

Xác định đồng thời COD và Nitrat trong nước thải sinh hoạt bằng phương pháp trắc quang kết hợp với thuật toán hồi quy đa biến

Nguyễn Thị Ngọc Anh^{1*}, Tạ Thị Thảo², Trần Mạnh Đạt³

¹Bộ môn Khoa học Cơ bản, Trường Đại học Phòng cháy Chữa cháy

²Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Trung tâm Môi trường và Sản xuất sạch, Cục Kỹ thuật An toàn và Môi trường Công nghiệp, Bộ Công thương

Ngày nhận bài 31/3/2016, ngày chuyển phản biện 4/4/2016, ngày nhận phản biện 8/4/2016, ngày chấp nhận đăng 24/5/2016

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã khảo sát điều kiện tối ưu để xác định đồng thời kali hydrophthalat (KHPH - chất chuẩn để xác định COD), NO_3^- và thấy rằng, KHPH và NO_3^- hấp thụ ánh sáng cực đại tại 198 và 205 nm tương ứng, do đó không thể xác định riêng rẽ 2 chỉ tiêu trên, để xác định đồng thời phải dựa trên sự liên hệ tuyến tính giữa nồng độ và cường độ vạch phổ từ 190 đến 300 nm, và pH tối ưu để độ hấp thụ quang đạt cực đại là 4,5. Trên cơ sở các kết quả khảo sát điều kiện tối ưu, phương trình đường hồi quy đa biến xác định đồng thời KHPH và NO_3^- đã được xây dựng. Kết quả phân tích 10 mẫu giả tự tạo theo mô hình hồi quy cấu trúc chính PCR cho thấy, có sự trùng lặp giữa số liệu thực nghiệm nhận được và nồng độ cho trước trong phạm vi sai số tương đối cho phép (<15%). Phân tích hàm lượng KHPH và NO_3^- trong 4 mẫu thực bằng phương pháp xác định riêng rẽ và đồng thời đã cho kết quả khác nhau không đáng kể. Từ đó các tác giả đi đến kết luận, phương pháp hồi quy đa biến ứng dụng cho phân tích mẫu thực tế hứa hẹn cho kết quả phù hợp khi so sánh với phương pháp phân tích riêng rẽ, có thể áp dụng để phân tích các mẫu nước thải sinh hoạt thực tế.

Từ khóa: COD, hồi quy đa biến, NO_3^- .

Chỉ số phân loại 1.4

Đặt vấn đề

Nguồn nước thải sinh hoạt ô nhiễm không chỉ ảnh hưởng đến môi trường sống mà còn liên quan trực tiếp đến sức khỏe của con người. Khi hàm lượng các chất hữu cơ trong nước tăng cao, có thể gây ra các bệnh lý hết sức nguy hiểm cho con người như ung thư, ngộ độc... vì chúng thường là những chất độc và khá bền [1]. NO_3^- có nhiều trong nước cũng gây nên hiện tượng phú dưỡng làm cho thực vật, rong tảo phát triển nhanh, đồng thời khi COD, NO_3^- tăng làm giảm lượng oxy hòa tan trong nước và tạo ra mùi khó chịu, từ đó gây ảnh hưởng bất lợi đến sức khỏe của con người [2].

Hiện nay trong việc giám sát nguồn nước thải sinh hoạt để đánh giá sự ô nhiễm, người ta thường dùng các sensor đo phổ trực tiếp sử dụng detector UV có thể ngâm chìm trực tiếp trong nước và giám sát chất lượng nước thải một cách nhanh chóng. Tuy nhiên, do có sự chồng chéo phổ lên nhau của các chất gây ô nhiễm như phổ của các hợp chất hữu cơ và NO_3^- , NO_2^- làm cho tín hiệu thu được bị nhiễu hoặc không chính xác, từ đó làm sai lệch kết quả giám sát. Chẳng hạn, phổ hấp thụ

của NO_3^- và NO_2^- có bước sóng hấp thụ cực đại tương ứng tại 205 và 211 nm, các sensor không thể phân biệt được giữa hai ion này [3]. Qua tham khảo một số tài liệu [4, 5], chúng tôi thấy rằng cần có một phương pháp để tách được đồng thời tín hiệu của các phổ chồng chéo này một cách nhanh chóng. Phương pháp trắc quang phân tử UV-Vis kết hợp với thuật toán hồi quy đa biến là phương pháp đơn giản và nhanh chóng để phân tích các tín hiệu này với độ nhạy và độ chọn lọc cao.

Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu các điều kiện tối ưu để xác định đồng thời hàm lượng COD và NO_3^- có trong nước thải sinh hoạt, tất cả các yếu tố ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp đều được tối ưu hóa và xác định được vùng tuyến tính của COD và NO_3^- . Ma trận chuẩn thực nghiệm được xây dựng bằng cách đo độ hấp thụ quang của 25 mẫu với hàm lượng COD, NO_3^- lần lượt nằm trong khoảng tuyến tính của từng chỉ tiêu tương ứng, trong vùng bước sóng từ 190-300 nm. Sử dụng mô hình bình phương tối thiểu từng phần (PLS), bình phương tối thiểu nghịch đảo (ILS), bình phương tối thiểu thông thường (CLS) và hồi quy

*Tác giả liên hệ: Tel: 0988177986; Email: ngocanh.epu@gmail.com

Simultaneous determination of COD and Nitrate in waste water by spectrophotometric method combined with multivariate regression algorithm

Summary

This study examined the optimal conditions to identify simultaneously two targets COD and NO_3^- , and showed that the best properties that are best include the spectra around 190 to 300 nm, the maximum absorption of COD and NO_3^- respectively at 198 and 205 nm, and the optimal pH for optical absorption at a maximum of 4.5. From these optimal conditions, the construction of multivariate regression equation for simultaneous determination of COD and nitrates was conducted. Based on the analytical results of 10 pseudo samples selected from principal component regression model, there was a similarity between the received experimental data and the given concentration in a range of relative errors (permitted to be below 15%). Therefore, it is concluded that using multivariate regression analysis has a high recovery performance and consistent results as compared to the univariate analysis method, and is possible to apply for the analysis of waste water samples in reality.

Keywords: COD, multivariate regression, NO_3^- .

Classification number 1.4

cầu từ chính (PCR) để xây dựng đường chuẩn đa biến, từ đó xác định hàm lượng các chỉ tiêu có trong nước thải.

Nội dung nghiên cứu

Hóa chất, thiết bị

Máy trắc quang UV-Vis 1650PC - Shimadzu (Nhật Bản), dải bước sóng đo 190-900 nm. Các thiết bị, máy móc khác: máy đo pH, cân phân tích, buret, bộ cất đun hồi lưu, máy rung siêu âm, máy phá mẫu COD... Phần mềm Matlab7.9: chương trình hồi quy đa biến tuyến tính PLS, CLS, ILS và PCR; phần mềm xử lý thống kê Origin7.5 và MINITAB16. Tất cả các hoá chất được sử dụng là hoá chất tinh khiết phân tích. Dung dịch chuẩn gốc NO_3^- 1000 mg/l (tính theo N- NO_3^-) được chuẩn

bị bằng cách: cân chính xác trên cân phân tích 7,2143 ($\pm 0,0001$) g KNO_3 (trước đó đã sấy khô tại nhiệt độ 105°C trong 2 h). Sau đó hòa tan và định mức trong bình định mức dung tích 1000 ml. Dung dịch đệm có pH = 4,5. Chất chuẩn để xác định COD là KHPH. Dung dịch chuẩn KHPH 1000 mg/l để xác định COD: sấy đến khối lượng không đổi KHPH ở nhiệt độ 120°C, cân 850 mg KHPH, hoà tan và định mức trong bình 1000 ml.

Cơ sở của phương pháp xác định đồng thời bằng thuật toán hồi quy đa biến

Trong nghiên cứu này, tín hiệu đo dưới dạng độ hấp thụ của KHPH và NO_3^- trong các hỗn hợp mẫu chuẩn (ma trận tín hiệu phân tích Y) có mối quan hệ tuyến tính với nồng độ của KHPH và NO_3^- cùng tồn tại trong một dung dịch (ma trận nồng độ X) theo phương trình: $Y = kX + C$. Trong đó, k là ma trận hệ số hồi quy của phương trình, C là ma trận sai số của mô hình. Để xác định nồng độ của KHPH và NO_3^- trong cùng một dung dịch, trước hết cần xây dựng được phương trình hồi quy trên. Từ ma trận X và ma trận Y tương ứng, có thể dùng các thuật toán như CLS, ILS, PLS hay PCR để xác định ma trận hệ số k; trên cơ sở đánh giá được ma trận sai số C sẽ lựa chọn được mô hình phù hợp để áp dụng, từ đó khi đã có tín hiệu phân tích của mẫu cụ thể, ta có thể tính được nồng độ của COD và NO_3^- trong dung dịch đó dựa trên phương trình hồi quy đã xây dựng được.

Quy trình phân tích

Pha các dung dịch chuẩn chứa đồng thời KHPH và NO_3^- có nồng độ trong khoảng tuyến tính, ghi độ hấp thụ quang của các dung dịch này trong dải bước sóng 190-300 nm. Cách chuẩn bị mỗi dung dịch như sau: chuẩn bị các bình định mức dung tích 25 ml. Sau đó thêm vào mỗi bình định mức 5 ml dung dịch đệm vanađic có C = 0,01 M và pH = 4,5. Thêm V_1 ml dung dịch chuẩn để xác định COD và V_2 ml dung dịch NO_3^- . Định mức đến vạch mức, sau 10 phút đo độ hấp thụ quang. Đường chuẩn đa biến và các bộ dữ liệu dự đoán được xây dựng trên ma trận độ hấp thụ quang của 25 mẫu chuẩn và 10 mẫu kiểm tra chứa đồng thời KHPH và NO_3^- .

Nhập số liệu ma trận nồng độ các chất và ma trận tín hiệu đo vào phần mềm Matlab, chạy chương trình tính toán ma trận hệ số hồi quy trên phần mềm và sử

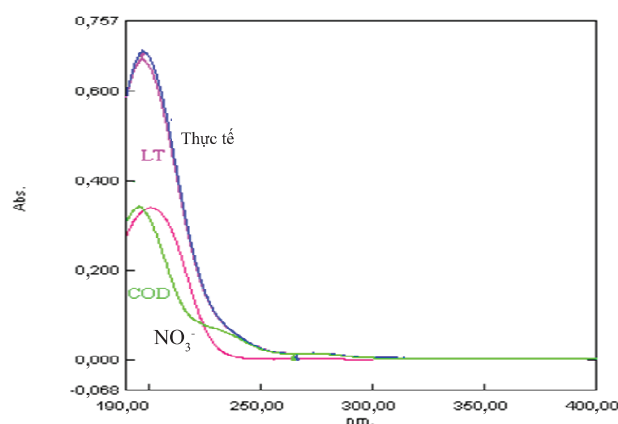
dụng ma trận này để phân tích COD và NO_3^- trong mẫu.

Kết quả và thảo luận

Khảo sát điều kiện tối ưu xác định đồng thời COD và NO_3^-

Phổ hấp thụ của các dung dịch khi phân tích COD và NO_3^- :

KHPh và NO_3^- là những chất tan tốt trong nước và có độ hấp thụ cao trong vùng tử ngoại, vì vậy chúng tôi tiến hành khảo sát phổ hấp thụ của hai chất này.

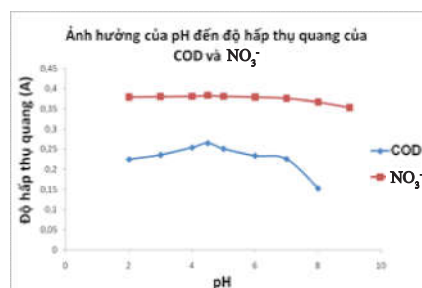


Hình 1: phổ hấp thụ của COD, NO_3^- và phổ hỗn hợp theo lý thuyết và theo thực tế

Kết quả chỉ ra ở hình 1 cho thấy, COD và NO_3^- có độ hấp thụ quang đạt cực đại ở các bước sóng tương ứng là $\lambda_{\text{max}} = 198 \text{ nm}$ và 205 nm . Dựa vào phổ hấp thụ của các chỉ tiêu chúng tôi nhận thấy có sự xen phủ giữa các phổ của COD và NO_3^- với nhau nên không thể xác định riêng rẽ từng chỉ tiêu trong sự có mặt của chỉ tiêu kia. Mặt khác, do phổ hấp thụ của các chỉ tiêu có tính cộng tính nên chúng tôi sử dụng phương pháp hồi quy đa biến tuyến tính để xác định đồng thời COD và NO_3^- , trong dải bước sóng từ 190-300 nm tính cộng đạt tốt nhất, sai số giữa lý thuyết và thực tế nằm trong khoảng sai số cho phép. Vì vậy, chúng tôi chọn dải bước sóng từ 190-300 nm cho các nghiên cứu tiếp theo.

Ảnh hưởng của pH và nồng độ đậm đến độ hấp thụ quang:

Ảnh hưởng của pH đến độ hấp thụ quang của hai chỉ tiêu được nghiên cứu trong khoảng pH từ 2-11; với nồng độ của COD và NO_3^- lần lượt là: COD (KHPh - 3,0 ppm), NO_3^- (0,5 ppm).



Hình 2: ảnh hưởng của pH đến độ hấp thụ quang của COD và NO_3^-

Kết quả ở hình 2 cho thấy, tại pH = 4,5 thì độ hấp thụ quang của cả COD và NO_3^- đều cao nhất và ổn định. Vì vậy, khi xem xét về độ nhạy và độ chọn lọc, dung dịch đệm vạn năng với pH = 4,5 được chọn làm môi trường cho các nghiên cứu tiếp theo.

Nồng độ đậm cũng có ảnh hưởng đáng kể đến độ hấp thụ quang. Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ đậm trong khoảng $[5 \times 10^{-4}, 2 \times 10^{-2}]$, hỗn hợp của COD và NO_3^- có nồng độ lần lượt là: COD 2,0 ppm, NO_3^- 0,5 ppm, dung dịch so sánh là mẫu trắng tương ứng. Kết quả thu được cho thấy, độ hấp thụ quang đạt cực đại tại nồng độ đậm là $8 \times 10^{-3} \text{ M}$. Như vậy, trong các nghiên cứu tiếp theo, nồng độ đậm được chọn là $8 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp xác định đồng thời COD và NO_3^-

Xây dựng phương trình đường hồi quy đa biến xác định đồng thời COD và NO_3^- :

Phương pháp hồi quy đa biến tuyến tính CLS, ILS, PLS và PCR xác định đồng thời 2 chỉ tiêu COD và NO_3^- dựa trên thuật toán bình phương tối thiểu sử dụng phổ toàn phần. Mô hình hồi quy dựa trên ma trận nồng độ gồm 25 dung dịch chuẩn chứa đồng thời hai cấu tử KHPh và NO_3^- với nồng độ ở bảng 1 trên cơ sở khoảng tuyến tính của từng cấu tử đã khảo sát dưới các điều kiện tối ưu.

Bảng 1: ma trận nồng độ hai cấu tử COD, NO_3^- trong hỗn hợp

Mẫu	COD (ppm)	NO_3^- -N (ppm)	Mẫu	COD (ppm)	NO_3^- -N (ppm)
1	0,5	0,2	14	1,5	0,2
2	0,8	0,5	15	3	0,6
3	0,5	0,5	16	4,5	0,3
4	1	0,6	17	3,5	0,4
5	2	1	18	5,5	0,25
6	4	0,5	19	6,5	0,45
7	5	0,8	20	3,5	0,75
8	6	0,4	21	1,5	0,35
9	5	0,7	22	2,8	0,85
10	3	0,5	23	6	1
11	2	0,8	24	2,5	0,6
12	4	0,9	25	3,5	0,2
13	2,5	1			

Mẫu trắng được chuẩn bị như trên nhưng không có các chỉ tiêu khảo sát, thực hiện quy trình phân tích như phần thực nghiệm. Lưu lại kết quả dưới dạng ma trận (25x90) và chuyển số liệu vào phần mềm Matlab để tính toán.

Đánh giá tính phù hợp của phương trình hồi quy đa biến:

Chuẩn bị 10 bình định mức dung tích 25 ml, pha các dung dịch hỗn hợp với nồng độ biết trước để kiểm chứng bao gồm 10 dung dịch với hàm lượng khác nhau, tiến hành quy trình phân tích. Lưu số liệu thu được dưới dạng ma trận và chuyển vào phần mềm Matlab để tính toán.

Thực hiện tính toán trên phần mềm Matlab với 4 phương pháp: bình phương tối thiểu thông thường (CLS), bình phương tối thiểu nghịch đảo (ILS), bình phương tối thiểu từng phần (PLS), hồi quy cấu trúc chính (PCR). Các kết quả nồng độ COD và NO_3^- trong 10 mẫu tự tạo và sai số tương đối của mỗi phương pháp thu được ở bảng 2.

Bảng 2: sai số tương đối của các phương pháp: CLS, ILS, PLS và PCR trên 10 mẫu giả tự tạo

Mẫu	Nồng độ COD	Sai số tương đối (%)				Nồng độ NO_3^-	Sai số tương đối (%)			
		CLS	ILS	PLS	PCR		CLS	ILS	PLS	PCR
1	1	-57,91	-38,57	-2,02	-10,01	0,5	9,67	55,34	-22,01	-3,19
2	2	-20,28	-43,25	-25,01	-12,51	0,8	-9,93	-20,27	2,50	-5,23
3	4	0,81	-15,83	12,50	12,85	0,5	-6,22	-2,34	2,00	-10,27
4	5	-7,47	-38,41	-8,02	12,47	0,9	10,73	-34,87	3,33	1,68
5	4	1,22	78,91	-15,01	10,75	0,3	33,98	29,29	16,67	3,91
6	6	-1,98	-3,81	-5,03	-2,17	1,0	-3,63	-0,84	-50,01	0,09
7	3	-2,92	-31,03	-3,33	10,67	0,4	-0,58	19,65	5,02	-5,33
8	2,5	-7,5	-10,26	-4,01	-15,5	0,6	-10,0	-6,95	-3,33	-7,90
9	4,5	-4,93	64,46	4,44	-1,50	0,7	-7,68	-5,51	2,86	-5,77
10	3,5	3,42	7,52	-5,71	13,71	0,2	16,52	12,64	10,01	-7,24

Từ kết quả sai số tương đối tính được ở bảng 2 cho thấy, phương pháp hồi quy đa biến PCR cho kết quả khá tốt: sai số tương đối (%) dao động từ 0,09÷15%, nhỏ hơn sai số cho phép đối với cấp hàm lượng ppm (15%), nồng độ COD và NO_3^- tính được sai khác không đáng kể so với nồng độ đã pha (sai số tương đối tính theo phương pháp này đều thuộc khoảng sai số cho phép). Trong khi đó, các phương pháp còn lại đều mắc sai số lớn: CLS có sai số 57,91%; 20,28%; 16,52% hay 33,98% đều lớn hơn 15%; tương tự ILS có sai số 38,57%, 43,25%, 78,91% hay 55,34%... và PLS có sai số 25,01%, 22,01%, 16,67%, hay 50,01% đều lớn hơn 15%. Mô hình CLS, ILS và PLS có sai số

lớn ở một số mẫu có thể giải thích như sau: sai số của mô hình PLS là do mô hình trung gian tìm được chưa phù hợp với hệ 2 cấu tử. Sai số của phương pháp ILS là do chưa chọn được các điểm tối ưu (các bước sóng tối ưu mà tại đó loại trừ được các yếu tố cản trở đến phép đo phổ hỗn hợp). Sai số của CLS là do chưa loại bỏ được hoàn toàn dải phổ không tuân theo định luật Lambert-Beer và phổ đóng góp vào đường chuẩn của những chất gây ảnh hưởng. Do đó, không thể áp dụng các phương pháp này.

Như vậy, có thể áp dụng phương pháp PCR để xác định đồng thời COD và NO_3^- trong cùng hỗn hợp mà không cần tách loại chúng ra khỏi nhau, đây là phương pháp phù hợp để phân tích các đối tượng môi trường, đặc biệt giám sát nước thải.

Kết quả phân tích mẫu thực

Kết quả thu được sau khi tiến hành xác định hàm lượng của COD và NO_3^- trong các mẫu thực theo hai phương pháp riêng rẽ và đồng thời như trong bảng 3.

Bảng 3: thông tin về các mẫu thực phân tích

STT	Tên mẫu	Địa chỉ	Thời gian lấy mẫu
NT1	Nước thải sinh hoạt ở ao Phú - Chùa Láng Diện tích ao: 3600 m ²	Ngõ 1194 - Phố Chùa Láng Quận Đống Đa - Hà Nội	8h00-10h00 ngày 29/4/2012
NT2	Nước thải sinh hoạt ở khu tập trung nước thải Diện tích: 1600 m ²	Xã Lý Nhân - Huyện Vĩnh Tường Tỉnh Vĩnh Phúc	7h00-9h00 ngày 4/5/2012
NT3	Nước thải sinh hoạt ở hồ Triều Khúc Diện tích: 1700 m ²	Ngõ Triều Khúc - Thanh Xuân - Hà Nội	8h00-10h00 ngày 6/5/2012
NT4	Nước thải sinh hoạt ở sông Kim Ngưu	Đường Kim Ngưu - Quận Hoàng Mai - Hà Nội	8h00-10h00 ngày 9/5/2012

Kết quả thu được sau khi tiến hành xác định hàm lượng của COD và NO_3^- trong các mẫu thực tế theo hai phương pháp riêng rẽ và đồng thời như trong bảng 4.

Bảng 4: hàm lượng COD và NO_3^- trong các mẫu nước thải (đã tính đến hệ số pha loãng) theo hai phương pháp

Mẫu	Phương pháp xác định riêng rẽ (mg/l)		Phương pháp xác định đồng thời (mg/l)	
	COD	NO_3^-	COD	NO_3^-
1	330,4 ± 7,1 RSD=2,0%	44,3 ± 0,8 RSD=1,7%	335,6 ± 5,2 RSD=0,6%	50,2 ± 0,8 RSD=0,6%
2	309,6 ± 5,5 RSD=1,7%	35,4 ± 0,9 RSD=2,4%	325,2 ± 6,5 RSD=0,8%	37,4 ± 1,2 RSD=1,3%
3	350,7 ± 4,8 RSD=1,3%	32,5 ± 0,8 RSD=2,5%	370,7 ± 3,5 RSD=0,4%	35,6 ± 1,0 RSD=1,1%
4	420,6 ± 5,2 RSD=1,2%	50,8 ± 0,8 RSD=1,4%	450,4 ± 5,8 RSD=0,5%	52,81 ± 0,9 RSD=0,7%

So sánh kết quả thu được từ các mẫu 1, 2, 3 và 4 theo hai phương pháp đơn biến và đa biến chúng tôi nhận thấy: đối với cả 4 mẫu hàm lượng COD và NO_3^- xác định được theo hai phương pháp sai lệch không đáng kể, chứng tỏ không có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các kết quả này. Từ đây có thể kết luận rằng, hoàn toàn có thể áp dụng phương pháp hồi quy đa biến vào phân tích định lượng hàm lượng hai chỉ tiêu chứa trong các mẫu nước thải sinh hoạt mà không cần khảo sát sơ bộ hàm lượng chỉ tiêu có chứa trong mẫu phân tích. Kết quả này cũng phù hợp so với các tài liệu tham khảo [6], phương pháp PCR là phương pháp phù hợp để phân tích các đối tượng môi trường, đặc biệt là giám sát nước thải.

Kết luận

Bài báo đã ứng dụng phương pháp trắc quang kết hợp với thuật toán hồi quy đa biến để xác định đồng thời COD và NO_3^- trong nước thải sinh hoạt. Đã tiến hành khảo sát điều kiện tối ưu xác định đồng thời hai chỉ tiêu. Dựa trên kết quả phân tích 10 mẫu giả lựa chọn được mô hình hồi quy cấu tử chính PCR phù hợp để áp dụng vào phân tích các mẫu thực tế với sai số tương đối khi phân tích mẫu tự tạo nhỏ hơn 15%, thỏa mãn sai số cho phép. Xác định giá trị sử dụng của phương pháp hồi quy đa biến để ứng dụng phân tích mẫu thực cho thấy, phương pháp này cho kết quả phù hợp khi so sánh với phương pháp phân tích đơn biến nên hoàn toàn có thể áp dụng phân tích các mẫu nước thải sinh hoạt thực tế.

Tài liệu tham khảo

- [1] Ana Maria da Silva Paulo, Doutor Eugénio Manuel de Faria Campos Ferreira, Doutora Ana Maria Antunes Dias (2008), “Monitoring of Biological Wastewater Treatment Processes using Indirect Spectroscopic Techniques”, *Master of Environmental Management*, pp.11-17.
- [2] Z.M. Fu, F.L. Yang, F.L. Zhou, Y. Xue (2009), “Control of COD/N ratio for nutrient removal in a modified membrane bioreactor (MBR) treating high strength wastewater”, *Biores Technol*, **100**(1), pp.136-141.
- [3] Tchobanoglous, G. Burton, H.D. Stensel (2003), “Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse”, 4th edn. McGraw - Hill, New York, USA.
- [4] You Peng Chen, Shao Yang Liu, Fang Fang, Shu Hong Li, Gang Liu, Yang Chao Tian, Ying Xiong, Han Qing Yu (2008), “Simultaneous Determination of Nitrate and Dissolved Oxygen under Neutral Conditions Using a Novel Silver-Deposited Gold Microelectrode”, *Environ. Sci. Technol*, **42**(22), pp.8465-8470.
- [5] Zing Chih Chiu, Ming Shium Chung (2003), “Determination of optimal COD/nitrate ratio for biological denitrification”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **51**(1), pp.43-49.
- [6] Mikael Karlsson, Bo Karlberg, J.O. Ralf Olsson (1995), “Determination of nitrate in municipal waste water by UV spectroscopy”, *Analytica Chimica Acta*, **312**, p.107.