο ανίχνευσης για τα υδατικά δείγματα είναι 0,6 μmolN/L, ενώ για τα εδαφικά 3,3 μmolN/L και το ποσοτικοποίησης τα 2μmolN/L και 12,2μmolN/L αντίστοιχα.

- Για τα υδατικά δείγματα βρέθηκε ότι όσο αυξάνει το επίπεδο συγκέντρωσης νιτρικών μειώνεται η διευρυμένη αβεβαιότητα.

- Για τα εδαφικά δείγματα αποφασίστηκε να τηρείται χρόνος ανακίνησης / εκχύλισης 1,5 ώρες.

- Ο προσδιορισμός των νιτρικών ιόντων μπορεί να γίνει είτε σε νωπό, είτε σε ξηρό δείγμα χωρίς να υπάρχει κάποια διαφορά.

- Η ανάλυση μπορεί να γίνεται σε όποιο από τα δύο κλάσματα εδάφους (<100mm και <2mm) είναι διαθέσιμο καθώς δεν αποδείχθηκε διαφορά στη μετρούμενη συγκέντρωση εκχυλίσιμων νιτρικών.

- Τα αποτελέσματα της ορθότητας, της επαναληψιμότητας αλλά και της αναπαραγωγιμότητας, τόσο για τα υδατικά, όσο και για τα εδαφικά δείγματα, είναι απόλυτα αποδεκτά και ικανοποιητικά, σύμφωνα με τις οδηγίες του AOAC.

Αποτελέσματα στα πραγματικά δείγματα

- Οι μέσοι όροι των δειγμάτων βόρεια και νότια του Τυρνάβου δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους.
- Οι μέσοι όροι των εδαφικών δειγμάτων του Τυρνάβου που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία βρέθηκαν μικρότεροι τους αντίστοιχους των εδαφών της Ελασσόνας, της Καρδίτσας και της Μαγνησίας, ενώ ήταν παρόμοιοι με τις τιμές των εδαφών της Θεσσαλίας.

Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα καθίσταισαφής η αναγκαιότητα για εκτενέστερη έρευνα η οποία θα μπορούσε να περιλαμβάνει:

- Αναλύσεις διαφορετικών υδατικών δειγμάτων (θαλασσινά δείγματα, υγρά απόβλητα, στραγγίσματα)
- Αναλύσεις διαφορετικών εδαφικών δειγμάτων (διαφορετικού pH, ορυκτολογικής σύστασης)

Οι οποίες θα εμπλουτίσουν την εμπειρική βάση δεδομένων για την αξιολόγηση της αποδοτικότητας της μεθόδου

Ένα ακόμα πεδίο έρευνας θα ήταν η ταυτόχρονη εφαρμογή και σύγκριση των αποτελεσμάτων ίδιων πραγματικών εδαφικών δειγμάτων και υλικών αναφοράς τα οποία έχουν υποστεί αναγωγή με χλωριούχο βανάδιο και με τη μέθοδο Kjeldahl ώστε να συγκριθεί το ποσοστό του αζώτου που μετράται με την κάθε μέθοδο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ayers R.S, Westcot D.W., 1985, FAO, Water Quality for Agriculture, Irrigation and Drainage Paper, Rome.

Beda N., and Nedospasov A., 2005, A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. Nitric Oxide, 13, 93-97.

Bernhard A., 2012, The Nitrogen Cycle, Ανάκτηση από: http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-15644632.

Blakemore, L. C., Searle, P. L. , and Daly, B. K. 1987, Methods for chemical analysis of soils. N.Z. Soil Bureau Scientific Report 80, Lower Hutt, N.Z.

Bremner J. M., 1965, Inorganic forms of nitrogen. P. 1179 – 1237. In. C.A. Black et al, (eds.) Methods of soil analysis. Part 2. Agron. Monogr. 9. Am. Soc. of Agr., Madison, WI.

Bremmer J. M., D.R. Keeney, 1965, Determination and isotopic ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: I. Apparatus and procedure for distillation for and determination of ammonium. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 29:504-507.

Bruning-Fann C.S., Kaneene J.B., Lloyd J.W., Stein A.D., Thacker B., Hurd H.S., 1996, Associations between drinking-water nitrate and the productivity and health of farrowing swine. Preventive Veterinary Medicine, 26, 33-46.

Bryan N. S., Alexander D. D., Coughlin J. R., Milkowski A. L., Boffetta, P., 2012, Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review. Food and Chemical Toxicology, 50, 3646-3665.

Bryan N.S, van Grinsven H., 2013, The Role of Nitrate in Human Health. Advances in Agronomy, vol. 119, 154-176.

Colman B.P., Fierer N., Schimel J.P., 2007, Abiotic nitrate incorporation in soil: is it real? Biogeochemistry 84, 161-169.

Davidson E.A., Dail D.B., Chorover J., 2008, Iron interference in the quantification of nitrate in soil extracts and its effect on hypothesized abiotic immobilization of nitrate. Biogeochemistry 90, 65-73.

De Bièvre P., 2010, Measurement Uncertainty in Chemical Analysis, Uncertainty calculations in the certification of reference materials, Helmut Gűnzler Ed., Springer, ISBN 3642078842, page 97.

Doane T.A., Horwath,W.R., 2003, Spectrophotometric determination of nitrate with a single reagent. Anal. Lett. 36, 271–2722.

Environmental Protection Agency, 2011, Part 136, Appendix B—Definition and Procedure for the determination of the method detection limit-Revision 1.11

Eurachem/CITAC Guide CG4, 2000, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Second Edition, Διαθέσιμο στο Διαδίκτυο http://eurachem.org, Guides and Documents

Eurachem Guide, 1998, The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Διαθέσιμο στο Διαδίκτυο http://eurachem.org, Guides and Documents

European Commission, 2008, Drinking Water Directive, 98/83/EC

European Environment Agency (EEA), 1999, Nutrients in European ecosystems, Environmental assessment report No 4, N. Thyssen.

Fenn M.E., Poth, M.A, Aber J.D., Baron J.S., Bormann B.T., Johnson D.W., Lemly A.D., McNulty S.G., Ryan D.F., and Stottelmeyer R., 1998, Nitrogen Excess in North American Ecosystems: a Review of Geographic Extent, Predisposing Factors, Ecosystem Responses, and Management Strategies. Ecol. Appl. 8:706-733.

Galloway J.N., Levy H., and Kasibhatla P.S., 1994, Year 2020: Consequences of Population Growth and Development on the Deposition of Oxidized Nitrogen. Ambio 23:120-123.

Gastal F., and Lemaire G., 2002, N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. Journal of Experimental Botany 53: 789-799.

Gerlach R., Dobb D.E., Raab G.A., and Nocerino J.M. 2002, Sampling Theory in Environmental Studies. 1. Assessing Soil Splitting Protocols. J. Chemometrics, 16: 321–328.

Geniatakis E., Fouskaki M., and Chaniotakis N.A., 2003, Direct Potentiometric Measurement of Nitrate in Seeds and Produce, Communications in soil science and Plant Analysis, Vol.34, pp. 571-579.

Hansen H.P., Koroleff, F., 1999, Determination of nutrients, In: Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K. (Eds.), Methods of Seawater Analysis, 3rd ed. Verlag Chemie,Weinheim.

Haynes, R. J. and Swift, R. S., 1989, Effect of rewetting air-dried soils on pH and accumulation of mineral nitrogen. J. Soil Sci. 40: 340-347.

Heffernan, B. 1985, A handbook of methods of inorganic chemical analysis for forest soils, foliage and water. CSIRO, Canberra, Australia.

Horita K., Wang G., Satake M., 1997, Spectrophotometric determination of nitrate and nitrite in soil and water samples with diazotizable aromatic amine and coupling agent using column preconcentration on naphthalene supported with ion-pair of tetradecydimethybenzylammonium and iodide. Analytica Chimica Acta 350, 295-303.

Houba, V. J. G. , Lee J. J., Novozamsky I., and Walinga I., 1988, Soil and plant analysis. Part 5: Soil analysis procedures. Wageningen Agricultural University, The Netherlands.

ISO GUIDE, 1993, Guide To The Expression Of Uncertainty In Measurements, Reprinted 1995: Reissued as ISO Guide 98-3 (2008), http://www.bipm.org

ISO GUIDE 43-1, 1997, Development and Operation of Laboratory Proficiency testing, Second Edition.

ISO GUIDE 43-2, 1997, Selection and Use of Proficiency Testing Schemes by Laboratory Accreditation Bodies", First Edition.

ISO 14256-1 Soil quality – Determination of nitrate, nitrite and ammonium in field moist soils by extraction with potassium chloride solution – part 1: manual method.

IUPAC Technical Report, 2002, Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis, Pure Appl. Chem., 74 (5) 835/855.

Jackson G., and Williams P., 1985, Importance of dissolved organic nitrogen and phosphorus to biological nutrient cycling, Deep Sea Research, τόμ. 32, αρ. 2, pp. 223-235

Justic D., Rabalais N., Turner R. E., and Dortch Q., 1995, Changes in nutrient structure of river-dominated coastal waters: Stoichiometric nutrient balance and its consequences» Estuarine Coastal & Shelf Science, τόμ. 40, pp. 339-356.

Keeney D. R. and Nelson D. W, 1982, Nitrogen in organic forms. Pages 643-698 in A. L. Page et al., Eds. Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy No. 9, American Society of Agronomy, Madison, WI.

Laverty D. H., Bollo-Kamara A., 1988, Recommended methods of soil analyses for Canadian Prairie agricultural soils. Alberta Agriculture, Edmonton, Alberta. Rep. 300.

Loukas A., 2010, Surface water quantity and quality assessment in Pinios River, Desalination, τόμ. 250, pp. 266-273.

Lyons P., Balls P.and Turell W., 1993, A preliminary study of the relative importance of riverine nutrients inputs to the Scottish Nort sea coastal zone, Marine Pollution Bulletin, vol. 26, 11, pp. 620-628.

Maynard D.G., Kalra Y.P., Crumbaugh J.A., 2008, Nitrate and exchangeable ammonium nitrogen. In: Carter, M.R., Gregorich, E.G. (Eds.), Soil Sampling and Methods of Analysis, second ed. Canadian Society of Soil Science, CRC Press, pp. 71-80.

Merino L., Edberg U., Fuchs G., and Aman P., 2000, Liquid chromatographic determination of residual nitrite/nitrate in foods: NMKL collaborative study. Journal of AOAC International, 83, 365-375.

Miller J. C. and Miller J. N., 2010, Statistics and Chemometrics for Analytical chemistry, Sixth Edition, Pearson Education Limited, ISBN: 978-0-273-73042-2, pp 74-106

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 1986, The analysis of agricultural materials; a manual of the analytical methods used by the Agricultural Development and Advisory Service, London. Reference Book 427.

Mir S.A., 2008, A rapid technique for determination of nitrate and nitric acid by acid reduction, Anal. Chim Acta, 620, 183–189.

Miranda K. M., Espey M. G., Wink D. A., 2001, A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide, 5, 62-71.

Mulvaney R.L., 1996, Nitrogen – Inorganic forms. P. 1123 – 1184. In D.L.Sparks et al. (eds). Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical methods. Soil Science Society of America, Am. Soc. of Agr., Madison, WI.

Muneta P., 1980, Analytical errors resulting from nitrate contamination of filter paper. J. Assoc. Off. Anal. Chern. 63: 937-938.

Murphy A., Nizzoli D., Bartoli M., Smyth A., Castaldelli G., Anderson I., 2018, Variation in benthic metabolism and nitrogen cycling across clam aquaculture sites, Marine Pollution Bulletin, Vol. 127, 524-535.

Norman R. J., Edberg J. C., and Stucki J. W.. 1985, Determination of nitrate in soil extracts by dualwavelength ultraviolet spectroscopy. Soil Science Society Am. J. 49: 1182-1185.

Nuñez L., Cetó X., Pividor M.I., Zanoni M.V.B., del Valle M.,2013,. Development and application of an electronic tongue for detection and monitoring of nitrate, nitrite and ammonium levels in waters. Microchemical Journal, 110 273-279.

Papadoyannis I.N. and Samanidou V.F., 2004, Validation of HPLC Instrumentation. J. Liq.Chromatogr. & Rel.Technol. Vol. 27, No. 5, 753–783.

Papadoyannis I.N. and Samanidou V.F., 2005, Validation of HPLC Instrumentation. Encyclopedia of Chromatography. Marcel Dekker. Jack Cazes Ed. Second Edition, Pages 1743 – 1758.

Papathanassiou E. and Zenetos A., 2005, State of the Hellenic marine environment, Athens: H.C.M.R.

Postigo C., Martinez D.E., Grondona S., Miglioranza K.S.B., 2018, Groundwater Pollution: Sources, Mechanisms, and Prevention, Encyclopedia of the Anthropocene, Vol. 5, pp 87-96.

Reimann R. C., Filzmoser P., Garrett R. G., and Dutter R., 2008, Statistical Data Analysis Explained: Applied Environmental Statistics, John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 978-0-470-98581-6

Samecka-Cymerman A., Kempers A.J., 2001, Concentrations of heavy metals and plant nutrients in water, sediments and aquatic macrophytes of anthropogenic lakes (former open cut brown coal mines) differing in stage of acidification, Science of The Total Environment, Vol. 281, 1–3, 87-98.

Shah V.P., Midha K.K., Dighe S.V., 1992, Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Pharm Res. 9, 588–592.

Smith V., 2003, Eutrophication of freshwater and marine ecosystems: a global problem, Environmental Sciience and Pollution Research, τόμ. 10, p. 126–139.

Smith V., and Schindler D., 2009, Eutrophication science: where do we go from here?, Trends in Ecology and Evolution, τόμ. 24, αρ. 4, p. 201–207.

Soltanpour, P. N. and Workman, S. M. 1981. Soil-testing methods used at Colorado State University soil testing laboratory for the evaluation of fertility, salinity, sodicity and trace element toxicity. Technical Bulletin 142. Colorado State University, Fort Collins, CO.

Sparrow S. D., Masiak, D. T. 1987, Errors in analysis for ammonium and nitrate caused by contamination from filter papers. Soil Sci. Soc. Am. J. 51: 107-110.

Stoddard J., 1994, Long-term Changes in Watershed Retention of Nitrogen; Its Causes and Aquatic Consequences. In Baker, L.A. (ed.). Environmental Chemistry of Lakes and Reservoirs. Washington, D.C.: American Chemical Society: pp. 223-284.

Suzuki I., Dular U., and Kwok S.C., 1974, Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J. Bacteriol.* 120:556-558.

Taylor A., Angerer J., Claeys F., Kristiansen J., Mazarrasa O., Menditto A., Patriarca M., Pineau A., Schoeters I., Sykes C., Valkonen S. and Weykamp C., 2002, Comparison of procedures used to evaluate laboratory performance in external quality assessment schemes for lead in blood and aluminium in serum demonstrates the need for common quality specifications, Clinical Chemistry, 48: 2000-2007.

Vitousek P.M., Aber J.D., Howarth R.W., Likens G.E., Matson P.A., Schindler D.W., Schlesinger W.H., and Tilman D.G., 1997, Human Alteration of the Global Nitrogen Cycle: Sources and Consequences. Ecol. Appl. 7(3):737-750.

Watanabe Marcos D.B., Ortega E., 2011, Ecosystem services and biogeochemical cycles on a global scale: valuation of water, carbon and nitrogen processes. Environmental science & policy 14, 594-604.

Watson S.W., 1971, Taxonomic considerations of the family Nitrobacteriaceae Buchanan. Request for opinions. Int. J. Syst. Bacteriol. 21:254-270.

Watson S.W., Bock E., Valois F.W., Waterbury J.B. and Schlosser U., 1986, *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithoautotrophic nitrite – oxidizing bacterium. Arch. Mikrobiol. 144:1-7.

Wetzel R.G., 2001, "Limnology: Lake and River Ecosystems", 3rd Edition, Elsevier, 205-220.

Williams J.N., Baron J., Caine R., Sommerfeld R., and Sanford J.R., 1996, Nitrogen Saturation in the Rocky Mountains. Environ. Sci. & Tech. 30:640-646.

Worsfold P., 2008, Characterization and quantification of organic phosphorus and nitrogen components in aquatic systems: A review, Analytica Chimica Acta, τόμ. 624, αρ. 1, pp. 158 37-58.

Xing W., Wua H.-P., Hao B.-B. and Liu G.-H., 2013, Stoichiometric characteristics and responses of submerged macrophytes to eutrophication in lakes along the middle and lower reaches of the Yangtze River. Ecological Engineering, 54, 16– 21.

Zhao Y., Zhang L., Chen Y., Liu X., Xu W., Pan Y., Duan L., 2017, Atmospheric nitrogen deposition to China: A model analysis on nitrogen budget and critical load exceedance, Atmospheric Environment, Vol. 153, 32-40.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Αναλογίδης, ΑΔ., 2000, Έδαφος, θρεπτικά στοιχεία και φυτική παραγωγή. Εκδόσεις ΑΓΡΟ-τύπος Α.Ε., Αθήνα.

Βαλαβανίδης Α., Βλαχογιάννη Θ., 2009, Περιβαλλοντική Χημεία & Οικοτοξικολογία Διαχείριση Οικοσυστημάτων Εκτίμηση Οικολογικού Κινδύνου. Αθήνα. Εκδόσεις Σύγχρονα Θέματα http://www.chem-tox-ecotox.org/wp/wp-content/uploads/2010/Env%20Chem%20Management.pdf

Δερμάτη Κ., 2009, Μελέτη των επιπέδων νιτρικών, νιτρωδών, φωσφορικών, θειικών, χλωριούχων και βρωμιούχων ιόντων σε γεωργικά εδάφη της Θεσσαλίας, πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Εδαφολογίας

Δημάκας Δ., 2004, Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νιτρικών και νιτρωδών ιόντων σε εδάφη του νομού Λαρίσης (περιοχή Ελασσόνας) και απεικόνιση των αποτελεσμάτων με γεωγραφικά συστήματα πληροφοριών, πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Εδαφολογίας

Επίσημη εφημερίδα των Ευρωπαϊκών κοινοτήτων, «Οδηγία 98/83/ΕΚ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ 3/11/1998 σχετικά με την ποιότητα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης» Available:http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EL:PDF

Εφημερίς της Κυβερνήσεως της Ελληνικής Δημοκρατίας, 2001, ΑΠΟΦΑΣΕΙΣ. Αριθ. 25638/2905 Πρόγραμμα δράσης για το Θεσσαλικό πεδίο ως ευπρόσβλητη ζώνη από την νιτρορύπανση γεωργικής προέλευσης., Αρ. Φύλλου 1422 (Τεύχος 2), σσ. 20169-20184

Εφημερίς της Κυβερνήσεως της Ελληνικής Δημοκρατίας, 2011, ΑΠΟΦΑΣΕΙΣ. Αριθ. Οικ. 1811. Ποιοτικά πρότυπα και ανώτερες αποδεκτές τιμές για τους ρύπους των υπογείων υδάτων και δείκτες ρύπανσης, Αρ. Φύλλου 3322 (Τεύχος 2), σσ. 46701-46704.

Κουππάρης Μ., 2015, Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας - Διαπίστευση. Έκδοση: 1.0. Αθήνα, Εθνικό και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών, Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: http://opencourses.uoa.gr/courses/CHEM102/

Λιόλιου Ε., 2008, Μελέτη του βαθμού ρύπανσης των εδαφών της Θεσσαλίας από νιτρικά, νιτρώδη, φωσφορικά ιόντα, καθώς και βαρέα μέταλλα. Προσδιορισμός των αντίστοιχων επιπέδων σε βαμβάκι *(Gossupium hirsutum)* πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Εδαφολογίας

Μέρμηγκας Δ., 2002, Προσδιορισμός νιτρικών ιόντων σε εδάφη του νομού Καρδίτσας, πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Εδαφολογίας

Οδηγία AOAC, διαθέσιμη στη δικτυακή διεύθυνση: http://www.aoac.org/imis15_prod /AOAC_Docs/ Standards Development /SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf

Οδηγία 98/83/ΕΚ του Συμβουλίου της 3ης Νοεμβρίου 1998 σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης.

Οδηγία 2006/118/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 12ης Δεκεμβρίου του 2006 σχετικά με την προστασία των υπόγειων υδάτων από τη ρύπανση και την υποβάθμιση.

Σκούλλος Μ., 2010, Χημεία Περιβάλλοντος. Αθήνα: Εκδόσεις Συμμετρία.

Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας, Δικτυακός Τόπος Διαβουλεύσεων, Έγκριση κώδικα για την προστασία των νερών στο πλαίσιο οδηγίας, Άρθρο 03: ΟΡΙΣΜΟΙ (http://www.opengov.gr/minenv/?p=6537)

ΦΕΚ Β' 519/25-6-1997, ΚΥΑ 161690/1335/1997, εναρμόνιση Εθνικής Νομοθεσίας με την Οδηγία 91/676 της Ε.Ε.

ΦΕΚ Β 477/6-4-2000, Αριθμός 85167/820/20-3-2000 Υπουργική Απόφαση «Κώδικας Ορθής Γεωργικής Πρακτικής» για την προστασία των νερών από νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης''

http://www.ypeka.gr/