

**ATMOSFERSKA TALOŽENJA U ŠUMSKIM EKOSUSTAVIMA EUROPE I ISTRAŽIVANJE
NOVIH METODA ODREĐIVANJA FOSFORA I AMONIJKALNOG DUŠIKA
U OKVIRU ICP FORESTS PROGRAMA**

**ATMOSPHERIC DEPOSITION IN FOREST ECOSYSTEM OF EUROPE AND RESEARCH
OF NEW METHODS FOR DETERMINATION OF PHOSPHORUS AND
AMMONIA WITHIN A FRAMEWORK OF ICP FORESTS**

Tamara JAKOVLJEVIĆ*, Katarina BERKOVIĆ, Gabriele TARTARI***,
Boris VRBEK*, Jasna VORKAPIĆ-FURAČ****

SAŽETAK: U sklopu programa ICP Forests, provode se intenzivna i stalna motrenja stanja šumskih ekosustava Europe s posebnim osvrtom na atmosferska taloženja. Istražuju se nove metode određivanja pojedinih kemijskih elemenata zbog specifičnosti uzoraka. Fosfor i dušik su za biosferu elementi od najveće važnosti. Stoga je određivanje koncentracija fosfora i dušika od neprocjenjive važnosti u poznavanju, kontroli i modeliranju biokemijskih ciklusa šumskog ekosustava.

U ovom radu ispitana je primjenjivost nove kolorimetrijske metode na automatskom analizatoru za određivanje fosfora i amonijakalnog dušika u uzorcima atmosferskih oborina, u svrhu unapređenja postojeće metodologije koja se koristi u ICP Forests, međunarodnom istraživačkom programu. Do sada korištene standardne metode određivanja fosfora i amonijakalnog dušika su metode spektrofotometrijske analize. U postupku validacije nove kolorimetrijske metode na automatskom analizatoru primijenjeni su sljedeći kriteriji: grafička analiza rezultata mjerenja, točnost, linearnost metode, radno područje metode, granica detekcije i granica kvantifikacije te ponovljivost. Rezultati određivanja pokazuju da je nova metoda određivanja fosfora i amonijakalnog dušika linearna u ispitivanom području, a t-testom je potvrđeno, da razlike rezultata određivanja pomoću dviju metoda određivanja fosfora i amonijakalnog dušika uz razinu pouzadnosti od 99,99 %, nisu značajne. Na osnovi kontrolnih karata te utvrđenih granica detekcije i kvantifikacije određenih novom metodom, utvrđena je dobra ponovljivost i veća osjetljivost nove metode. Nova metoda određivanja može se s potpunom sigurnošću primijeniti u znanstveno-istraživačkom radu i biti dobra zamjena postojećim standardnim metodama. Ova metoda s potpunom sigurnošću će se moći primjenjivati u znanstveno-istraživačkom radu i ICP Forests programu, jer je prilagođena upravo specifičnostima uzoraka uzetih iz šumskog ekosustava.

Ključne riječi: amonijakalni dušik, automatski analizator, atmosferska taloženja, fosfor, ICP Forests, spektrofotometrija, validacija metode

* Mr. sc. Tamara Jakovljević, dr. sc. Boris Vrbeč, Šumarski institut Jastrebarsko, Cvjetno naselje 41, 10450 Jastrebarsko, Hrvatska, tamaraj@sumins.hr

** Dr. sc. Katarina Berković, red. prof., dr. sc. Jasna Vorkapić-Furač, red. prof., Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

*** Gabriele Tartari, CNR ISE, Largo Tonolli 50, 28922 Verbania Pallanza, Italija

UVOD – Introduction

S obzirom na činjenicu da su najvažniji uzročnici propadanja šuma onečišćenja prisutna u zraku, 1985. godine je u okviru Konvencije UN i Europske komisije o prekograničnom onečišćenju (CLRTAP) osnovan Međunarodni program za procjenu i motrenje utjecaja onečišćenja iz zraka na šume (International Cooperative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests, skraćeno ICP Forests) (Seletković i Potočić, 2004). Zadatak spomenutog programa je prikupljanje podataka o stanju šuma. U tu svrhu provode se intenzivna i stalna motrenja šumskih

ekosustava Europe, kako bi se utvrdila oštećenost uzrokovana onečišćenjima atmosfere i drugim čimbenicima, koji utječu na stanje šuma. (Mosello i sur. 2005).

Izabrano je više od 860 ploha intenzivnog motrenja u najvažnijim šumskim ekosustavima u 30 europskih zemalja (Lorenz i Fischer, 2006). Na svakoj plohi intenzivnog motrenja prikupljani su sljedeći podaci: broj ploha, broj stabala, vrsta drveća, podaci o tlu, podaci o lišću/iglicama, podaci o atmosferskim taloženjima, podaci o rastu drveća, meteorološki podaci te zemljopisni i topografski položaj plohe.

Cilj praćenja atmosferskih taloženja šumskim plohamu Europe

Purpose of monitoring atmospheric deposition in forested European sites

Glavni zadatak intenzivnog motrenja je bolje promišljanje utjecaja zagađenja zraka na šumske ekosustave, posebice utjecaja količine sumporovih oksida (SO_x), dušikovih oksida (NO_y) i amonijaka (NH_3). Da bi se postigao cilj treba obratiti pozornost na odnos između količine taloženih tvari i parametara, koji utječu na promjene ekosustava (Ulrich 2006). Za ispitivanja oborinskih taloženja u šumi uzimaju se uzorci dobiveni metodama: prokapljanja (eng. throughfall, THR), mokrog taloženja tj. taloženja iz oborina na otvorenom području (eng. bulk open field, BOF) i procjeđivanja po površini stabla (eng. stemflow, STF). Talozjenja ispod krošanja i debla stabala su obično veća od taloženja na otvorenom području, zbog ispiranja tvari s lišća. Prilikom prolaska atmosferskih oborina preko krošanja i debla moguće je promatrati dva procesa:

1. *Ispiranje*: otopina koja sadrži većinu nutritivnih elemenata s debla se sljeva i dovodi do povećanja kon-

centracija tih elemenata u uzorku dobivenom prokapljanjem.

2. *Apsorpcija*: Lišće apsorbira većinom dušikove spojeve iz oborina, što dovodi do smanjenja njihove koncentracije u uzorcima dobivenim prokapljanjem u usporedbi s uzorcima dobivenim mokrim taloženjem.

Pasivna difuzija je glavni uzrok povećanja koncentracije aniona pri prokapljanju, dok pasivna difuzija i ionska izmjena utječu na koncentraciju kationa uzoraka dobivenih procjeđivanjem. Udio izmjene u krošnjama i deblu ovisi o vrsti drveta i ekološkim uvjetima kao što su: sezonska raspodjela lišća, opskrbljenost tla hranjivima, gnojidba, biotički stres (oštećenja uzrokovana insektima), abiotički stres (suša i ekstremne temperature) te prisutnost različitih zagađivala (Freiesleben i Ridder 2005).



Slika 1. Metode mjerenja taloženja u šumi
Figure 1 Methods for measuring deposition in forest

(Foto: Boris Vrbek)

Fizikalno-kemijska ispitivanja i uvođenje novih analitičkih metoda određivanja fosfora i amonijakalnog dušika

Physical and chemical analyses and implementation of new analytical methods for determination of phosphorus and ammonia

Fizikalno-kemijske analize uzoraka obuhvaćaju određivanja; pH, provodljivosti, ukupnog alkaliteta, aniona (sulfati, nitrati, kloridi), ukupnog fosfora, amonijakalnog, ukupnog i organskog dušika, kationa (natrij, kalij, magnezij, kalcij, aluminijski, kobalt, krom, kadmij, bakar, olovo, nikel, cink) te otopljenog organskog ugljika (ICP Forests 2006). Analiza kationa i aniona ukazuju kako nije dovoljno mjeriti samo koncentraciju pojedinih elemenata u otopini, već količinu treba svesti na g/m^2 ili kg/ha^{-1} , kako bi se dobio uvid u količinu taloženja i ispiranja u nekom šumskom ekosustavu (Vrbeč 2002).

Istraživački laboratorij za kemiju voda u Talijanskom institutu za ispitivanja ekosustava (CNR Istituto per lo Studio degli Ecosistemi) u Verbania Pallanza uključen je u ICP Forests program. U njemu se više od 20 godina provode istraživanja u području kemije površinskih i oborinskih voda, korištenjem standardnih (referentnih) metoda i uvođenjem novih metoda u svrhu unapređenja postojeće metodologije korištene u međunarodnim istraživačkim programima. Postojeće standardne metode korištene do sada za određivanje fosfora i amonijakalnog dušika u uzorcima voda su spektrofotometrijske analize na UV/VIS spektrofotometru. Cilj istraživanja je utvrditi primjenjivost nove kolorimetrijske metode na Automated Discrete Analyser AQ2 za određivanje fosfora i amonijakalnog dušika na uzorke prikupljene na ICP Forests Level II ploham.



- ▲ *Picea abies* Karst. – obična smreka
- ★ *Fagus sylvatica* L. – obična bukva
- *Quercus cerris* L. – hrast cer
- *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. – hrast kitnjak
- ◆ *Quercus ilex* L. – hrast crnika

Slika 2. ICP Level II plohe u Italiji

Figure 2 ICP Level II plots in Italy

Fosfor u atmosferskim taloženjima – Phosphorus in atmospheric deposition

Fosfor se u oborinama nalazi isključivo kao fosfat, koji je najčešće zastupljen u obliku ortofosfata, polifosfata ili organski vezanog fosfata. Izvori prisutnih fosfata su različiti i potječu od: čestica stijena, živih i neživih organizama, komponenata koje se isparavanjem oslobađaju iz biljaka i spojeva, koji nastaju pri požarima i izgaranjima fosilnih goriva. Općenito, količine prisutnog fosfora u oborinama su manje u odnosu na količine dušika. U kontinentalnom području glavni izvor fosfora u oborinama je prašina stvorena erozijom tla, te urbanim i industrijskim zagađenjima atmosfere. U planinskim područjima određena je veća količina fosfora u ljetnim mjesecima, a povećava se i količina nakupljenih nutrije-

nata u snijegu i ledu tijekom zime, koji u uzorke dopijevaju otapanjem u proljeće. Sadržaj fosfora u oborinama je relativno nizak, manji od $30 \mu\text{g L}^{-1}$ u nezagađenim područjima, dok se u urbano-industrijskim zonama povećava na preko $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Male količine fosfora u atmosferi pokazuju, da ispiranja s krošnja doprinose količinom više od 90 % fosfora u uzorcima dobivenim prokapljivanjem. Manje količine fosfora u uzorcima dobivenim prokapljivanjem mogu potjecati od prisutne zemljane prašine, posebno u šumama, koje su u blizini obrađenih poljoprivrednih zemljišta ili od ptičjih izmeta (ICP Forests 2006).

Dušik u atmosferskim taloženjima – Nitrogen in atmospheric deposition

Količina dušika dospjelog iz atmosfere, općenito se smatra neznatnom u usporedbi s onom koja je dobivena

izravnim ispiranjem tla. Promatra li se detaljnije, količina dušika iz atmosfere, koja putem oborina dopijeva

šumu, značajna je za dušikov ciklus i produktivnost. Dušik u mokrim taloženjima, koji dolazi izravno iz oborina jako ovisi o lokaciji, meteorološkim uvjetima, smjeru vjetrova, položaju izvora i jezera u odnosu na industrijske zone i poljoprivredna područja (Grennfelt i Hultberg 1986). Dominantni oblici dušika u vodama su: disocirani molekularni dušik (N_2), amonijakalni dušik (NH_4^+), nitriti (NO_2^-), nitrati (NO_3^-) i velik broj organskih spojeva kao što su aminokiseline, amini, nukleotidi i proteini (Wetzel, 2001). U nezagađenim područjima većinu vezanog dušika čini amonijakalni dušik, koji nastaje razgradnjom organskog materijala. U atmosferi prisutan amonijakalni dušik vezan s česticama prašine može se oksidirati do nitrata, tako da uzorci sadrže i amonijakalni dušik, nitrat i otopljeni organski dušik. Kemijski sastav čestica nastalih taloženjem jako je promjenjiv, jer se s krošnje ispiru različite čestice i plinovi, koji se nalaze na površini kao tvari koje prijanjaju ili su otpuštene s krošnja (Anderson 1986). Taložnjem čestica i plinova jako se povećava kiselost šumskih ekosustava, dio kiselosti dijelom se troši na stvaranje puferskih otopina izmjenom kalcijevih, magnezijevih ili kalijevih iona u tkivu lišća. Puferske reakcije mogu čak povisiti pH uzoraka nastalih

prokapljivanjem u usporedbi s uzorcima nastalim mokrim taloženjem, koji sadrže samo čestice prisutne u oborinama. Ipak, protoni uklonjeni iz toka nastalog prokapljivanjem premješteni su u unutrašnji tok drveta i konačno ulaze u tlo u zamjenu za ione hranjiva, koje iskoristi korijen kako bi nadoknadio gubitak s krošnje. Jedan dio prisutnih protona neutralizira se reakcijom amonijevih iona s česticama aerosola iz atmosfere ili s površine stabla. Amonijeve ione u šumskom ekosustavu koristi drveće u zamjenu za protone ili se oni u tlu oksidiraju do nitrata (Grennfelt i Hultberg 1986). Dušikovi spojevi su važna hranjiva i mogu se asimilirati izravno iz lišća. Značajna količina protona nastaje na površini biljke i u tkivu kao rezultat plinova sumporova(II) oksida (SO) i dušikovih oksida (NO_x) te taloženja i kasnijeg nastajanja kiselina. Kiselost na površini biljaka može se neutralizirati kationima nastalim u procesu ispiranja lišća ili iz soli nataloženih na površini lišća. Ispiranje kationa uključuje reakcije na površini, kojima se kationi na kutikuli ili staničnoj stijenci zamjenjuju s vodikovim ionima. Stvaranje pufera u krošnjama ima učinak uklanjanja protona iz toka uzoraka nastalih prokapljivanjem, ali ti protoni još uvijek mogu uzrokovati stres (Frisleben i Riddler 2005).

MATERIJALI I METODE RADA – Material and methods

Uzorci voda iz atmosferskih taloženja na ispitivanim plohama prikupljeni su dva puta mjesečno tijekom 3 mjeseca prema metodologiji ICP Foresta. Uzorci uzeti u šumi pohranjeni su u transportni hladnjak pri temperaturama od 0–4 °C i u takvom stanju dostavljani su u laboratorij, kako bi se spriječio rast mikroorganizama (Tartari 2002).

Ukupni fosfor i amonijakalni dušik u uzorcima određivani su referentnom metodom na UV/ VIS spektrofotometaru SAFAS Monaco UV mc². Fosfor se određuje pri apsorpcijskom maksimumu od 890 nm, a amonijakalni dušik pri 695 nm. Nova metoda na automatskom analizatoru SEAL AQ2, objedinjuje više kolorimetrijskih metoda koristeći mikro količine uzorka i reagensa, koji se prenose u različitim vremenima u

reakcijsku ćeliju. Očitanje apsorbancije postiže se pomoću fotometra, koji sadrži filtre koji propuštaju valne duljine svjetlosti od 695 nm za fosfor, odnosno 890 nm za amonijakalni dušik. Reakcijska ćelija mora biti termostatirana na 37 °C, a uzorci trebaju biti temperature + 4 °C. Ako koncentracija uzorka izlazi iz područja kalibracijske krivulje, instrument automatski razrijeđuje (Holler i sur. 2007). Reagensi, standardi i otopine pripremljeni su svakodnevno s ultračistom vodom (0,05 $\mu S\ cm^{-1}$ i 0,1 μm) i kemikalijama analitičke čistoće. Za izradu kontrolnih karata su praćenja ponovljivosti koristio se laboratorijski referentni materijal, pripremljen od uzoraka vode iz šume, filtrirane filterom 1 μm i konzervirane s otopinom 0,2 % kloroforma.

Postupak validacije metode – Method validation

Razvoj i validacija nove metode zahtijevala je zadovoljavanje za tu metodu važnih kriterija, a to su: točnost, linearnost metode, radno područje metode, granica detekcije kao funkcija standardne devijacije signala vrijednosti slijepih proba izračunate prema:

$$LOD = S_c - S_b \geq K_d * S.D. \quad (1)$$

gdje su S_c i S_b – određene vrijednosti za uzorak i za slijepu probu, S.D. – standardna devijacija signala slijepih proba i K_d – koeficijent proporcionalnosti, čija je preporučena vrijednost 3;

granica kvantifikacije izračunata prema:

$$LOQ = S_c - S_b \geq K_q * S.D. \quad (2)$$

gdje je: K_q koeficijent proporcije čija je preporučena vrijednost 10 (ICP Forests, 2006);

te ponovljivost, s obzirom na analitičko područje izračunati su statistički parametri kao što su relativna standardna devijacija (RSD) u %, prema izrazu :

$$RSD = S.D. / X_m \times 100 \quad (3)$$

gdje su: S.D. – standardna devijacija vrijednosti koncentracija uzoraka i X_m – srednja vrijednost koncentracija uzoraka

RSD koristila se kao mjerilo disperzije, odnosno raspršenosti rezultata tj. označavanje ponovljivosti metode.

Istraživanja su se temeljila na:

1. izboru metode za uspoređivanje – odabrana je metoda korištena kroz duži period, a njeni su rezultati točni, potvrđeni analizom referentnih materijala i komparativnim laboratorijskim ispitivanjima. U ovom radu referentna metoda je spektrofotometrijska metoda,
2. broju analiziranih uzoraka – 88 analiza fosfora i 74 amonijakalnog dušika,
3. jednostrukom ili dvostrukom mjerenje – jednostruko mjerenje uzoraka referentnim metodama i novom metodom te dvostruko mjerenje laboratorijskog referentnog materijala zbog praćenja ponovljivosti,
4. razdoblju u kojemu se provode određivanja – kod analiza novom metodom i usporedbe s referentnom metodom određivanja provode se više od 20 dana, nije bilo nužno mjeriti više od 2 do 5 uzoraka dnevno, analize su provedene u razdoblju od 3 mjeseca,
5. stabilnosti uzoraka – unutar dva sata analiza i referentnom i novom metodom ili čuvanje uzoraka na + 4 °C,
6. grafičkoj analizi rezultata u određenom radnom području – za fosfor je područje koncentracija od 0,01-0,25 mg L⁻¹, a za amonijakalni dušik područje koncentracija u području koncentracija od 0,05-2,00 mg L⁻¹,
7. statističkoj obradi rezultata – deskriptivna statistika (srednja vrijednost, standardna devijacija, broj razmatranih rezultata, minimum, maksimum i medijan) za svaku metodu određivanja, kao i za razlike dobivene različitim metodama određivanja.

Za sve statističke analize razina značajnosti od 5 % smatra se statistički značajnom. Za usporedbu referentne metode i novih metoda korištena je metoda najmanjih kvadrata (linearna regresija). Testirana je značajnost procjene pojedinih parametara (t-testom), jednadžbe linearne regresije i izračunati su intervali pouzdanosti za procjenu parametara za 99,9 % vjerojatnost. U t - testu izračunato je da li je izraz:

$$M_d \pm \left(t \frac{S_d}{\sqrt{q}} \right) \leq 0 \quad (4)$$

gdje je: q – broj razmatranih rezultata, M_d -srednja vrijednost razlika razmatranih rezultata, t - t Student za v stupnjeva slobode (v = q-1) i razina pouzdanosti α i S_d – standardna pogreška razlike. Vrijednosti M_d i S_d su izračunate prema izrazima:

$$M_d = \frac{\sum_{i=1}^q d_i}{q} \quad (5)$$

$$S_d = \sqrt{\frac{1}{q-1} \sum_{i=1}^q (d_i - M_d)^2} \quad (6)$$

gdje je: d_i – razlika između vrijednosti parametara istog uzorka određenih dvjema različitim metodama (Westgard 2003).

Svi parametri analiza, kao i grafički prikazi, sačinjeni su korištenjem programa EXCEL.

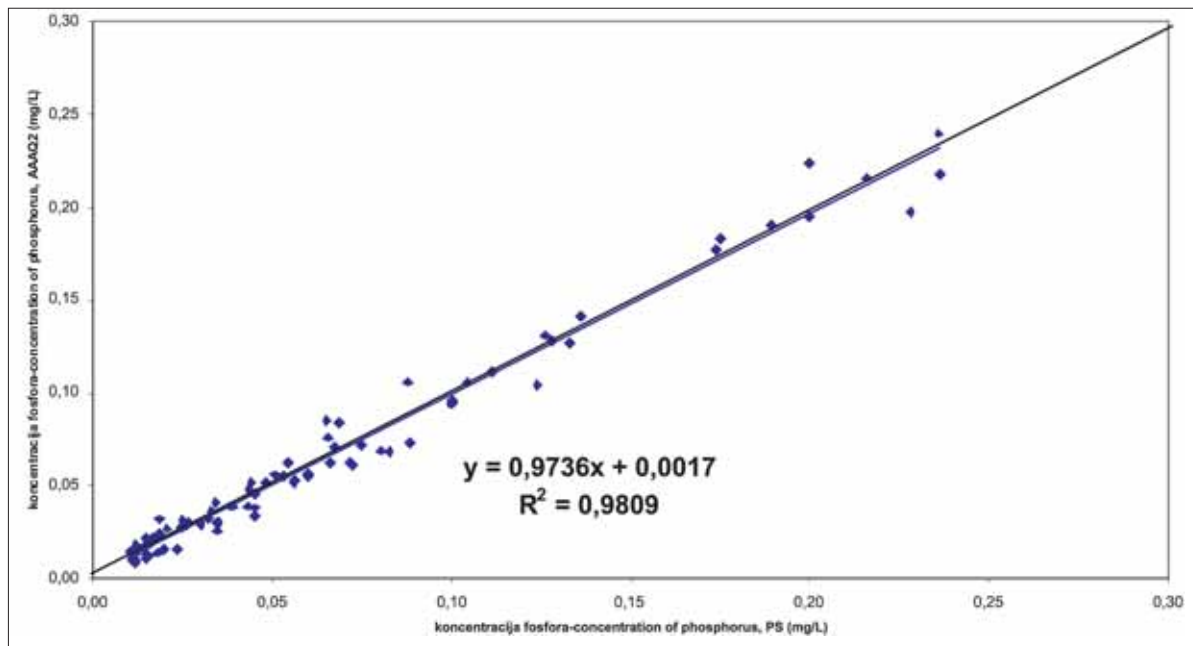
REZULTATI I RASPRAVA – Results and discussion

U istraživanjima je kao referentna metoda za validaciju određivanja fosfora novom metodom automatskim analizatorom (AA AQ2) koristila spektrofotometrijska metoda (P S) i za validaciju nove metode određivanja amonijakalnog dušika automatskim analizatorom (AA AQ2) spektrofotometrijska metoda (AN S).

Rezultati usporedbe razlika koncentracija fosfora i amonijakalnog dušika određenih različitim metodama pravilno su distribuirani oko pravca koji prolazi ishodištem, tako da je pola rezultata ispod pravca, a pola iznad pravca, koji prolazi ishodištem. Nultu hipotezu, koja je postavljena da su rezultati određivanja koncentracija fosfora dobiveni različitim metodama isti, odnosno, da su vrijednosti x i y grafičkog prikaza jednake, zadovoljava prikazani pravac y = x. Pridruživanjem rezultata dobivenih određivanjem fosfora i amonijakalnog dušika spektrofotometrijskom metodom, rezultatima određivanja fosfora i amonijakalnog dušika automatskim analizatorom, vidljivo je područje u kojem je odnos između rezultata dobivenih tim dvjema metodama linearan (slike 3 i 4).

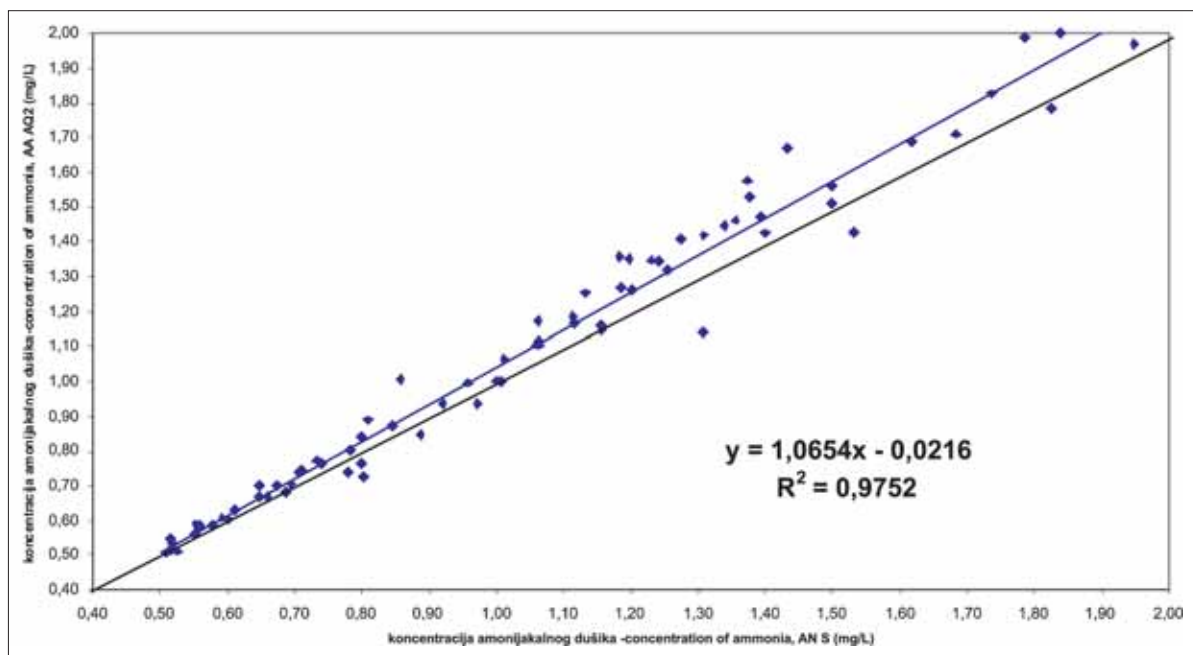
Na ovu činjenicu ukazuju i parametri dobiveni metodom najmanjih kvadrata (tablica 1). Veličina R², koeficijent determinacije za određivanje fosfora iznosi 0,98 (0 ≤ R² ≤ 1) što se može protumačiti time, da više od 98 % rasipanja izlaznih podataka potječe od linearne funkcijske ovisnosti y = ax + b, dok manje od 2 % rezultata otpada na rezidualno tzv. neobjašnjeno rasipanje uzrokovano slučajnom pogreškom (Westgard 2003). Kada se usporede vrijednosti deskriptivne statistike (tablica 1) sviju analiziranih rezultata fosfora dobivenih spektrofotometrijskom metodom (P S) i automatskim analizatorom (AA AQ2) vidljiva je velika podudarnost rezultata. Vrijednosti koeficijenta regresije a (0,9736) i odsječka b (0,0017) dobivene u području ispitivanih koncentracija određivanih uzoraka dvjema različitim metodama, nisu statistički različite od 1, odnosno 0. Koeficijent korelacije (0,99) prema Roemer-Orphalovoj tablici (Vasilj, 2000) govori o potpunoj pozitivnoj korelaciji (r = 0,90 – 1,00).

Na slici 4 prikazani su koeficijent regresije a (1,0654) i odsječak b (-0,0216) te koeficijent determina-



Slika 3. Regresijska analiza usporedbe koncentracija fosfora određenih spektrofotometrijskom metodom, PS i automatskim analizatorom, AA AQ2

Figure 3 Regression analysis of comparison of concentrations determined by spectrophotometric method, PS and automatic analyser, AA AQ2



Slika 4. Regresijska analiza usporedbe koncentracija amonijakalnog dušika određenih spektrofotometrijskom metodom, ANS i automatskim analizatorom, AA AQ2

Figure 4 Regression analysis of comparison of concentrations determined by spectrophotometric method, ANS and automatic analyser, AA AQ2

cije R^2 (0,9752) za određivanje amonijakalnog dušika spektrofotometrijskom metodom (ANS) i automatskim analizatorom (AA AQ2). Jednadžbe linearne regresije omogućile su grafički prikaz pravca, koji prikazuje linearan odnos varijabli x i y u odnosu na idealan slučaj kada su koncentracije određene dvjema metodama iste, odnosno $y = x$. Vrijednost regresijskog koeficijenta a i odsjeka b dobivenih u danom području koncentracija

uzoraka određenih dvjema različitim metodama, nisu statistički različite od 1, odnosno 0 (tablica 1). Korelacijski koeficijent r (0,988) prema Roemer-Orphalovoj tablici (Vasilj, 2000) govori o potpunoj pozitivnoj korelaciji ($r = 0,90 - 1,00$).

S obzirom, da instrumentalne analize daju relativno visoke r vrijednosti, izračunati r te kalibracijska krivulja dovoljni su da se dobije uvid u linearnost. Odnos dviju

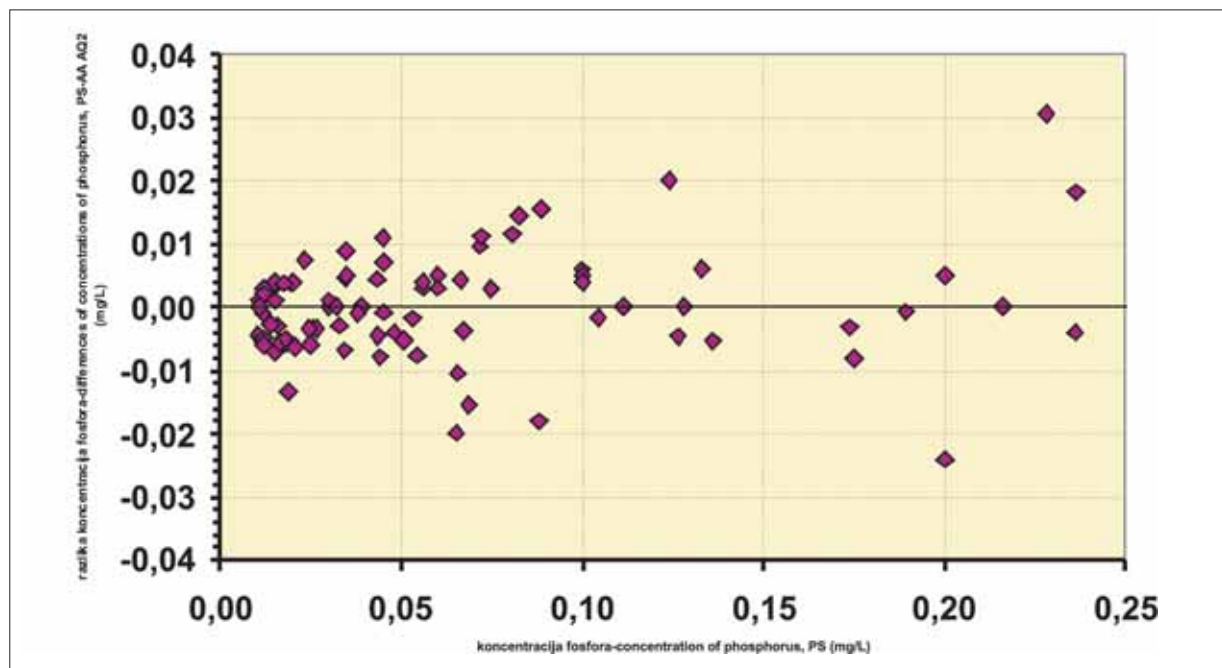
Tablica 1. Deskriptivna statistika za koncentracije i razlike koncentracija fosfora i amonijakalnog dušika određenih spektrofotometrijskim metodama, P S i AN S i automatskom analizatoru, AA AQ2

Table 1 Descriptive statistics for concentrations and differences in concentrations of phosphorus and ammonia determined by spectrophotometric methods PS and AN S and with automatic analyser

Metoda – Method	P S	AA AQ2	razlika-difference P S- AA AQ2	AN S	AA AQ2	razlika-difference AN S-AA AQ2
Mjerna jedinica-Units	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
Ukupan broj razmatranih rezultata <i>Number of results</i>			88			74
Broj negativnih rezultata razlike metoda <i>Number of negative results of method difference</i>			43			61
Broj pozitivnih rezultata razlike metoda <i>Number of positive results of method difference</i>			39			13
Minimum- <i>Minumum</i>	0,010	0,009	-0,024	0,040	0,508	-0,237
Maksimum- <i>Maximum</i>	0,236	0,240	0,031	1,949	1,949	0,165
Srednja vrijednost- <i>Mean</i>	0,063	0,063	0,0	0,677	0,708	-0,046
Mediana- <i>Median</i>	0,044	0,040	0,0	0,526	0,548	-0,032
Standardna devijacija- <i>Standard deviation</i>	0,059	0,058	0,008	0,52	0,56	0,069
Koeficijent pravca a- <i>Slope a</i>		0,974			1,065	
Odsječak b- <i>Intercept b</i>		0,0017			-0,022	
R ²		0,981	0,975			
r		0,990			0,988	
S _a		0,0147			0,020	
S _b		0,0013			0,022	
M _d		0,00			-0,046	

varijabli pratio se i iz razlika među koncentracijama određenim dvjema različitim metodama za svaki uzorak u odnosu na koncentracije određene referentnom, spektrofotometrijskom metodom (slike 5 i 6). Takav grafički prikaz daje bolji uvid u rasprostranjenost vrijednosti oko 0, ali i u jednoznačnost rezultata dobivenih različitim

metodama, što je u skladu s određivanjima ovakvih uzoraka (Tartari i Mosello 1997). Za uzorke u kojima je koncentracija fosfora manja od 0,15 mg L⁻¹ uočene su razlike u području ± 0,02 mg L⁻¹. Grafički prikaz razlika u koncentraciji određivanja amonijakalnog dušika (slika 6) prikazuje vrlo male razlike u području koncen-



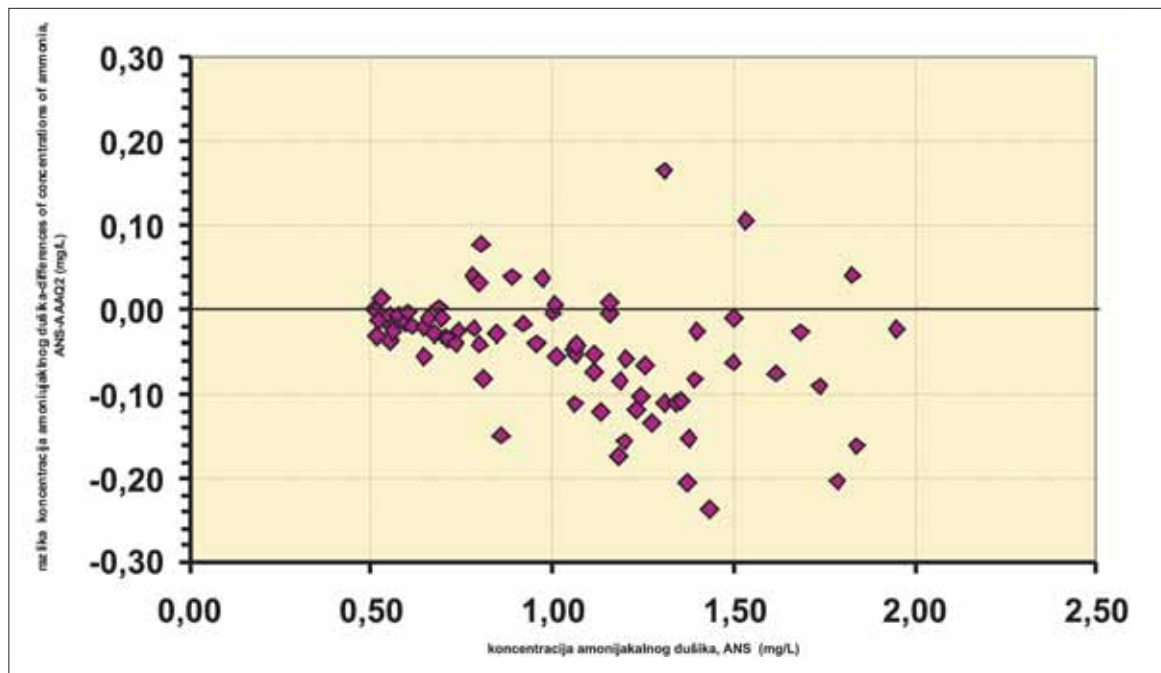
Slika 5. Usporedba razlika koncentracija fosfora određenih spektrofotometrijskom metodom, PS i automatskim analizatorom, AAQ2

Figure 5 Differences in concentrations determined by spectrophotometric method, PS and automatic analyser, AAQ2

tracija 0,50 do 0,80, a one se povećavaju porastom koncentracija amonijakalnog dušika i u većini slučajeva imaju negativnu vrijednost.

Da bi se utvrdilo da li je ovaj odnos posljedica slučaja ili je značajan statistički, testirana je opravdanost

korelacijskog koeficijenta. t-Testom je potvrđeno da rezultati dobiveni dvjema metodama uz razinu pouzdanosti od 99,9 % nisu značajno različiti, jer je intervalom ($a \pm (txS_a)$) od 0,924 do 1,024 obuhvaćena idealna vrijednost 1 za koeficijent regresije a, a idealna vrijednost 0 za



Slika 6. Usporedba razlika koncentracija amonijakalnog dušika određenih spektrofotometrijskom metodom, ANS i automatskim analizatorom, AAAQ2

Figure 6 Differences in concentrations determined by spectrophotometric method, ANS and automatic analyser, AAAQ2

odsječak b obuhvaćena je intervalom ($b \pm (txS_b)$) od -0,003 do 0,006, intervalom (izraz 4) od -0,003 do 0,003 obuhvaćena je idealna vrijednost 0 za M_d (tablica 1). Kada se regresijom utvrdila uzročna posljedična veza dviju varijabli, moguće je preko regresijske jednadžbe računski procijeniti vrijednost y za bilo koju vrijednost x bez mjerenja. (Zar, 1999). Na osnovi jednadžbe $AAQ2 = 0,9736 PS + 0,0017$ može se predvidjeti kolika bi bila koncentracija fosfora u uzorku, kada bi se ona određivala automatskim analizatorom (AAQ2) uz pomoć koncentracije određene spektrometrijskom metodom (PS).

U području određivanja koncentracija amonijakalnog dušika 0,50 – 2,00 mg L⁻¹ statistički obrađene vrijednosti sviju analiziranih rezultata određenih spektrofotometrijskom metodom (ANS) i metodom automatskim analizatorom (AAQ2) pokazuju male razlike u minimumu i standardnoj devijaciji rezultata, a neznatno veće u maksimumu dviju metoda (tablica 1).

Na Slici 4, metodom najmanjih kvadrata na osnovi dobivenih podataka određeni su koeficijent regresije a (1,065) i odsječak b (-0,0216) te koeficijent determinacije (0,9875). Vrijednost regresijskog koeficijenta a različita je od 1, a odsječak b dobiven u danom području koncentracija uzoraka manji je od 0. Korelacijski koeficijent r prema Roemer-Orphalovoj tablici (Vasilj, 2000) govori o potpunoj pozitivnoj korelaciji ($r = 0,70 - 1,00$). t-Testom je potvrđeno, da rezultati (tablica 1) dobiveni dvjema metodama uz razinu pouzdanosti od 99,99 % i određene stupnjeve slobode nisu značajno različiti, jer je intervalom ($a \pm (txS_a)$) od 0,997 do 1,134 obuhvaćena idealna vrijednost 1 za koeficijent regresije a i intervalom ($b \pm (txS_b)$) od -0,097 do 0,054 obuhvaćena idealna vrijednost 0 za odsječak pravca b, te intervalom od -0,073 do 0,018 za M_d razlike aritmetičkih sredina (izraz 4) obuhvaćena je idealna vrijednost 0.

U tablici 2 izračunate su vrijednosti granica detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za fosfor i amonija-

Tablica 2. Vrijednosti LOD i LOQ za ispitivane metode
Table 2 LOD and LOQ values for examine methods

Analiza-Analyses Metoda-Method	Fosfor-Phosphorus		Amonijakalni dušik-Ammonia	
	PS	AAAQ2	ANS	AAAQ2
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2	16	5	13
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5	36	14	52

kalni dušik određen spektrofotometrijskom metodom u usporedbi s automatskim analizatorom (AAAQ2), iz koje je vidljivo da automatski analizator pokazuje veću osjetljivost.

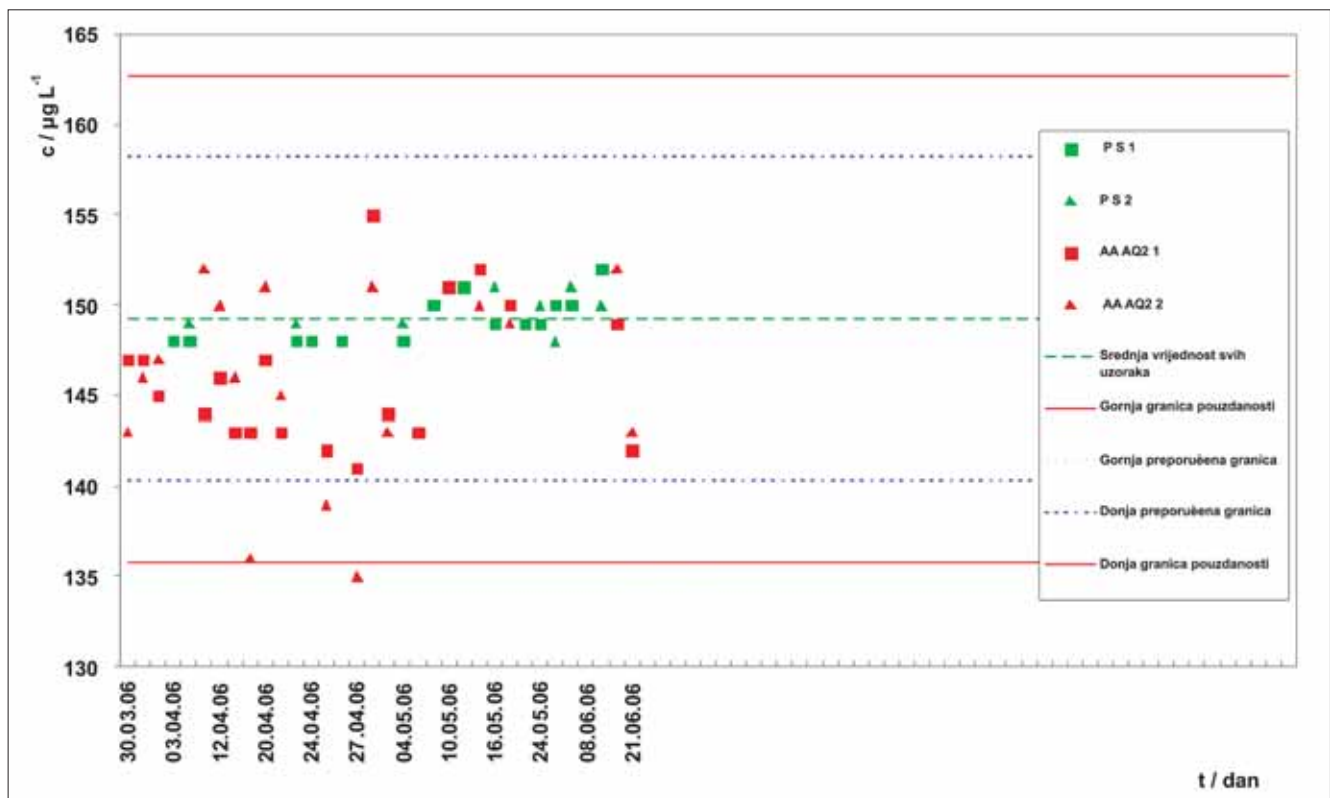
Shewhartova kontrolna karta (ISO 8258, 1998) određivanja koncentracija referentnih materijala važan su dio kontrole kvalitete kemijskih analiza. Glavna zadaća takve karte je provjera ponovljivosti mjerenja svake grupe analiza. Karte su konstruirane na osnovi srednjih vrijednosti i standardnih devijacija rezultata laboratorijskog referentnog materijala (tablica 3). Određene vrijednosti omogućile su procjenu gornjih i donjih

preporučenih granica i granica pouzdanosti. U praksi se koriste $\pm 2S.D.$ i $\pm 3 S.D.$ granice za preporučenu granicu i granicu pouzdanosti. Ako je standardna devijacija pravilno procijenjena, 95 % rezultata mjerenja nalazi se unutar intervala srednje vrijednosti koncentracije $X_m \pm 2S.D.$ i više od 99 % u intervalu $X_m \pm 3S.D.$ Na temelju tablice 3 dobivene su kontrolne karte (slike 7 i 8) iz kojih se može uočiti da se u normalnoj raspodjeli unutar srednje vrijednosti koncentracija $\pm 3S.D.$ nalaze gotovo svi rezultati (99, 72 %) određivanja fosfora i amonijakalnog dušika spektrofotometrijskom metodom (PS i AN S) i metodom na automatskom ana-

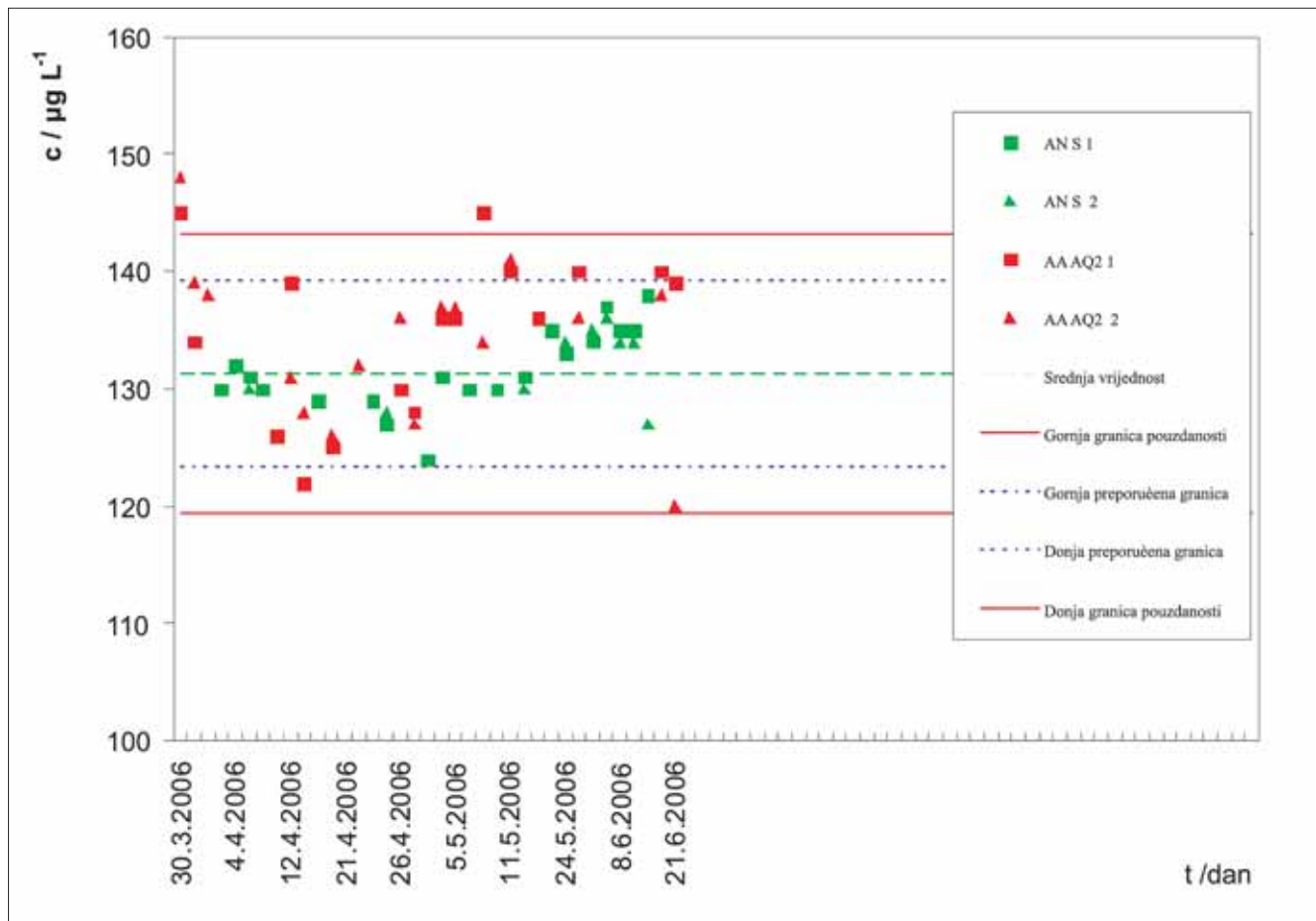
Tablica 3 Statistički parametri dobiveni iz kontrolnih karata određivanja fosfora i amonijakalnog dušika spektrofotometrijskom metodom, PS i AN S i na automatskom analizatoru, AAAQ2

Table 3 Statistic parameters from control charts of determining phosphorus and ammonia by spectrophotometric methods, PS i AN S and with automatic analyser AAAQ2

Analiza-Analyses	Mjerna jedinica	Fosfor	Phosphorus dušik	Amonijakalni	Ammonia
Metoda-Method	Unit	PS	AAAQ2	AN S	AAAQ2
Srednja vrijednost-Mean	$\mu\text{g L}^{-1}$	149,3	145,9	131,3	134,7
Standardna devijacija-Standard deviation	$\mu\text{g L}^{-1}$	1,2	4,6	3,3	6,7
Standardna devijacija laboratorija-Standard deviation of lab	$\mu\text{g L}^{-1}$	4	4	3,9	6,7
Relativan standardna devijacija-Relative standard deviation	%	0,8	3,1	2,5	5,0
Relativan standardna devijacija lab. Relative standard deviation of lab	%	3,0	3,0	3,0	5,0
Minimum-Minimum	$\mu\text{g L}^{-1}$	148	124	120	120
Maksimum-Maximum	$\mu\text{g L}^{-1}$	152	138	148	148
N		28	38	33	33



Slika 7. Kontrolna karta koncentracija fosfora određenih metodom PS i AA AQ2
Figure 7 Control chart of concentrations of phosphorus by methods PS and AA AQ2



Slika 8. Kontrolna karta koncentracija amonijakalnog dušika određenih metodom PS i AA AQ2
 Figure 8 Control chart of concentrations of ammonia by methods AN S and AA AQ2

lizadoru (AA AQ2). Njihova je grupiranost oko sredine takva, da se gotovo 2/3 uzorka nalazi u intervalu srednje vrijednosti koncentracija ± 2 S.D.. Međutim vrlo mala grupa vrijednosti koncentracija fosfora (slika 7), koja pada izvan područja intervala srednje vrijednosti koncentracija ± 3 S.D. Uzorci s vrlo visokim vrijednostima koncentracija amonijakalnog dušika (slika 8),

koje se nalaze izvan intervala srednje vrijednosti ± 3 S.D. zahtijevaju ponavljanje analiza, jer su vrijednosti koncentracija dobivene spektrofotometrijskom metodom (AN S), kao i vrijednosti koncentracija dobivenih automatskim analizatorom (AA AQ2) izvan unaprijed određenih granica.

ZAKLJUČCI – Conclusions

- vrijednosti deskriptivne statistike sviju određenih rezultata fosfora i amonijakalnog dušika dobivenih spektrofotometrijskom metodom i automatskim analizatorom pokazuje veliku podudarnost,
 - grafički prikazi razlika raspršenosti i grafički prikaz usporedbe metoda prvih rezultata određivanja fosfora i amonijakalnog dušika na automatskom analizatoru, u usporedbi s referentnom spektrofotometrijskom metodom pokazuje linearan odnos rezultata, a razlike su pravilno distribuirane oko pravca koji prolazi ishodištem te nema nesukladnih rezultata,
 - određivanja fosfora i amonijakalnog dušika na automatskom analizatoru je linearno u ispitivanom području,
 - t-testom je potvrđeno da razlike rezultata dviju metoda određivanja fosfora i amonijakalnog dušika uz razinu pouzdanosti od 99,99 % nisu značajne,
 - uspoređivanjem kontrolnih karata utvrđena je dobra ponovljivost rezultata određenih novom metodom,
 - utvrđene su granice detekcije i kvantifikacije koje pokazuju veću osjetljivost novih metoda.
- Usporedbom rezultata dviju metoda, spektrofotometrijske i metode određivanja na automatskom analizatoru, vidljive su prednosti nove metode zbog mogućnosti njene automatizacije (mogućnost ispitivanja lakša, veći broj uzoraka i obrade rezultata) što rezultira smanjenjem slučajnih pogrešaka, koje se povećavaju pri manualnom određivanju te mogućnosti paralelnog odre-

đivanju i fosfora i amonijakalnog dušika. Zbog minimalnog manulanog rada i bolje ponovljivosti ispitivanja, primijenjena nova metoda određivanja može se sa sigurnošću smatrati dobrom alternativom već standardnim metodama. Isto tako će se ova metoda sa potpunom si-

gurnošću moći primjenjivati u znanstveno-istraživačkom radu i ICP Forsets programu intenzivnog motrenja, jer je prilagođena upravo specifičnostima uzoraka uzetih iz šumskog ekosustava.

LITERATURA – References

- Andersson, F., 1986: Acidic deposition and effects on the forests of Nordic Europa, *Water, Air& Soil Pollution*, 30, 17–29.
- Freiesleben, N.E., C. Ridder, 2005: Patterns of acid deposition to a Danish spruce forest, *Water, Air& Soil Pollution*, 162, 135–141.
- Grennfelt, P., H. Hultberg, 1986: Effects of nitrogen deposition on the acidification of terrestrial and aquatic ecosystem, *Water, Air& Soil Pollution*, 30, 945–963.
- Holler, F. M., D. Skoog, S. R. Crouch, 2007: Principles of instrumental analyses, 6th edition, Thomson Brooks/Cole, Canad ICP Forests, 2006, Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analyses of the effects of air pollution on forests, Part VI Sampling and Analysis of Deposition ISO 8258:1998, Shewhart control charts.
- Lorenz, M., R. Fischer, 2006: Forest condition in Europa, BFH, Hamburg.
- Mosello, R., M. Amoriello, S. Arisci, 2005: Validation of chemical analyses of atmospheric deposition in forested European sites, *J. Limnology*, 64, 93–102.
- Seletković, I., N. Potočić, 2004: Oštećenost šuma u Hrvatskoj u razdoblju od 1999.do 2003. godine, *Šumarski list*, 137, 3–4.
- Tartari, G., 2002: Metodi analitici per le acque, CNR ISE, Italija, str. 24.
- Vasilj, Đ., 2000: Osnovne biometričke metode, Hrvatsko Agronomsko društvo, Zagreb.
- Vrbeč, B., 2002: Utjecaj padalina na kemijski sastav tekuće faze tala šumske zajednice hrasta lužnjaka i običnog graba u sjeverozapadnoj Hrvatskoj, *Disertacija*, Šumarski fakultet Zagreb, str. 65.
- Westgard, O. J., 2003: Basic method validation, 2nd Edition, Madison, USA.
- Zar, J. H., 1999: Biostatistical analysis, Prentice Hall International, USA, str. 324.

SUMMARY: The ICP Forests and EU Regulation aim to conduct intensive and continous monitoring on forests ecosystem as a means of evaluating the damage caused atmosferic pollution and other factors influencing forest condition. There is no doubt that phosphorus and nitrogen are among the most important elements for the biosphere and its biochemical cycles. Therefore, to get the most correct information about the concentration of different types of these elements is invaluable for understanding the control and creating biochemical cycles. In this work the implementation and validation of new colorimetric method on automatic analyser for determination of phosphorus and ammonia has been investigated. The investigation was performed on samples precipitated water in the forest ecosystem. Until now standard methods, spectrophotometry has been used for determination of phosphorus and ammonia. In the validation procedure following criteria have been investigated: graphical analyses of measured results, accuracy, linearity in the working range, the limit of detection, the limit of quantification and the repeatability. The results showed that the method for determination of phosphorus and ammonia on automatic analyser is linear in the range of investigation (Table 1), while the t-test has showed that differences between these two methods are not significant being 99,99 %. From the control charts it is obvious that the repea-

tability (Figure 7 and 8) of the results obtained with new method is good. The limit of detection and the limit of quantification shows more sensibility (Table 2). Therefore, the new method seem to be a good alternative to the standard methods and can be used in the scientific research of ICP Forests because is adapted to specifics of samples from forest.

Key words: ammonia, automatic analyser, ICP Forests, phosphorus, precipitated water, spectrophotometry, validation method