

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Keemia instituut
Kolloid- ja keskkonnakeemia õppetool

Helena Hallasoo

**Vee korduvkasutusega kalakasvanduse biofiltri
nitrifitseeriva biokile aktiivsuse uuringud**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja: PhD Taavo Tenno

Kaitsmisele lubatud

Juhendaja

allikiri, kuupäev

Tartu 2016

Sisukord

Sissejuhatus.....	4
1. Kirjanduse ülevaade.....	5
1.1. Vee korduvkasutusega kalakasvatuse süsteem.....	5
1.2. Biofilter	6
1.3. Nitrifikatsioon.....	7
1.4. Keskkonnategurite mõju nitrifikatsioonile.....	8
1.5. Mikrobioloogiline kooslus biofiltris	13
1.6. Biokile	14
1.7. RAS-is kasutatavad lisapuhastusmeetodid ja -seadmed	14
1.7.1. Ultraviolettkiirgus	15
1.7.2. Osoon	15
1.7.3. Formaldehüüd ja peräädikhape	16
1.8. Ettevaatusmeetmed RAS-i toimimiseks.....	16
1.9. RAS-i areng Eestis ja mujal maailmas.....	17
2. Materjalid ja meetodika	19
2.1. Katseseadmete kirjeldus.....	19
2.2. Uuritava kalafarmi biofiltrite kirjeldus	20
2.3. Kalafarmi biofiltrite laborianalüüsi kirjeldus	21
2.4. Meetodikad.....	21
3. Tulemused ja arutelu.....	23
3.1. Katseseadmed A, B, C	23
3.1.1. Nitritifitseeriva biokile teke.....	23
3.1.2. Stressitingimused.....	25
3.2. Nitrifitseeriva biokile teke kalakasvatuse biofiltrites	28
Kokkuvõte.....	32
Kasutatud allikad.....	33

Summary.....	36
Tänuõnad.....	37
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks.....	39

Sissejuhatus

Kalakasvatuse esmased ilmingud on leitavad Hiina hõimkondadest, millede kõrgaeg oli 1000 aastat eKr [1]. Tänapäeval tegeletakse kalakasvatusega paljudes kohtades maailmas. Üha suureneva rahvaarvu ja piiratud ressursside tõttu on inimesed sunnitud leidma lahendusi, kuidas tootmisest võimalikult väikeste kulutustega teenida võimalikult suurt tulu. Vee korduvkasutusega kalakasvatussüsteem annab võimaluse veeressurssi mõistlikult kasutada ja ühtlasi majandada väiksemal territooriumil.

Vee korduvkasutusega kalakasvatussüsteemi olulisemaks osaks võib pidada biofiltrit. Biofilter puhastab kalade väljaheidetest ja söömata jäänud toidust reostunud vee ja võimaldab seda uuesti kasutada. Biofilter toimib nitrifitseerivate bakterite abil [2]. Bakterite poolt läbi viidud nitrifikatsioon on kaheosaline protsess, milles toimub ammooniumi oksüdatsioon nitritiks ja nitriti oksüdeerimine nitraadiks [3]. Kalade jaoks on toksilised ammooniumlämmastik, nitritlämmastik ja nitraatlämmastik. Biofiltri käivitamine on pikk protsess, kuna nitrifitseerivad kemotroofsed bakterid on aeglase kasvuga.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on:

- uurida, kuidas nitritlämmastiku lisamine biofiltri käivitumisel mõjutab nitriti oksüdeerivate bakterite tööd;
- uurida, kas tekib erinevus biofiltri käivitumisel, kui on kasutusel uued biokilekandjad või varasemalt kasutuses olnud kandjad. Hüpoteesina areneb varasemalt kasutatud kandjatel kiiremini nitrifitseeriv biomass;
- selgitada, kuidas võib biofilter toimida erinevates stressitingimustes, mis on kalakasvatusele omased;
- iseloomustada kalafarmi biofiltrite käivitumisprotsessi.

Mõistmaks biofiltri toimimist ja käivitumist, viidi esmajärgus läbi katse laboritingimustes, kus seati üles kolm paralleelset biofiltrit jälgendavat katseseadeldist. Töö teises osas vaadeldakse kalakasvatuse biofiltri käivitustsüklit ja erinevate tegurite mõju selle tööle.

Teema on aktuaalne, kuna vee korduvkasutusega kalakasvatussüsteeme ehitatakse aina juurde, ja mida enam on teada nitrifitseeriva biokile tekkest biofiltris, seda efektiivsemalt saab viimaseid tööle panna. Antud bakalaureusetöö tulemusi saab kasutada kalakasvatuse biofiltrite arendamisel.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Vee korduvkasutusega kalakasvatuse süsteem

Viimastel aastakümnetel on toimunud kiire nõudluse kasv kalade ja nende kasvatamise suunal. Vee korduvkasutusega kalakasvatuse süsteem (edaspidi kasutatud ka lühendit RAS, mis tuleb ingliskeelsest väljendist *recirculating aquaculture system*) on vajalik, et leevendada kalapüügi mõju kalavarudele meres. Selle eeliseks võrreldes muude kalakasvatussüsteemidega on, et kala saab kasvatada nõudlusele lähemas piirkonnas, kus maa ja vesi on kallid ressursid. Selleks, et kalakasvatus oleks efektiivne, peab kalakasvatussüsteem töötama ressursside mõttes kokkuhoidlikult ja lisaks olema ka majanduslikult kasulik ning keskkonnale ohutu. RAS võimaldab kalade kasvatamise puhul vajaminevat vett uuesti kasutada nii, et väheneb vajamineva vee hulk ja ka süsteemist väljutatavate jäätmete kogus [4]. RAS-iga tootmine toimub suhteliselt väikesel alal. Näiteks on võimalik saada umbes 45 tonni kala 5000 m² suurusel hoonest. Sama palju suudab traditsiooniline kalatiik toota 80 000 m² alal. RAS võimaldab olla ka paindlikuma saagikoristusajaga, muutes tootlikust ja kasumlikkust vastavalt turu vajadustele [5].

RAS-i puudusteks võrreldes avatud tiikidega on see, et tegemist on kalli süsteemiga, mis sisaldab veemahuteid, biofiltrit ja vajab ehitamist. Seejuures peab olema stabiilselt tagatud vee pumpamine, aereerimine, küte, valgustus ja kvalifitseeritud järelevalve. Hoidmaks ära kalade suremust, peab olema suutlikus kiiresti reageerida. RAS-i väikesel ruumalal kasvavaid kalu võivad mõjutada haigused, parasiidid, saasteained, omavaheline konkurents, stress ja ilmnevad hooajalised ebasobilikud kasvutingimused [5].

RAS suudab tõhusalt töötada nii mageveeliste, kui ka mereliste kalaliikide kasvatamise puhul. Süsteem töötab hästi siis, kui ta suudab puhastada vett kalade väljaheidetest ja seejuures hoida vee kulu minimaalsena. Veepuhastus RAS-is toimub mitmes etapis, mida võib jagada bioloogiliseks ja mehaaniliseks filtreerimiseks [4]. Tahked osakesed eemaldatakse mehhaanilise filtreerimise teel. Bioloogiline filtreerimine toimub biofiltris, kus vabanetakse kaladele toksilistest ühenditest. RAS-is ringlevat vett degaseeritakse ja sageli kasutatakse vee puhastamiseks osooni ja ultraviolettkiirgust (UV-d) [3].

Kaladele piisava hapniku tagamiseks, peab toimuma pidev vee aereerimine. Vahetuva vee hulk on oluline, tagamaks kaladele hea kvaliteediga vesi. RAS on sageli kasutatud juhul, kui ei ole võimalik tagada piisavat veevahetust, vabanemaks kaladele toksilistest väljaheidetest. Selleks,

et RAS ei oleks liialt kulukas, tuleb leida võimalikult soodsad ja efektiivsed süsteemi komponendid. Tundlikumade kalaliikide kasvatamisel on vaja täiendavaid funktsioone, mis suudaksid eemaldada peeneid tahkeid osakesi ja lahustunud orgaanilist ainet [6].

1.2. Biofilter

Biofilter kujutab endast suurt mahutit, mis on täidetud biokilekandjatega (joonis 1), andmaks nitrifitseerivatele bakteritele võimalikult suurt kasvupindala. Sealsete bakterite kasvamiseks ja protsesside korralikuks käivitumiseks võib aega minna üks kuni kolm kuud. Biofiltri mahuti võib-olla plastikust, metallist, puidust, betoonist, klaasist või mõnest muust mittetoksilisest materjalist. Biofiltri suurus määrab ära, kui suures mahus kalu saab kasvatada. Biofiltriga ühendatud kalakasvatustiigid võivad olla erineva suuruse ja kujuga. Ümmargustes ja ovaalsetes tiikides on kergem panna vett tsirkuleerima nii, et tiik puhastuks kergemini. Kalakasvatustiigid peavad olema ehitatud kaladele mittetoksilistest materjalidest ja neil peaks sees olema sile pind, et kalad ei saaks marrastusi ning sellest omakorda infektsioone [5]. Biofiltrit võidakse kasutada ka läbivoolulises süsteemis vee kvaliteedi parandamiseks.



Joonis 1. Biokilekandjad (erakogu)

Pind, millel bakterid saavad kasvada, võib olla mistahes bakteritele võimalikult suurt kasvuala tagav pind. Bakterite kasvatamiseks biofiltris on kasutatud ka selliseid materjale nagu austrite kesti, kruusa, nailonvõrku, plastikust pallikesi, lainelisest klaaskiust paneele ja käsna. Praegusel ajal on kasutusel enamjaolt plastikust silindrikujulised biokilekandjad [7].

Biofiltri töötamist saab muuta efektiivsemaks, kui muuta vee temperatuuri mõne kraadi võrra. Väiksema veekoguse kasutamine muudab protsessid kiiremini toimivamaks, kuna on kergem temperatuuri mõjutada ja saab lisada väiksemat kogust toitaineid, millega biofilter suudab paremini toime tulla [2]. 3:1 kalatiigi pinna ja biofiltri suuruse suhe on tavaliselt piisav tagamaks vee puhastamise biofiltriga. Biofiltri suuruse määramisel tuleb arvestada filtri pinna suurusega, kalade kogusega ja veevoolu hulgaga, kuna antud tegurid mõjutavad biofiltri tööefektiivsust [7].

1.3. Nitrifikatsioon

Lämmastik on asendamatu toitaineline aine kõikidele elusorganismidele ja teda leidub näiteks valkudes ja nukleiinhapetes. Lämmastik on kalade väljaheidete põhiline komponent. Lämmastikujäätmeid eritavad kalad ja neid sisaldavad ka surnud orgaanika nagu surevad organismid, söömata jäänud toit ja fekaalid. Lämmastikuühendite lagunemist RAS-is on väga oluline jälgida, kuna ammooniumlämmastik ja nitritlämmastik on kaladele toksilised. Ammooniumlämmastikust vabanemine toimub biofiltris kaheosalise protsessina, mida nimetatakse nitrifikatsiooniks. Esmalt toimub ammooniumi oksüdatsioon nitritiks (nitritatsioon) ja seejärel nitriti oksüdeerimine nitraadiks (valemid 1-2). Tavaliselt suudetakse eraldada 5-10% lämmastikust. Umbes 3% päevasest kalade toidust jõuab ammooniumlämmastikuna vette [3].



Ammooniumlämmastiku ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) mõju kaladele on väike, kui pH on 7 ja temperatuur 20 °C. Kui pH on 9, siis on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ letaalne enamikule kalaliikidele. Ammooniumlämmastikul on selge mõju kalade kasvukiirusele. Soojavee kalad on $\text{NH}_4^+\text{-N}$ suhtes sallivamad, kui külmavee kalad, ning magevee kalad taluvad samuti rohkem kui merevee kalad [3].

Nitritlämmastiku ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) toksiline mõju seisneb vere hemoglobiini methemoglobiiniks muutmises. Sisenedes vereringesse, oksüdeerub nitrit rauaga hemoglobiinis ja tekib pruuni värvusega veri, mis ei suuda siduda hapnikku. [3]. Nitritlämmastiku mõju kaladele on liigiti erinev. Näiteks vikerforelli (*Oncorhynchus mykiss*) füsioloogilisele seisundile avaldab mõju juba madal nitritlämmastiku väärtus (0,01-0.2 mg/l $\text{NO}_2^-\text{-N}$). Vikerforellile surma põhjustav

väärtus jääb 1 ja 3 mg/l NO₂⁻-N vahemikku [8]. Vereringesse sisenev nitritlämmastiku kogus on sõltuvuses kloriidide sisaldusega organismis. Kloriidide tase võib vähendada nitritlämmastiku toksilisust. Kloriidide sisaldust suurendatakse tavalise soola (NaCl) või kaltsiumkloriidi (CaCl₂) lisamisega. Vähendamaks kalade stressi RAS-is, hoitakse sageli kloriidide taset 200 mg/l juures [3].

Nitraatlämmastik (NO₃⁻ -N) on nitrifikatsiooni lõpp-produkt ning on kõige vähem toksiline lämmastikuühend. Selle kontsentratsiooni hoitakse stabiilsel tasemel RAS-is toimuva ettenähtud väikese veevahetusega [3].

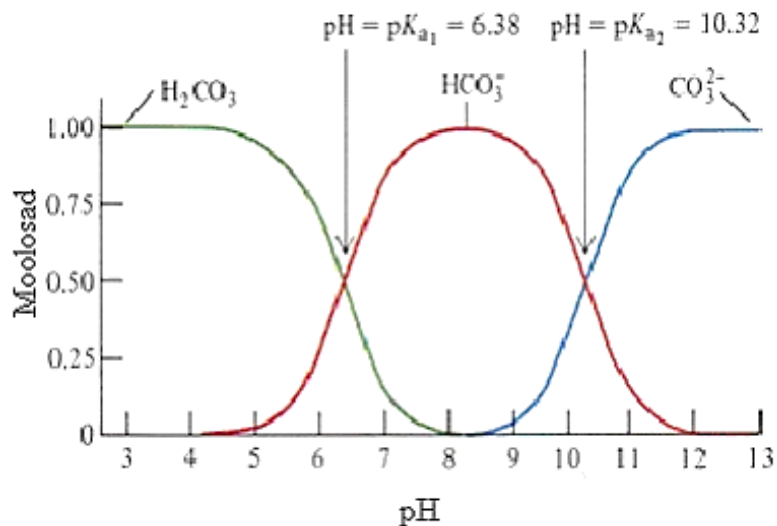
1.4. Keskkonnategurite mõju nitrifikatsioonile

Biofiltri tööd mõjutavad paljud erinevad komponendid, milleks võivad olla näiteks õhu juurdepääs, heljum, vahu fraktsioonid, toksilised ühendid ja muu sarnane [9]. Otseselt mõjutavad nitrifikatsiooni vee aluselisisus, pH (negatiivne logaritm lahuse vesinikioonide kontsentratsioonist), hapnik, temperatuur, substraadi olemasolu, soolsus ja valgus.

Vee aluselisuse all mõistetakse vee tundlikkust hapestumisele. See kirjeldab puhverduisvõimet happe lisamisel ehk vee suutlikust hoida pH ühes punktis ka vesinikioonide (H⁺-ioonide) lisamisel. Kui aluselisisus on null, siis pH alaneb iga kord, kui lisada H⁺-ioone. Kui aluselisisus on nullist suurem, siis pH alandamine ei ole proportsionaalne vesinikioonide lisamisega, kuid aluselisisus siiski väheneb. Karbonaatsete ühendite, nagu süsihappe (H₂CO₃), vesinikkarbonaadi (HCO₃⁻) ja karbonaadi (CO₃²⁻), vaheline tasakaal määrab ära vee aluselisuse (valem 3) [10].



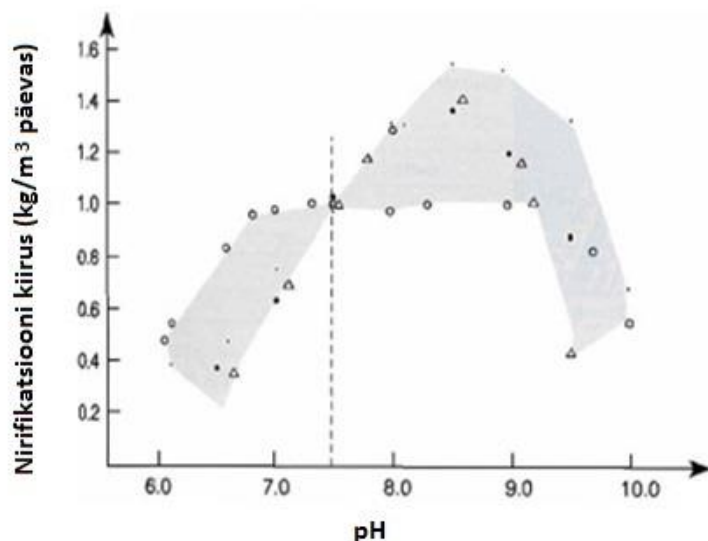
Kõrgete pH väärtuste juures moodustub aluselisisus karbonaadist. Keskmiste pH väärtuste juures moodustub aluselisisus põhiliselt vesinikkarbonaadist. Madalate pH väärtuste juures on aluselisisus moodustunud peamiselt süsihapest (joonis 2). Alati on lahuses mõned vesinikkarbonaadid ja karbonaadid, olenemata pH-st, ning vees on alati olemas vaba vesinikku, mis omavahel reageerides tekitavad süsihappe. Enamik reoveest on tavaliselt pH vahemikus 5-8 ja leelisisus on moodustunud vesinikkarbonaadi ühenditest. Vesinikkarbonaat tuleb vette orgaanilise aine lagunemise tulemusena ja süsihappegaasi lahustumisel vees [10].



Joonis 2. Karbonaatsete ühendite jaotusdiagramm vees [11]

Aurumisega kaasneb vajadus lisada vett ja seejuures peab jälgima, et vee pH jääks stabiilseks, ning vee lisamine ei tohiks avaldada mõju nitrifikatsioonile. Vähese aluselise puhul tuleb lisada RAS-ile karbonaatset ühendit, näiteks naatriumvesinikkarbonaati (NaHCO_3). Vähese aluselise korral lendub süsihappegaas (CO_2) ja mõju pH-le ning nitrifikatsioonile on suur. Kerge aluselise (10 mg/l CaCO_3) annab RAS-ile stabiilsuse. CO_2 lendumine on kõrgeim madalaima aluselise korral, kuigi erinevused ei ole väga suured [12].

Nitrifikatsiooniprotsess sõltub pH-st ja saavutab optimumi pH vahemikus 8-9 (joonis 3). Kui pH on vahemikus 6,45 kuni 8,95, toimub täielik nitrifikatsioon. Kui pH on alla 6,45 või üle 8,95, siis on nii ammooniumi kui ka nitritit oksüdeerivate bakterite elutegevus pärsitud. Vesinikioonide vabanemine nitrifikatsiooniprotsessi käigus põhjustab pH langust. Seetõttu on biokiles olev pH madalam, kui biokilet ümbritseva vee pH [10].

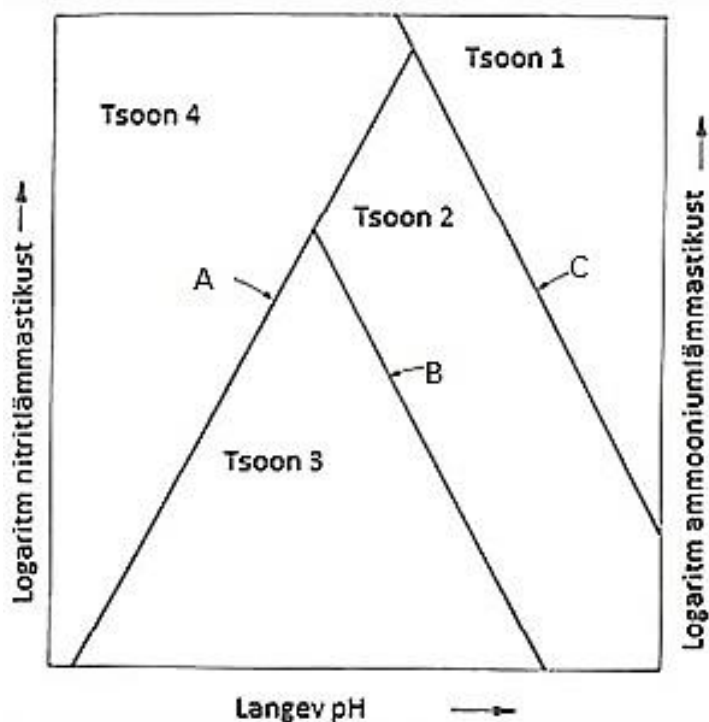


Joonis 3. Nitrifikatsiooni kiiruse sõltuvus pH-st [10]

Lämmastikushape ja ammoniaagi kontsentratsioonid inhibeerivad nitrifikatsiooniprotsessi. Nii ammoniaak, lämmastikushape, kui ka ammoonium, võivad olla nitritit oksüdeerivatele bakteritele toksilised. Ammoonium on toksilisem nitritit oksüdeerivatele bakteritele, kui ammooniumit oksüdeerivatele bakteritele [10].

Järgnev skeem (joonis 4) koosneb neljast tsoonist. Tsoonis 1 pärssib ammoniaak nii ammooniumi kui ka nitritit oksüdeerivaid baktereid. Tsoonis 2 pärssib ammoniaak nitritit oksüdeerivaid baktereid. Kolmandas tsoonis nitrifikatsiooni pärssimist ei toimu. Neljandas tsoonis pärssib lämmastikushape nitritit oksüdeerivaid baktereid. Jooned A, B ja C ei ole nii ranged, nagu skeemil paistab. Lämmastikuhape mõju nitrititseerivatele bakteritele algab kontsentratsioonidest 0,22-2,5 mg/l (joon A). Ammoniaak pärssib nitritit oksüdeerivaid baktereid alates 0,1-1,0 mg/l (joon B) ja ammoniaak pärssib ammooniumi oksüdeerivaid baktereid alates 10-150 mg/l (joon C) [10].

Ammoniaak ja lämmastikushape võivad olla toksilised nitrifikatsiooniprotsessile, kuid ka nitritlämmastiku kõrge kontsentratsioon, mis pärssib ammooniumit oksüdeerivate bakterite tööd. Nitrititseerivatele bakteritele võivad vähem või rohkem ohtu kujutada erinevad toksilised ühendid. Nendeks on näiteks raskmetallid, pestitsiidid, anorgaanilised tahked ühendid või tugevad desinfitseerijad nagu kloor. Kui toksilisel ühendil on halb mõju nitrititseerivatele bakteritele, siis mõju ei avaldu kohe, vaid paari nädala jooksul. Nitrititseerivad bakterid ei ole toksiliste ühendite suhtes rohkem tundlikud kui mistahes muud bakterid [10].



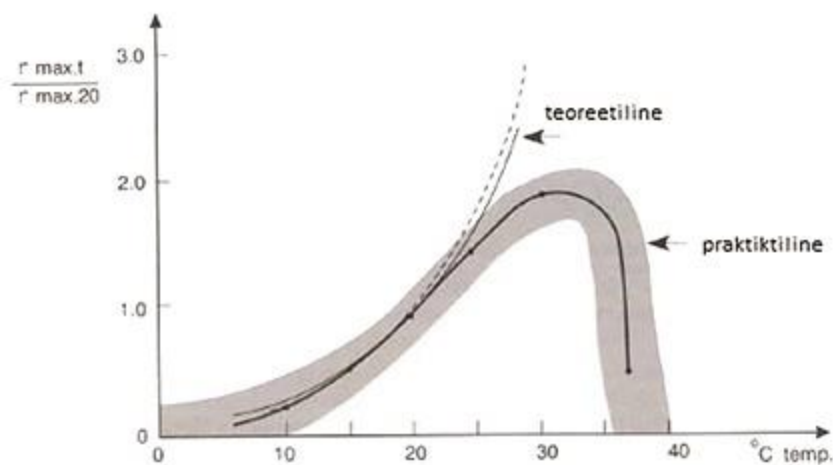
Joonis 4. Nitrifikatsiooni läbiviivate bakterite inhibeerimine erinevate lämmastikku sisaldavate ühendite poolt [10]

Bakterid kasutavad substraati energia saamiseks. Ammooniumi oksüdeerivad bakterid kasutavad substraadina ammooniumlammastikku, ning nitritit oksüdeerivate bakterite jaoks on substraadiks nitritlammastik. Lisaks on olulised muud bakterite elutegevuseks vajalikud ained, nagu näiteks süsinikdioksiid, millest bakterid saavad kätte endale vajaliku süsiniku. Fosfaat on teine oluline aine, mida nitrifitseerivad bakterid ellujäämiseks vajavad. Lisaks on veel kasvuks vaja kasvuks mikroelemente, nagu kaltsium, molübdeen, magneesium, vask ja raud. Nende ainete olemasolu paneb aluse nitrifikatsiooni toimumisele ja nende kontsentratsioonid mõjutavad nitrifikatsiooni kiirust [10].

Nitrifikatsiooni mõjutab hapniku kontsentratsioon. Hapniku küllus on vajalik, et protsess toimiks hästi. Madal hapniku kontsentratsioon võib inhibeerida nitrifikatsiooni. Nitrifitseerivad kemotroofsed bakterid on madala hapniku kontsentratsiooni suhtes tundlikumad, kui heterotroofsed bakterid. Ammooniumi oksüdeerimise protsess vajab rohkem hapniku ja takistab seetõttu nitriti oksüdeerimise protsessi [10].

Keemilise reaktsiooni kiirus tõuseb temperatuuri tõusuga (joonis 5). See kehtib ka biokeemiliste reaktsioonide puhul nagu nitrifikatsiooniprotsess, milles bakterite rakud kasutavad ensüüme katalüsaatorina. Teisalt aga liiga kõrgetel temperatuuridel saavad ensüümid

kahjustada ja nitrifikatsiooni kiirus langeb järsult. Biokeemilise protsessi toimumise käigus tõusev temperatuur on tasakaalustatud langeva temperatuuriga, mis läheb ensüümide lõhustamiseks. Nende summa annab optimaalse temperatuuri, mis on sobilik reaktsiooni toimumiseks. Mikroorganisme, kelle jaoks on sobilik temperatuur 15-20 °C, nimetatakse psührofiilideks, temperatuur 30-35 °C on sobilik mesofiilidele ja 50-55 °C termofiilidele. Soodsaim temperatuur nitrifikatsiooni toimumiseks on vahemikus 35-40 °C. See tähendab, et biofiltris oleva vee temperatuur jääb alati alla soodsaima temperatuuri. Vee temperatuur ei mõjuta nitrifikatsiooni, kui biofiltrisse sisenev ammooniumi kogus on stabiilselt sama. Nitrifitseerivad bakterid on hoopis tundlikud järsule temperatuuri muutusele. Kui temperatuur tõuseb järsult, siis bakterite aktiivuse tõus on eeldatust madalam ja kui toimub järsk temperatuuri langus, siis bakterite elutegevus langeb oodatust kiiremini. Temperatuur mõjutab ammooniumit ja nitritit oksüdeerivate bakterite kasvumäära erinevalt. Ammooniumit oksüdeerivate bakterite elutegevus kõrgematel temperatuuridel on parem kui nitritit oksüdeerivate bakteritel [10].



Joonis 5. Nitrifikatsiooni kiiruse sõltuvus temperatuurist [10]

On ka teada, et soolsus avaldab nitrifikatsioonile mõju. Bakterid suudavad kohastuda peaaegu igas soolsuses, kui neile selleks piisavalt aega anda. Kui vee soolsus on >5 g/l, ei suuda bakterid enam tegutseda. Samuti pärsib liigne valgus bakterite kasvu ja võib soodustada vetikate kasvu biokilekandjal [3].

1.5. Mikrobioloogiline kooslus biofiltris

Biofilter on süsteem, mis viib läbi soovitud protsessi mikroorganismide abiga. Eri tüüpi mikroorganismid saavad läbi viia erinevaid protsesse biofiltris. Biofiltri projekteerimisel tuleb luua just selline keskkond, et vastavat tüüpi mikroorganismid antud keskkonnas kasvaksid [9]. Nitrifikatsiooni läbi viivaid baktereid esineb laialdaselt mulla- ja veekeskkonnas. Seepärast on neid väga lihtne saada biofiltrisse lihtsatest allikatest, nagu näiteks kalatiikides kasutatavast veest. Veendumaks bakterite olemasolus ja nende töövalmiduses, jälgitakse biofiltrit pärast käivitamist mõned nädalad. Samal ajal toidetakse biofiltrit ammooniumlämmastikuga ja jälgitakse, millal selle kontsentratsioon vähenema hakkab [7]. RAS-is toimuva biofiltratsiooni käigus muudetakse toksilised lämmastiku ühendid ohutuks [13]. Erinevused bakteriaalsetes kogukondades võivad olla saanud mõjutusi ka UV-ga ja osooniga vee desinfitseerimisest, kuid suuremat rolli bakteriaalse koosluse kujunemises mängib biokilekandjate ehitus [14].

Üldiselt liigitatakse biofiltrites elutsevad aeroobsed bakterid kaheks. Heterotroofsed bakterid, kes kasutavad lahustunud süsinikku ära omale toiduks, ja kemotroofsed bakterid, nagu näiteks *Nitrosomonos*, kasutavad ammooniumi toiduna ja nende elutegevuse tulemusena tekib nitrit. Teistlaadi kemotroofsed bakterid, nagu *Nitrospira*, kasutavad nitritit toidu allikana ja toodavad nitraati elutegevuse tulemusena. *Nitrosomonos* ja *Nitrospira* kasvavad ja koloniseerivad biofiltris seni, kuni neil on seal toitu [9]. Kessel *et al.* järgi on olulised ammooniumi ja nitriti oksüdatsioonid bakterid, nagu *Nitrosospira* ja *Nitrospira*. Lisaks on avastatud, et ammooniumi oksüdeerimisel tegutseb ka bakter nimega *Crenarchaea*. Nitraadi kuhjumist süsteemis saab ennetada päevas mingi osa vee väljavahetamisega, kuid see on kulukas ja ebaefektiivne. Kõrge nitraatlämmastiku sisaldus ei tohi olla ka loodusesse suunatavas vees, selle tõttu üritatakse leida erinevaid lahendusi bakterite abil reovee puhastamiseks [13].

Kemotroofsete bakterite tüübid on aeglase kasvuga. Kui võrrelda neid heterotroofsete bakteritega, siis viimased kasvavad viis korda kiiremini ja tõrjuvad endale sobivates elutingimustes välja teist tüüpi bakterid [9]. Kuna enamik biofiltreid on mõeldud selleks, et eemaldada $\text{NH}_4^+\text{-N}$ veest kemotroofsete bakterite kaasabil, siis on nende aeglane kasv probleemiks. Seepärast peaks biofilter olema võimalikult puhas ja minimaalse kontsentratsiooni kuivainega [3]. Kemotroofsete bakterite elutegevuse kiirenduseks on leitud erinevaid võimalusi. Näiteks on üheks võimaluseks biofiltri mahtu suurendada, et see võimaldaks rohkemate eri tüüpi bakterite kasvu. Teiseks meetodiks on läbivoolureaktori pikem

teekond, et selle eri tsoonides saaksid kasvada erinevad bakterid [9]. Viimasega kaasneks aga veesüsteemi alla mineva pindala suurenemine, mis vähendaks RAS-i ökonoomusust.

Denitrifikatsioon toimub anaeroobsete bakterite poolt, kes kasutavad ära orgaanilise ja anorgaanilise aine, et toota nitraadist õhulämmastikku (N_2). Lämmastikuringe olulisim osa on anammoks bakterid, kes viivad läbi anammoks (anaeroobse ammooniumi oksüdatsiooni) protsessi, vastutavad 30%-50% merevee lämmastikukaost. Kuna baktereid, kes viivad läbi anammoksi ja osalevad lämmastikuringes, on leitud mere ökosüsteemist ja ka näiteks reoveepuhastitest, siis esinevad nad ka RAS-is. Kessel *et al.* toob välja, et biofilter võib eemaldab karpkala basseinist efektiivselt ammooniumi, kombineerides nitrifikatsiooni, denitrifikatsiooni ja anammoksi protsessi. Kõige olulisemad organismid nende protsesside läbiviimiseks on *Nitrosomonas*, *Nitrococcus* ja *Nitrospira*. Anammoks võib olla biofiltris kasulik protsess, kuna toimub kaladele toksilise ammooniumi- ja nitritlämmastiku ärastus [13].

1.6. Biokile

Vesi RAS-is sisaldab baktereid ja algloomi, millest osa on seotud orgaanilise aine lagunemisega vees ja teised vees leiduva ammooniumlämmastiku, nitritlämmastiku ja nitraatlämmastiku lagunemisega. Mikroorganisme võib leida vees vabalt hõljumas ja ka biokilena. Biokile tekib ennekõike tahkete osaksete olemasolul vee keskkonnas nende kokkupuutepinnale. Biokile tekkimine on seotud mikroorganismide loodud kaitsemehhanismiga. Selline koondumine võimaldab neil ennast kaitsta teiste mikroorganismide eest või aitab hakkama saada vähem sobivate keskkonnatingimustega [4].

Biokilena elutsevad bakterid toimivad madalama efektiivsusega, kuna bakterid on koondunud ja ained peavad läbima biokilet jõudmaks alumiste bakteriteni. Kõik ained ei jõua sügavamal biokiles paiknevate bakteriteni. Näiteks hapnik suudab tungida 100-200 mm sügavusele, kuid biokile võib olla isegi paksem [10].

1.7. RAS-is kasutatavad lisapuhastusmeetodid ja -seadmed

Veekeskkonna näitajatest on kalade tervise seisukohalt olulisemad temperatuur, pH, vees lahustunud hapniku sisaldus, ammooniumlämmastiku sisaldus ja üldist orgaanilise aine sisaldust näitav biokeemiline hapnikutarve (BHT). Kui vesi pole puhas ja antud näitajad on

korrast ära, võivad kalad haigestuda. Näiteks, kui temperatuuride vahe on kümme ja enam kraadi, täheldatakse karpkaladel tervisehäireid, eriti üleviimisel soojemast veest külmemasse. Kaladele on eluks kõige vajalikum vees lahustunud hapnik. Hapniku sisaldus avatud veekogus muutub sõltuvalt temperatuurist (külmemas vees lahustub rohkem hapnikku). Vee hapnikurežiim oleneb samuti vees leiduvast orgaanilise aine hulgast. Mida rohkem on orgaanilist ainet, seda enam kulub hapnikku selle lagundamiseks ning seda vähem jääb hapnikku vette [15]. Ammooniumlämmastik on kaladele toksiline ja võib põhjustada neile stressi juba 0,05 mg/l kontsentratsiooni juures. See toob kaasa kalade aeglasema kasvu ja suurema vastuvõtlikkuse haigustele [7].

Kalade patogeensete mikroorganismide raviks kasutatakse sageli antibiootikume. Siiski võib kaladel tekkida antibiootikumide resistentsus ja seepärast kasutatakse kalade haigustega võitlemiseks ka UV-d ja osooni [4]. Järgnevalt on välja toodud erinevad lahendused, kuidas puhastada RAS-is ringlevat vett patogeenidest ja võimalikud antibiootikumide ning veepuhastusseadmete mõjud RAS-ile endale.

1.7.1. Ultraviolettkiirgus

Selleks, et ennetada haiguste teket, võib kasutada UV-filtrit. UV-d kasutavad veepuhastusseadmed on väga efektiivsed ja ei avalda negatiivset mõju kaladele. UV-filter hävitab kõik võimalikud vees leiduvad bakterid, viirused ja mikroorganismid [16]. UV-filter on lihtsa tööpõhimõttega. RAS-is ringlev vesi voolab läbi korpuse, mille sees on UV-lamp (või UV-lambid) ning ultraviolettkiirgus hävitab haigusetekiitajad.

1.7.2. Osoon

Teiseks patogeenidest vabanemise meetodiks on osooni kasutamine. Osoon ise on väga mürgine ja selle kontsentratsiooni tuleb tingimata jälgida [16]. Osoon on selline ühend, mis oksüdeerib paljusid aineid ja kahjustab sellega elusorganisme, kaasa arvatud nitrifitseerimisprotsessi läbi viivaid baktereid. Biokile suudab nitrifitseerivaid baktereid osooniga kokkupuutel väga hästi kaitsta. Biofiltri jõudlusele ei avalda mõju osooni kogus kuni 0,15 mg/l vees. Mõõdukas osoneerimine avaldab positiivset mõju nitrifikatsiooni toimumisele.

Osooni eraldav üksus võiks paikneda RAS-is enne biofiltreid just seetõttu, et nitrifikatsioon toimuks efektiivsemalt ja sealjuures väheneks orgaaniliste ühendite kogus, mis siseneb biofiltrisse. Kõige olulisem on jälgida, et osooni kontsentratsioon vees oleks ≤ 0.05 mg/l [17].

1.7.3. Formaldehüüd ja peräädikhape

Selleks, et parandada vee kvaliteeti ja ravida kalade haigusi, on tavaliseks saanud keemiliste lisandite ja antibiootikumide kasutamine kalade kasvatamisel. Kemikaale kasutatakse hoidmaks kontrolli all kalade patogeene. Ektoparasiit (*Ichthyophthirius multifiliis*) on üks kõige sagedasem RAS-is elutsev parasiit ja võib tekitada olulist kahju, kui tema ravimisega ei hakata tegelema õigeaegselt ja korrektselt. Antud ektoparasiidi kontrolli all hoidmiseks kasutatakse kõige sagedamini formaldehüüdi. Formaldehüüd on RAS-is kasutamiseks hea, kuna selle raviefektiivsus on kõrge ja samal ajal kahjustab see vähe kalu ning biofiltrit. Formaldehüüdi kasutamine biofiltrites on teisalt probleemiks, kuna selle liigne kasutamine avaldab mõju keskkonnale ja lisaks on esile kerkinud töötajate ohutuse küsimused. Formaldehüüdi kasutamisele on olemas alternatiive, kuid kõik RAS-id ei ole hästi kohandatud UV-filtri või osooni kasutamiseks [18].

Peräädikhape (PAA) on tugeva antimikroobse toimega ühend. PAA ja vesinikperoksiid lagunevad kergelt hapniku ja veega, ning on võimalik, et nad asendavad formaliini, mis veesüsteemis mõjutaks kalade patogeene olemasolu. PAA-l on suurem oksüdeerimise potentsiaal kui näiteks klooril, hüpokloriidil ja vesinikperoksiidil, seetõttu on PAA saanud palju tähelepanu kasutamaks seda desinfitseerijana ka olmejäätmete reovee puhul. PAA-d hapestatakse stabiilseks, et seda oleks võimalik turustada. PAA-l on väga hea parastiitide vastane toime ja sealjuures mõjub see ka laias temperatuurivahemikus [18].

1.8. Ettevaatusmeetmed RAS-i toimimiseks

Tegelikkuses on vaja RAS-i puhul olla valmis ka erijuhtumiteks, näiteks kui tekib voolukatkestus ja veepump ei saa enam töötada. Iga kalakasvatuse süsteemiga seotud mehaanilist komponenti peaks saama vajadusel kiiresti asendada [16].

Näiteks võiks ettevaatlikkuse mõttes olemas olla vee ringluse säilitamiseks varupump ja aereerimissüsteemi asendamiseks õhukompressor. Hapniku ligipääsu saab mõjutada ka

veevoolu kiiruse reguleerimisega [16]. Hapniku taset tuleb hoida küllastumise piiri peal. Lahustunud hapniku tase vähendab kalade kasvu ja tootlikkus jääb väiksemaks [5].

Tagamaks süsteemile kindlus ja puhtus, peab olema võimalik saasteainetest vabanemiseks vett täielikult välja vahetada [6]. Voolukatkestuse puhul pole kasu, kui tagavaraseadmed töötavad ainult elektri peal. Seepärast peaks olema võimalik kasutada näiteks bensiini või diiselkütuse peal töötavat generaatorit. Mida enam on tagavarasüsteem automatiseeritud, seda kulukam see on, kuid nii on kindlustatud veesüsteemi toimimine ka siis, kui inimesi läheduses pole [16].

1.9. RAS-i areng Eestis ja mujal maailmas

Praeguse Eesti aladel rajati esimesed kalatiigid munkade poolt kloostrite juurde juba 13. sajandil [19]. Kaasaegsete kalakasvandustega neid tiike võrrelda ei saa ja selle aja jooksul on toimunud tohutu areng. Praeguse seisuga on RAS Eestis juba mitmel pool kasutusel. P. Päkk on oma raamatus loetlenud Eesti RAS-ides kasvatatavad kalaliigid. Näiteks on otstarbekas pidada RAS-is, kus on võimalik kergesti muuta elutingimusi - vee temperatuuri, valgustatust ja muud - ahvena sugukarja, angerjat, angersäga, siia noorkalu ja tuura [20].

Kalade hooajaväline paljundamine on uusim kunstliku paljundamise meetod, mida kasutatakse eelkõige RAS-is ja sellistes kasvandustes, kus on võimalik vett jahutada. See meetod võimaldab saada uusi põlvkondi soovitud ajal ehk loodusliku kudemise ajast varem või hiljem. Varem kasutati selleks hormoonsüste [20].

Kalakasvatus kasvab eri maailmaosades jõudsasti, kuid põhjamaades, nagu Taani, Fääri Saared, Island, Rootsi ja Soome, on kalakasvatus püsinud enam-vähem muutumatuna või isegi vähenenud. Osa sellest on põhjustanud looduslikud tingimused, milleks on väljakutse pikkadel madala temperatuuriga perioodidel intensiivselt toota. Ranged keskkonnanõuded, piiratud juurdepääs mageveele, keskendumine jäätmete vähendamisele heitvees ja kalade heaolu tagamiseks esitatud nõuded aeglustavad tööstuse kasvu veelgi. RAS-il on suur potentsiaal sealsele kasutamisele just selle keskkonnasõbralikkuse tõttu, kuid RAS-i miinusteks on suured investeerimis- ja opereerimiskulud. Seda süsteemi on raske hallata ja kasumlikkus väheneb ka seetõttu, et seal kasvatatavad kalaliigid on piiratud [21].

Suuremahuliselt kasvatatakse põhjamaade RAS-ides lõhet (*Salmo salar*), vikerforelli (*Oncorhynchus mykiss*) ja harilikku angerjat (*Anguilla anguilla*), samas on näiteks väikesed

rajatised Arktika paalia (*Salvelinus alpinus*), koha (*Stizostedion lucioperca*) ja tuura (order Acipenseriformes) kasvatamiseks [21].

Viimase 20-30 aasta jooksul on põhjamaades palju projekteeritud ja praktiseeritud maismaal töötavate RAS-ide ehitamist. Taani on olnud üks esimesi riike, mis on projekteerinud RAS tehnoloogiat ekspordiks. RAS on siiani veel mittetäielik süsteem ja selle arendamiseks tuleb teha veel palju tööd, et selle abiga võiks kasvatada rohkem erinevaid kalaliike. Uuemad liigid, mida on püütud RAS-iga kasvatada, on näiteks harilik merikeel (*Solea solea*), ahven (*Percasustainable flavescens*), harilik kammeljas (*Scophthalmus maximus*) ja siig (*Coregonus lavaretus*) [21].

RAS-i juures võiks tulevikus tähelepanu pöörata järgmistele punktidele:

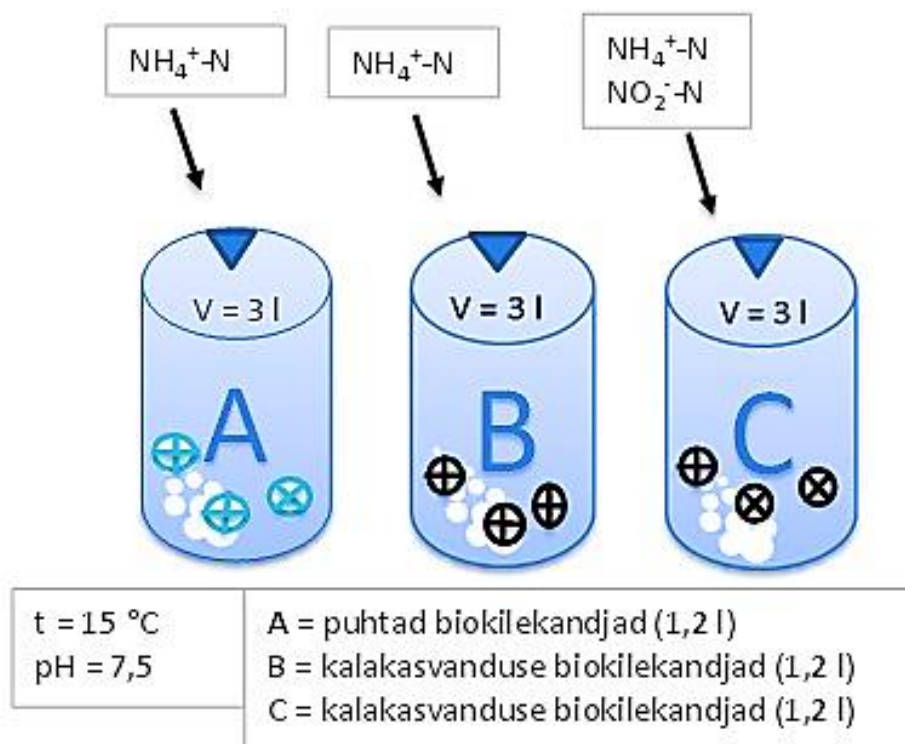
1. Teha see energiasäästlikumaks. Palju elektrit kulub näiteks veepumpade töös hoidmiseks;
2. Vähendada veekasutust muutes veepuhastusprotsessi veelgi efektiivsemaks;
3. Rakendada kõige uuemaid veepuhastuse võimalusi, mis on keskkonnasõbralikumad, näiteks vetikate rakendamine;
4. Vähendada söödakulu, et saaks olla nii majanduslikult kui ka keskkonna mõttes tulusam tootmine [22].

RAS-i kasutuselevõtmine Euroopas ei ole läinud kergesti. Selle oluliseks põhjustajaks on kõrged kapitalikulud, mis RAS tehnoloogiaga esialgu kaasnevad. Lisaks pole piisavalt uuritud, kuidas akumulerevad biofiltritesse näiteks ravimijäägid ja muud ohtlikud ühendid, mis tulevad kaasa näiteks kalade toidust. Pole teada, mis sagedusega tuleks puhastada reaktoreid, et akumulereunud ohtlikud ühendid ei avaldaks negatiivset mõju kaladele. RAS on üheks võimaluseks, et toimiks säästev areng ja maailmas suudetaks sama pindala juures toita ära rohkem inimesi, kui kunagi varem [23].

2. Materjalid ja meetodika

2.1. Katseseadmete kirjeldus

Mõistmaks biofiltri toimimist ja käivitumist, seati üles kolm paralleelset biofiltrit imiteerivat katseseadeldist A, B ja C (joonis 6). Anumas A olid puhtad biokilekandjad ja neile valati peale toitelahus, mis sisaldas 2 mg/l ammooniumlämmastikku. Anumas B kasutati kalakasvatuse biofiltris varasemalt kasutatud biokilekandjaid ja neid toideti samuti 2 mg/l ammooniumlämmastikku sisaldava toitelahusega. Anumas C olid kasutusel kalakasvatuse biokilekandjad ja toitelahus sisaldas peale 2 mg/l ammooniumlämmastiku ka 2 mg/l nitritlämmastikku. Kõikide anumate lahustele lisati karbonaatpuhvrit (NaHCO_3), et pH oleks stabiilne. Lahuse hulka (koos biokilekandjatega) kõigis anumates hoiti terve katseaja jooksul samal tasemel, milleks oli kolm liitrit. Biokilekandjaid oli kõikides anumates 1,2 liitrit. Kõiki katseseadmeid hoiti termokapis, kus toimus nende aereerimine, ning temperatuuri hoiti 15 °C juures. Katse toimus ajavahemikus 05.10.2015-26.11.2015.

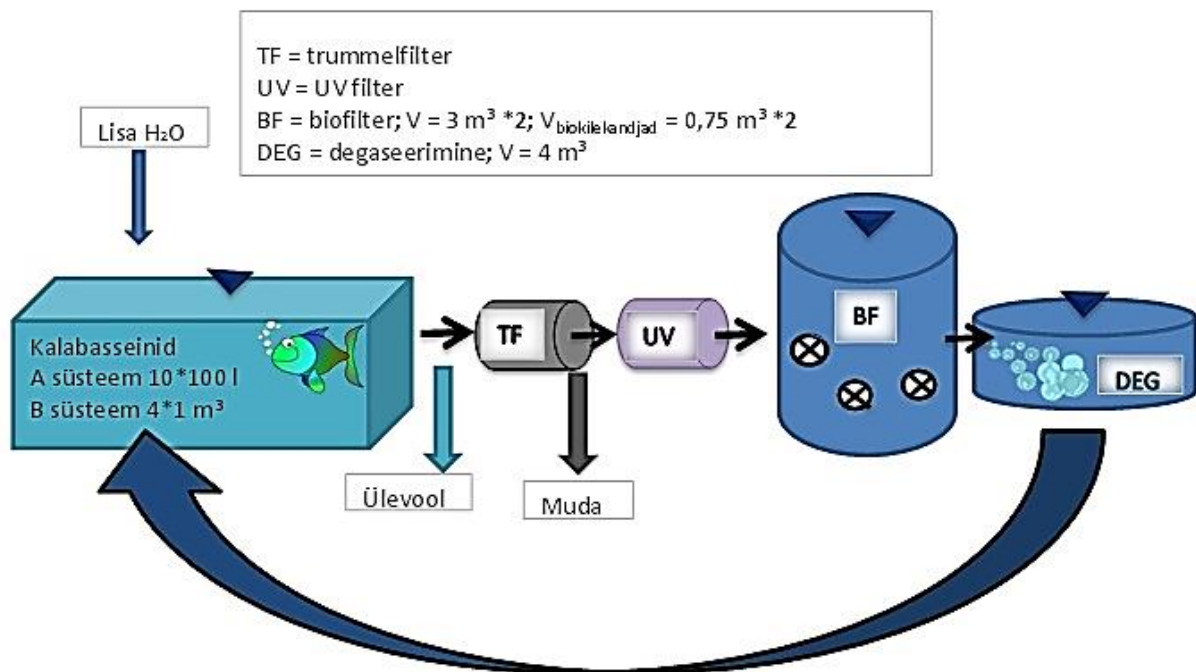


Joonis 6. Kalakasvatuse biofiltrit imiteerivad katseseadmed

2.2. Uuritava kalafarmi biofiltrite kirjeldus

Kalafarmi vee korduvkasutusega kalakasvatussüsteem valmis 2010. aastal. Seda kasutatakse vikerforelli marja ja maimude inkubeerimiseks. RAS on ehitatud kaheosalisena sisetingimustesse (joonis 7). Biofiltrid käivitatakse kord aastas, tavaliselt jaanuaris, ja umbes kuu hiljem pannakse kalamari kalatiikidesse kasvama. RAS töötab kuni forelli maimud on kasvanud piisavalt suureks, et elada välitingimustes olevates tiikides.

Biofiltriteks on kaks suurt plastikust mahutit, mille sees on biokilekandjad. Vesi võetakse süsteemi tarbeks maja kõrval asuvast salvkaevust või jõest. Teatud ajavahemiku tagant töötab automaatne pump, mis lisab süsteemi vett. Kalakasvanduse vesi läbib enne biofiltritesse jõudmist trummelfiltri, kus eemaldatakse muda, ja UV filtri, kus vabanetakse patogeenidest. Pärast biofiltrite läbimist toimub vee degaseerimine ja siis jõuab vesi ringlusega taas kalatiikidesse. Biofiltreid on kokku kaks. Esialgselt ringleb vesi A süsteemis ning vesi läbib mõlemaid biofiltreid. Teiseks võimaluseks on kasutada A ja B süsteemi korraga ja selliselt voolab B süsteemis jõevesi ning biofiltrid ei ole omavahel ühenduses. B süsteem töötab jõevee peal, et seal paiknevaid kalu ette valmistada õues paiknevate tiikide tingimustega.



Joonis 7. Veeringlus kalakasvanduse RAS-is

2.3. Kalafarmi biofiltrite laborianalüüsi kirjeldus

Ajavahemikus 21.01.2016-05.04.2016 toodi mõlemast kalafarmi biofiltrist biokilekandjaid. Biofiltrite nitrifikatsiooni kiiruste määramiseks, tuli katse ette valmistada. Mõlema biofiltri biokilekandjaid analüüsiti samal viisil. Selleks loetleti keeduklaasi 160 kalakasvatuse biokilekandjat ja neile valati peale 300 ml lahust. Lahus sisaldas ligikaudu 50 mg/l ammoniumlämmastikku ja pH stabiilsuse tagamiseks karbonaatpuhvrit (NaHCO_3). Keeduklaasid koos lahustega pandi aereerima termokappi 15 °C juurde. Igal mõõtmispäeval olid toodud värsked proovid, ainete kontsentratsioonide määramise ajavahemik oli 4 tundi.

2.4. Metoodikad

Nitrifikatsiooni kiiruse määramiseks mõlema eelnevalt kirjeldatud katse puhul mõõdeti ammoniumlämmastiku, nitritlämmastiku, nitraatlämmastiku kontsentratsioone ja pH-d. Eelkatseesadmetes A, B, C määrati ka hapniku hulka. Proovid analüüsiti Tartu Ülikooli kolloid- ja keskkonnakeemia õppetooli laboris. Andmeanalüüsis kasutati tabelarvutustarkvara Microsoft Excel.

Tabel 1. Proovidest määratud analüütilised parameetrid, meetodid ning kasutatud aparatuur

Parameeter	Meetod, aparatuur
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	Määramiseks kasutati Nessleri meetodit. Lahjendatud proovile lisati mineraalstabilisaatorit, polüvinüülalkoholi ja Nessleri reagenti. Kolorimeetriliseks analüüsiks kasutati spektrofotomeetrit Hach Lange DR2800, lainepikkusel 460 nm.
$\text{NO}_2^-\text{-N}$	Lahjendatud proovile lisati reagente diamiin ja sulfanüül. Kolorimeetriliseks analüüsiks kasutati spektrofotomeetrit Hach Lange DR2800, lainepikkusel 540 nm.
$\text{NO}_3^-\text{-N}$	Proov aurutati vesivannil ja proovile lisati naatriumsalitsülaati, kontsentreeritud väävelhapet, deioniseeritud vett ja NaOH EDTA-d. Kolorimeetriliseks analüüsiks kasutati spektrofotomeetrit Hach Lange DR2800, lainepikkusel 415 nm.

NO ₂ ⁻ -N NO ₃ ⁻ -N	Ioonkromatograafiline määramine. Metrohm 930 Compact IC Flex; supressor: 0,1 M H ₂ SO ₄ ; eluent: 3,2 mM Na ₂ CO ₃ ja 1,0 mM NaHCO ₃ ; kolonn: METEOSEP A Supp 5 100/0,4; proovi kogus: 20 µl; voolukiirus 0,7 ml/min; standardlahus Thermo Scientific Dionex Anion Standard, tootenumber: 057591-03.
pH	Mõõtmiseks kasutati portatiivset digitaalset pH-mõõturit (Evikon E6115)
O ₂	Mõõtmiseks kasutati portatiivset digitaalset O ₂ -mõõturit (Marvet Junior 2000)

Nitrifikatsiooni kiiruse määramiseks on kasutatud järgnevaid valemeid:

$$r_V = \frac{\Delta C}{\Delta t} * V$$

r_V = nitrifikatsiooni kiirus ruumalaühiku kohta [g/(m³*d)]

Δc = kontsentratsioonide vahe [mg/L]

Δt = möödunud ajavahemik [d]

V = reaktori ruumala [l]

$$r_S = \frac{r_V * BKKT}{EP}$$

r_S = nitrifikatsiooni kiirus pindalaühiku kohta [g/(m²*d)]

BKKT = biokilekandja täituvus [m³_{BKK}/m³]

EP = eripind [m²/m³]

Võrdluseks on kasutatud kalakasvatustes tehtud mõõtmiste tulemusi. Kalakasvatustes kohapeal määratakse nitritlämmastiku kontsentratsiooni kiirtestidega, mis kujutavad endast reaktsiooni tulemusel tekkinud värvuse visuaalset hindamist ning selle järgi kontsentratsiooni kindlaks tegemist.

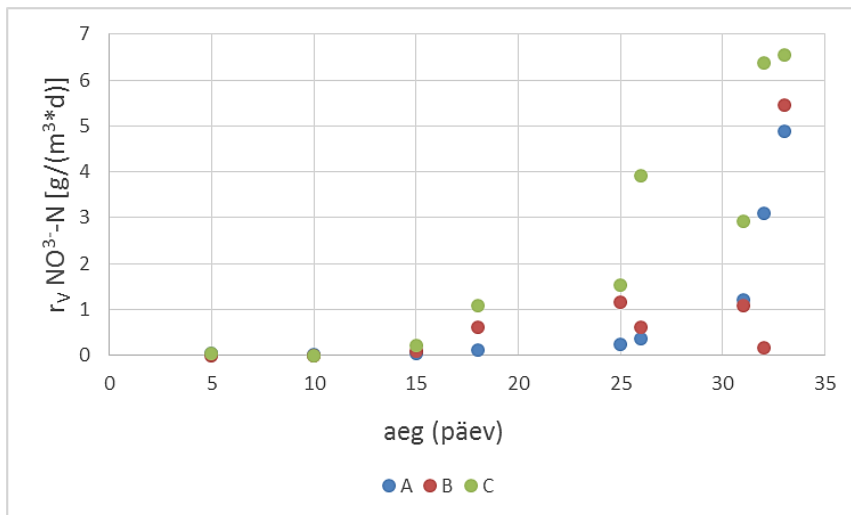
3. Tulemused ja arutelu

3.1. Katseseadmed A, B, C

Katseseadmed aereerisid esialgu samasugustel keskkonnatingimustel 15 °C juures. See on esimene etapp, mida vaadeldi nägemaks, kaua läheb aega, et hakkaks toimuma täielik nitrifikatsioon. Kuna kalafarmis on tingimused nitrifitseerivatel bakteritel sageli muutlikud, siis tekitati ka katseseadmetele erinevaid tingimusi, mis on kalakasvandustes sagedased. Nendeks on näiteks muutused vee temperatuuris ja pH-s. Nii muudeti ka katseseadmetes keskkonnatingimusi: temperatuur tõsteti 20 °C juurde ja 51. mõõtmispäeval viidi pH happega (HCl) üheks tunniks 5-ni ja seejärel karbonaatpuhvri (NaHCO₃) abil tagasi normaalsele tasemele (pH 7,5).

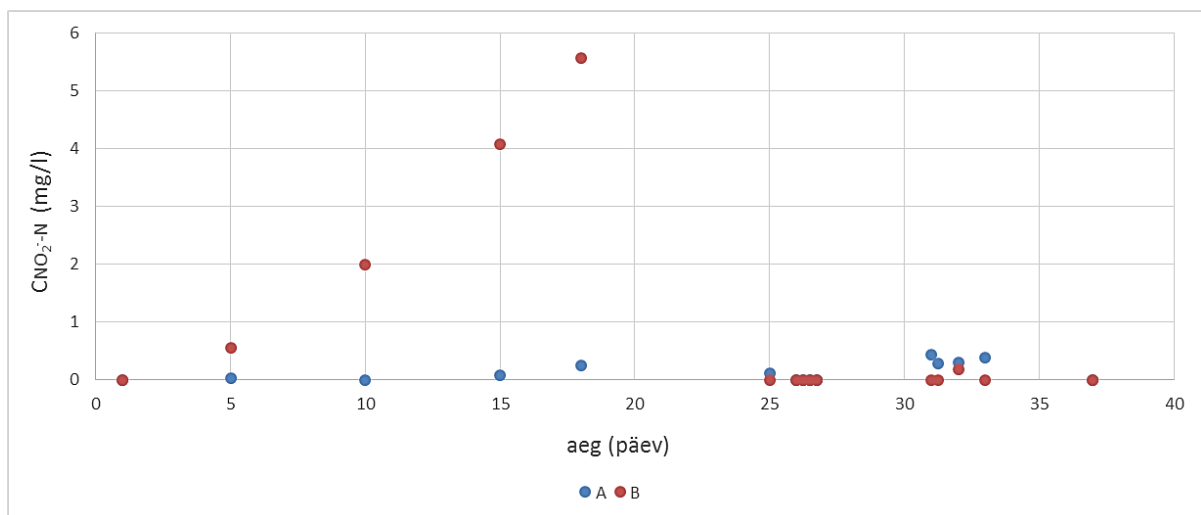
3.1.1. Nitritifitseeriva biokile teke

Nitrifitseeriva biokile tekke erinevused avaldusid selgelt varasemalt kasutuses olnud biokilekandjate ning puhaste biokilekandjate kasutamisel. Katseseadmes A (varasemalt kasutamata biokilekandjatega) hakkas katseperioodi lõpus toimuma täielik nitrifikatsioon väga väihesel määral. Järelikult võtab nitrifitseeriva biokile kujunemine varasemalt kasutamata kandjatel rohkem aega. Katseseadmetes B ja C, milles olid varasemalt kalakasvanduses kasutatud kandjad, oli täieliku nitrifikatsiooni intensiivsus katseperioodi lõpus suurem (joonis 8). Katseseadme C toitmine nitritlämmastikuga on põhjustanud antud seadmes suuremad nitraatlämmastiku tekkimise kiiruse, kuna antud seadmes oli enam nitritit mis oksüdeerub nitraadiks. Lisatud NO₂⁻-N-ga katseseadme C puhul ei avaldunud nitrifikatsiooni teke ajaliselt kiiremini võrreldes katseseadmega B, kuhu NO₂⁻-N ei lisatud.



Joonis 8. Kiirused katseseadmetes A, B ja C

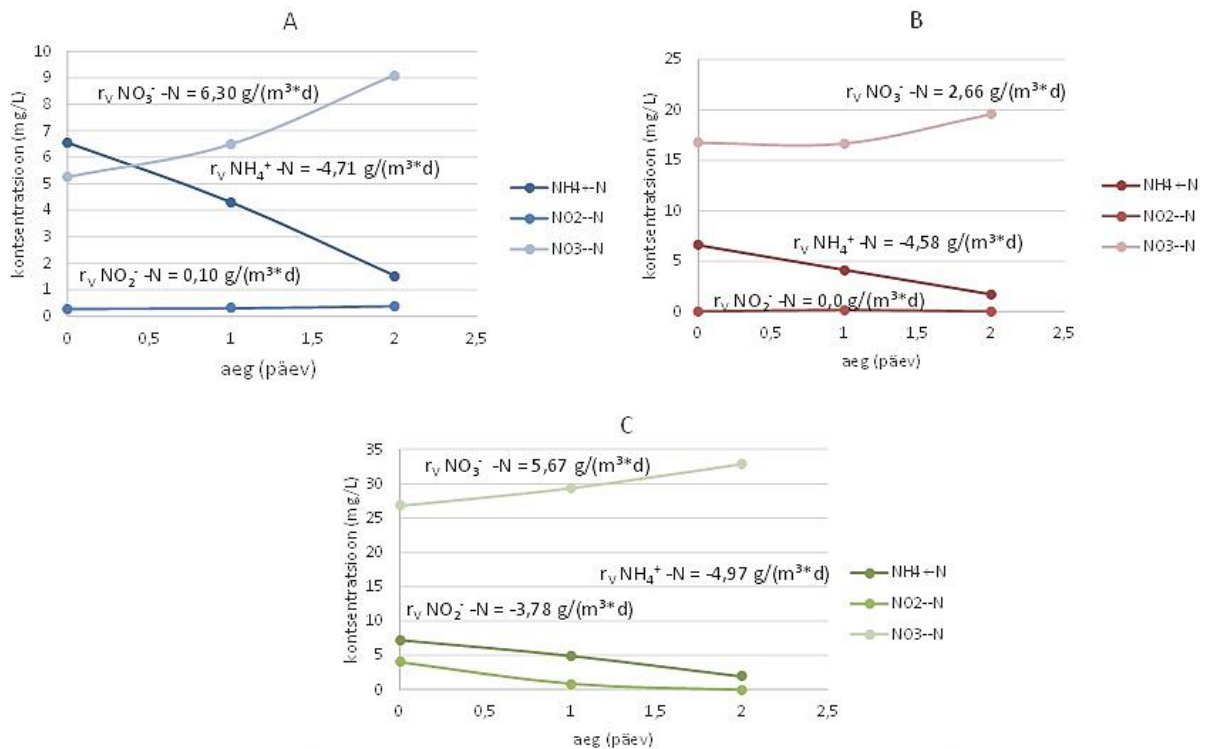
Katseseadmes A ei toimunud üldse NO₂⁻-N kuhjumist, kuna nitritatsiooni ei toimunud. Katseseadmes B toimus NO₂⁻-N kuhjumine (joonis 9). Katsesedmel B kulus NO₂⁻-N ärastamiseks 25 päeva ja siis hakkas toimuma täielik nitrifikatsioon. Katseseadme C mõõdetud kontsentratsioone ei ole joonisel välja toodud, kuna katseseadet toideti samuti nitritlämmastikuga ning ei eristu selgelt, millal hakkas toimuma täielik nitrifikatsioon.



Joonis 9. Nitriti kontsentratsioonid katseseadmetes A ja B

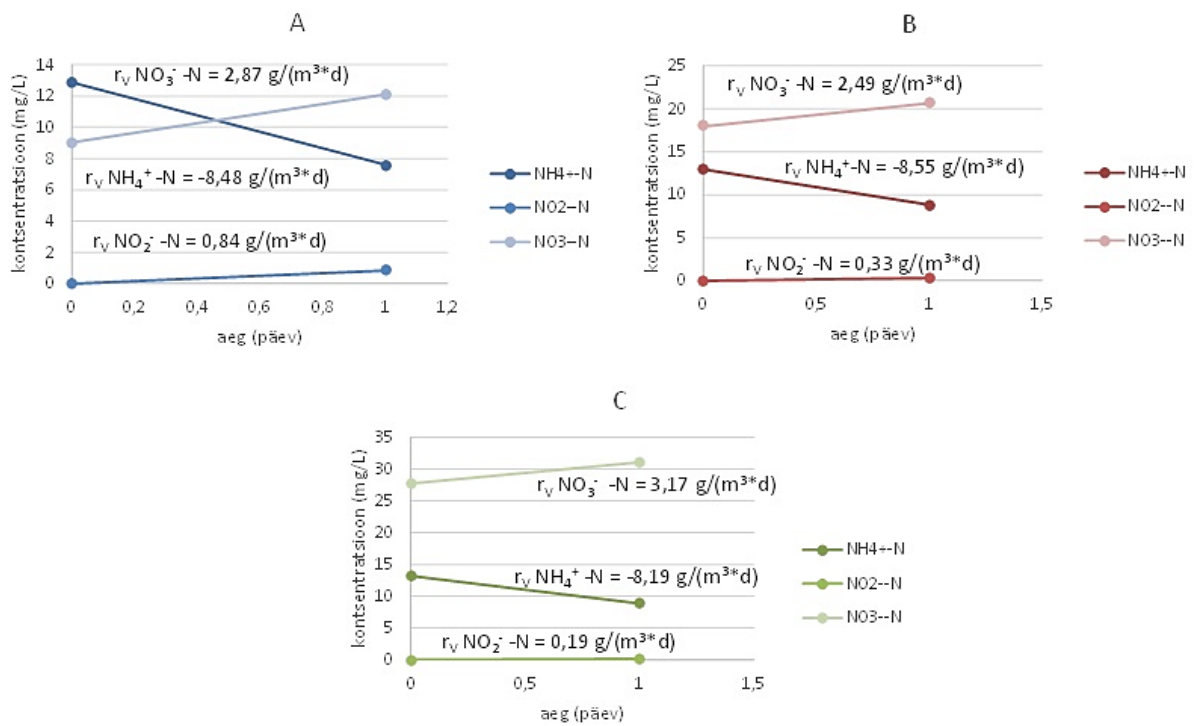
3.1.2. Stressitingimused

Selleks, et saaks võrrelda nitrifikatsiooni toimumist, arvutati kolme päeva vältel katseseadmetes A, B ja C nitrifikatsiooni kiirused (joonis 10) normaaltingimustel (temperatuur 15 °C ja pH 7,5). Normaaltingimusi on edaspidi tähistatud lühendiga N.

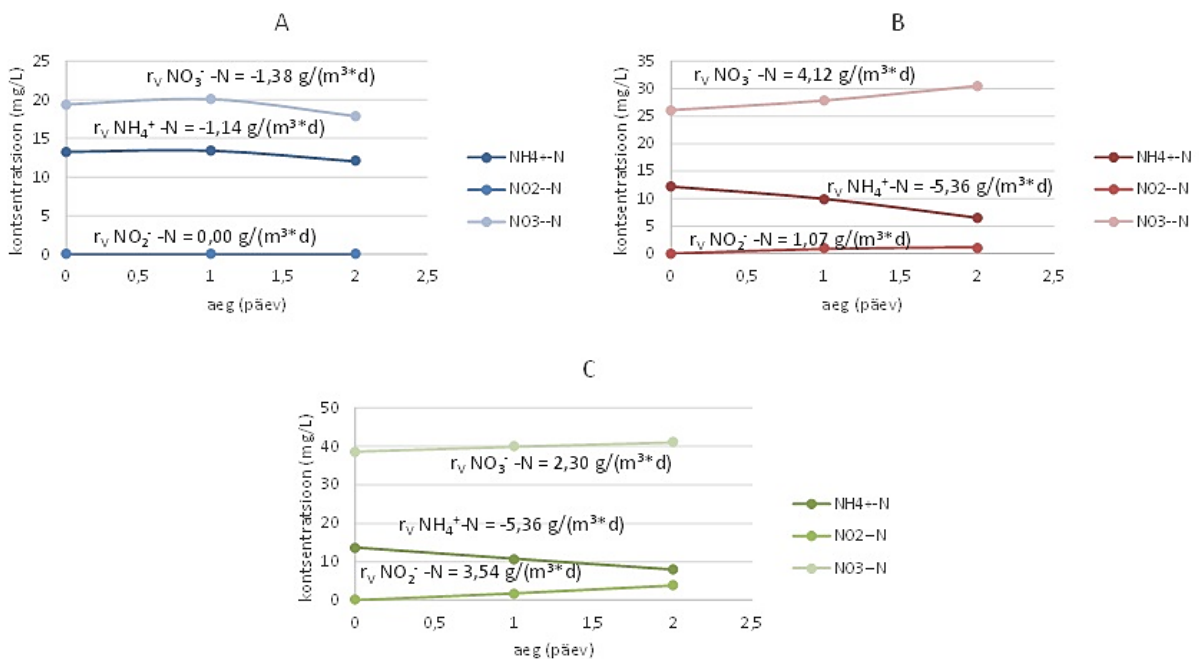


Joonis 10. Reaktsioonikiirused normaaltingimustel katseseadmetes A, B, C

Katseseadmetes A, B ja C vaadeldi esmalt, kuidas mõjub nitrifikatsioonile temperatuuri muutus. Temperatuur, mis oli algsest 15 °C, tõsteti 20 °C-ni (joonis 11). Edaspidi on antud stressitingimust tähistatud lühendiga S1. Järgnevalt prooviti välja selgitada, kuidas mõjub nitrifikatsioonile pH lühiajaline muutus (joonis 12). Katseseadmeid hoiti 20 °C juures ja pH oli esimesel päeval enne mõõtmist 1 tund 5 juures ja seejärel taas 7,5. Katseseadmes C langetati pH-d happega (HCl) ja tõsteti karbonaatpuhvri (NaHCO_3) abil tagasi normaalsele tasemele. Antud tingimuste puhul kasutatakse lühendit S2.

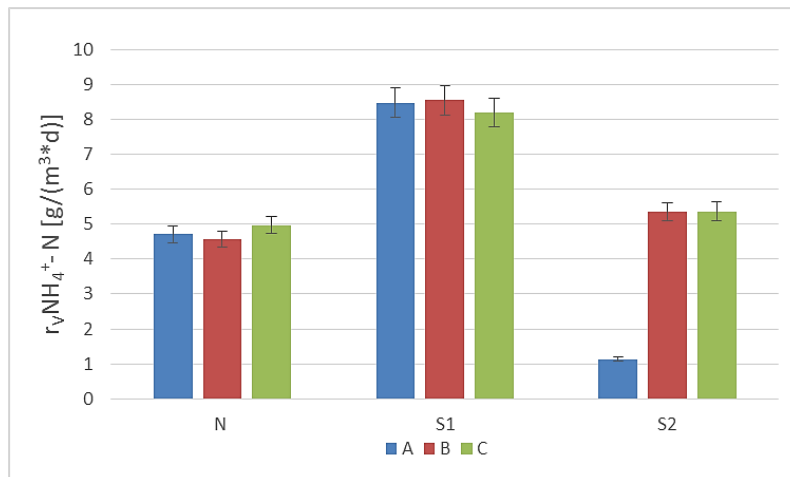


Joonis 11. Reaktsioonikiirused S1 tingimustel (20 °C) katseseadmetes A, B, C



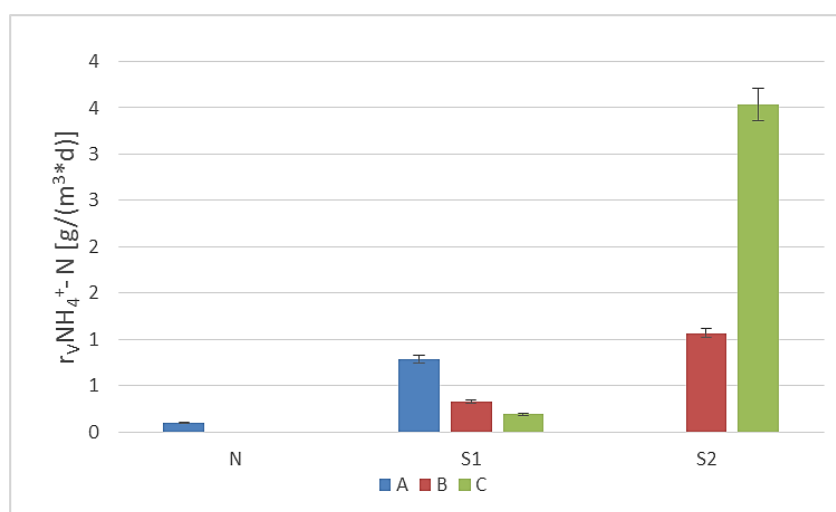
Joonis 12. Reaktsioonikiirused S2 tingimustel (pH 5) katseseadmetes A, B, C

Ammooniumlämmastiku ärastuse kiirus tõusis märkimisväärselt, kui toimus temperatuuri tõus (joonis 13). Jooniselt 13 on näha, et S2 tingimused mõjusid nitrifikatsiooni toimumisele pärssivalt. Katseseade A, kus kasutati puhtaid biokilekandjaid, sai muutustega pH-s kõige halvemini hakkama.



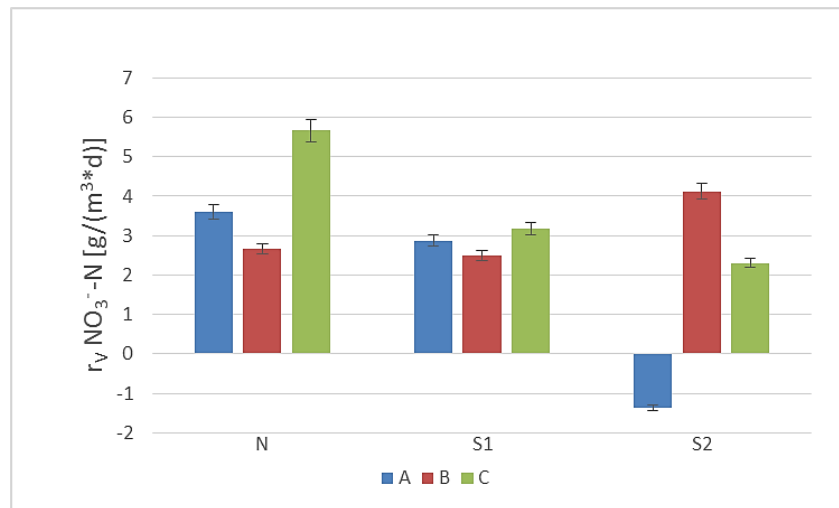
Joonis 13. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ärastuse kiirused erinevates tingimustes katseseadmetes A, B, C

Nitritlämmastiku tekkekiirused normaaltingimustel olid kõikides katseseadmetes nullilähedased (joonis 14). Temperatuuri tõustes suurenes $\text{NO}_2^-\text{-N}$ tekkimise kiirus kõige enam katseseadmes A. Muutused pH-s mõjusid nitrifikatsiooni toimumisele pärssivalt. Katseseadmetes B ja C toimus $\text{NO}_2^-\text{-N}$ kuhjumine, mis on kalakasvanduse mõistes ohtlik nähtus. Katseseadmes A pH muutuste tagajärjel nitritlämmastikku juurde ei tekkinud aga ka ammooniumlämmastiku kadu oli väike. Järelikult nitrifikatsiooni toimumine oli antud katseseadmes häiritud.



Joonis 14. $\text{NO}_2^-\text{-N}$ tekkekiirused erinevates tingimustes katseseadmetes A, B, C

Nitraatlämmastiku tekkimine normaaltingimustel oli kõige kiirem katseseadmes C (joonis 15). Temperatuuri tõusuga NO_3^- -N tekkimise kiirused langevad ja on kõikides katseseadmetes enam-vähem võrdsed. pH muutusega nitraatlämmastiku tekkimise kiirus langes märkimisväärselt katseseadmes A. Põhjuseks võib pidada seda, et antud katseseadmes ei kujunenud välja hästi nitrifitseerivat biomassi. NO_3^- -N tekkimise kiirused märkimisväärselt ei muutunud pH muutustega katseseadmes B ja C.



Joonis 15. NO_3^- -N tekkekiirused erinevates tingimustes katseseadmetes A, B, C

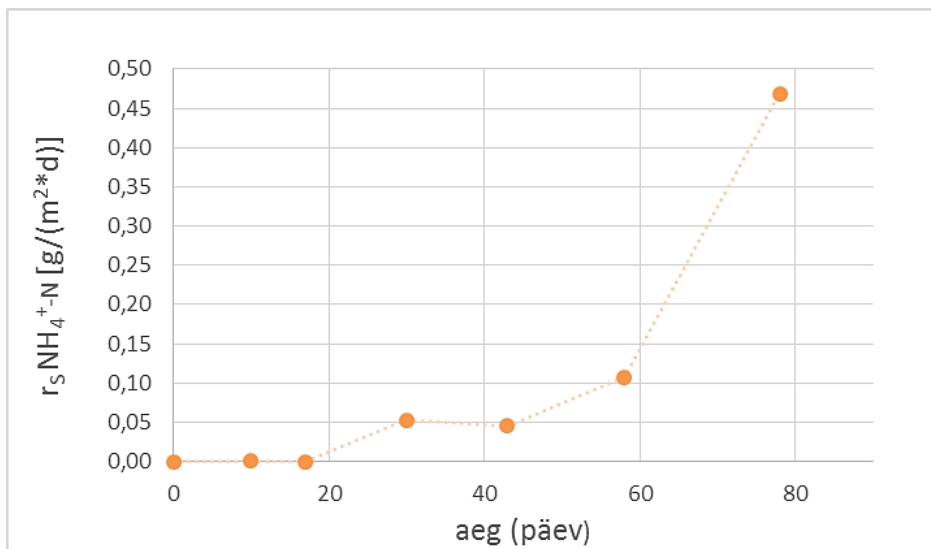
Kui varasemalt katseseadmes C, kuhu lisati nitritlämmastikku eelkõige käivitusprotsessi kiirendamiseks, mingeid eeliseid välja ei tulnud, siis stressitingimustes sai katseseade C hästi hakkama temperatuuri muutusega. Katseseadmes A, kus algselt olid sees puhtad biokilekandjad, hakkas temperatuuri muutuse tagajärjel nitrit kuhjuma. Stress, mille puhul langetati pH üheks tunniks 5-le ja viidi seejärel taas normaalsele 7,5-le, mõjus kõige enam katseseadmele A, kus nitrifitseeriv biokile ei saanud stressitingimustega hakkama. Stress, mida tekitati pH muutmisega kõikides katseseadmetes ja selle mõju nitrifikatsioonile vajab enam uurimist, kuna antud katse tulemused ei näita midagi konkreetset.

3.2. Nitrifitseeriva biokile teke kalakasvatuse biofiltrites

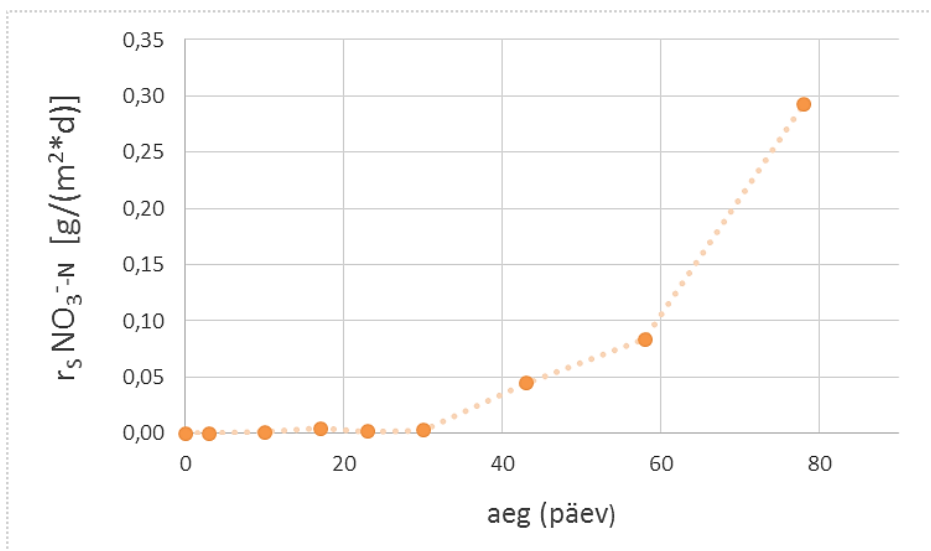
Kalafarmist toodud biokilekandjatega tehtud laborianalüüsi käigus mõõdeti ammoniumlämmastiku, nitritlämmastiku ja nitraatlämmastiku kontsentratsioonid ning nendest omakorda arvutati reaktsioonikiirused. Analüüsid teostati alates hetkest, kui biofiltrid

käivitati, algselt umbes igal nädal ja hiljem pikemate ajavahemike tagant. Lisaks on töös kasutatud kalakasvatuses kohapeal mõõdetud nitritlämmastiku kontsentratsioone.

Kalafarmi biokilekandjatega teostatud laborikatsed kajastavad selgelt, millal hakkasid biofiltrid tööle. Seda võib tõlgendada ammooniumlämmastiku ärastuskiirusest (joonis 16). Kõige enam ammooniumlämmastikku ärastati viimasel mõõtmispäeval (05.04.2016). Teisalt näitab selgelt nitrifikatsiooni toimumist NO_3^- -N tekkimise kiirus (joonis 17). Jooniselt on näha, et NO_3^- -N hakkas biofiltritesse tekkima umbes 43. mõõtmispäeval.



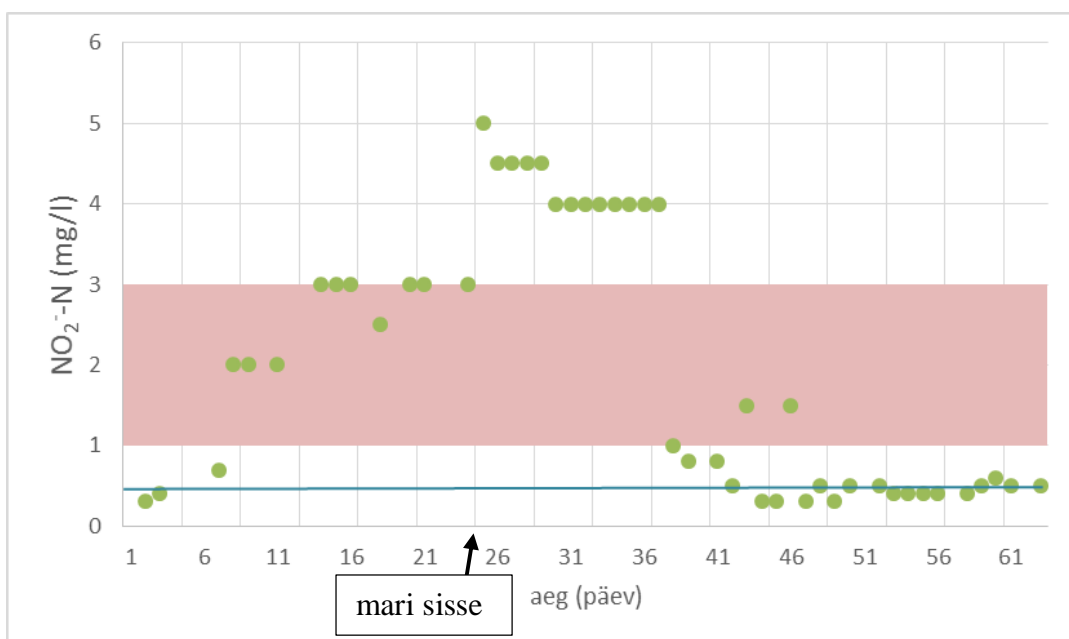
Joonis 16. NH_4^+ -N ärastuskiirused laborikatses



Joonis 17. NO_3^- -N tekkekiirused laborikatses

Kalafarmis kohapeal mõõdeti stabiilselt NO_2^- -N väärtusi (joonis 18) mis on võrreldavad laborikatses saadud tulemustega. NO_2^- -N väärtus langeb järsult 38. päeval ehk siis hakkas biofiltrites toimuma täielik nitrifikatsioon. Kuna kalafarm pidi kalamarja varem kalatiikidesse paigutama, siis seda ka tehti. Antud tulemuste põhjal võiks väita, et kalamari asetati tiikidesse väga ohtlikul perioodil, kui nitritlämmastiku kontsentratsioonid olid kaladele letaalsed. Kroupova *et al.* artiklist tuleb välja, et nitritlämmastiku kontsentratsiooni 1 mg/l korral jäid kõik kalad ellu, kuid 3 mg/l NO_2^- -N korral ei jäänud üksi kala ellu (antud kontsentratsioonide vahemik on joonisel 18 tähistatud punase alana). Soovituslik nitritlämmastiku sisaldus kalakasvanduse RAS-is on $> 0,5$ mg/l (joonisel 18 sinise joone alune osa) [24]. Kalakasvanduse tulemuste põhjal ei saa määratud NO_2^- -N kontsentratsioonides kindel olla, kuna tulemused on visuaalselt hinnatud. Teisalt on NO_2^- -N väärtused ajavahemikus 24.-38. päev kõrgemad ka seepärast, et toimus järsk temperatuuri langus kalamarja sisseviimiseks ja koorumiseks 10°C juurde. Järsk temperatuuri muutus pärsib nitritiseerivate bakterite elutegevust [10].

Nitritlämmastiku sisaldust tiikides viidi antud ajavahemikus madalamale ka veevahetuse abil. Kalakasvanduses kulus biofiltri käivitamiseks võrreldes katseseadmetega B ja C rohkem aega. Labori sisetingimustes läbiviidud katse puhul võis nitrifikatsioon kiiremini toimuma hakata paljudel erinevatel põhjustel. Süsteemi vee hulk oli väiksem ja temperatuur kogu aja vältel stabiilselt 15°C . Kalafarmis oli vee temperatuur peale käivitamist 15°C . Marja sisseviimise päeval viidi temperatuur madalamale 10°C juurde ja hiljem 41. mõõtmispäevaks oli temperatuur tagasi 15°C juures.



Joonis 18. Kalafarmis mõõdetud NO_2^- -N väärtused

Nii katseseadmete A, B ja C, kui ka kalafarmi biofiltrite käivitamisel tehtud katsed näitavad selgelt, et täieliku nitrifikatsiooni toimumist kajastab hästi NO_2^- -N kontsentratsioonide järsk langus. Teisalt saab järeldusi teha nii NH_4^+ -N ärastamise kiiruse, kui ka NO_3^- -N tekkimise kiiruse põhjal. Nitrifitseeriva biokile toimimine on tugevalt sõltuvuses temperatuurist ja teisalt biokilekandjate hulgast. Hästi töötav biofilter suudab alles käivituvast biofiltrist paremini toime tulla stressiga, mida põhjustavad muutused pH-s ja temperatuuris.

Kokkuvõte

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti vee korduvkasutusega kalakasvanduse biofiltri käivitumisprotsessi ja sellega seoses biofiltri kandjate nitrifitseeriva biokile teket. Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas nitritlämmastiku lisamine biofiltrile mõjutab biofiltri käivitamisel nitraati oksüdeerivate bakterite tööd. Lisaks uuriti, kas tekib erinevus biofiltri käivitamisel, kui on kasutusel uued biokilekandjad või varasemalt juba kasutuses olnud kandjad. Töös vaadeldi, millist mõju avaldavad nitrifikatsioonile muutused vee pH-s ja temperatuuris.

Tulemustest selgub, et nitritlämmastiku lisamisel biofiltrile selle käivitumisprotsess ei lühene. Töö käigus selgitati välja, et varasemalt kalakasvanduses kasutuses olnud biokilekandjatele moodustus kiiremini täielikult nitrifitseeriv biokile. Puhaste biokilekandjatega biofiltri puhul, millel ei olnud välja kujunenud hästi nitrifitseerivat biokilet, oli töö häiritud, vee pH-d või temperatuuri muutes. Töö tulemused kinnitavad, et temperatuuri tõusuga toimub nitrifikatsioon efektiivsemalt. Teisalt jäid ebaselgeks, millist mõju avaldab pH muutus nitrifikatsioonile ja selle välja selgitamiseks on vaja teha täiendavaid uuringuid.

Lisaks analüüsiti töö käigus konkreetse kalakasvanduse käivitumist. Antud kalakasvanduses toimus nitritatsioon juba biofiltri käivitamisele järgnenud päevadel. Täielik nitrifikatsioon hakkas toimuma 43. päeval peale käivitamist. Antud kalakasvanduses pandi olude sunnil kalamari kasvama kalatiikidesse enne, kui nitrifikatsioon täielikult toimus.

Käesolev töö keskendus peamiselt vee korduvkasutusega kalakasvanduse biofiltri käivitamisele ja nitrifitseeriva biokile tekkele ning selle toimimisele stressitingimustes. Kalakasvandustes on vajalik madalamat temperatuuri kalamarja koorumiseks ja hiljem kõrgemat temperatuuri maimude kasvatamiseks. Järsu temperatuuri muutuse mõju nitrifikatsiooniprotsessile biofiltris võiks jääda edasiseks uurimustööks.

Kasutatud allikad

- [1] E. C. Nash, „The History of Aquaculture,“ Singapore, Markono Print Media Pte Ltd, 2011, p. 11.
- [2] D. P. DeLong ja T. M. Losordo, „How to Start a Biofilter,“ *SRAC Publication*, pp. 3-4, 12 02 2012.
- [3] J. M. Ebeling, „Biofiltration-Nitrification Design Overview,“ New Orleans, LA, Environmental Engineer, Aquaculture Systems Technologies, 2015, pp. 1-2, 4-5, 9-10, 12, 14-22.
- [4] F. Interdonato, „Recirculating Aquaculture System (RAS) Biofilters: Focusing on Bacterial Communities Complexity and Activity,“ Messina, 2010.
- [5] L. A. Helfrich ja G. Libey, „Fish Farming in Recirculating Aquaculture Systems (RAS),“ Blacksburg, Department of Fisheries and Wildlife Sciences, Virginia Tech, 2015, pp. 2-4, 6, 8, 12, 14.
- [6] T. V. R. Pillay ja M. N. Kutty, „Aquaculture Principles and Practices Second Edition,“ Oxford, Blackwell Publishing Ltd, 2005, pp. 81-82.
- [7] R. Parker, „Aquaculture science second edition,“ USA, Delmar, a division of Thompson Learning, 2002, p. 406.
- [8] H. Kroupova, J. Machova, V. Piackova, J. Blahova, R. Dobsikova, L. Novotny ja Z. Svobodova, „Effects of subchronic nitrite exposure on rainbow trout,“ *Science Direct*, pp. 815, 819, 2008.
- [9] M. Smith, „Biofilters,“ 15 8 2013. [Võrgumaterjal]. Available: <http://biofilters.com/webfilt.htm>. [Kasutatud 24 01 2016].
- [10] L. Björnsdotter, „System, Study of Nitrification Rates in a Biofilm,“ *Department of Civil and Environmental Engineering*, Göteborg, 2005.
- [11] D. Enkeli, „CO2 emssiooni uurimine nanomeetrilisel meetodil naatriumkarbonaadi lahusest erinevates gaasikeskkondades,“ *Tartu Ülikool*, Tartu, 2006.

- [12] S. T. Summerfelt, A. Zühlke, J. Kolarevic, B. K. M. Reiten, R. Selset, X. Gutierrez ja B. F. Terjesen, „Effects of alkalinity on ammonia removal, carbon dioxide stripping, and system pH in semi-commercial scale water recirculating aquaculture systems operated with moving bed bioreactors,“ *Aquacultural Engineering*, pp. 46, 53, 2015.
- [13] M. Kessel, H. Harhangi, K. Pas-Schoonen, J. Vossenberg, G. Flik, M. Jetten, P. Klaren ja H. Camp, „Biodiversity of N-cycle bacteria in nitrogen removing moving bed biofilters for,“ *Aquaculture*, pp. 177, 178, 182, 2010.
- [14] H. J. Schreie, N. Mirzoya ja K. Saito, „Microbial diversity of biological filters in recirculating,“ *Biotechnology*, p. 319, 2010.
- [15] T. Paaver, J. Kasesalu, R. Gross, M. Puhk, T. Tohvert, A. Liiv ja M. Aid, „Kalakasvatus ja kalade tervisehoid,“ Tartu, Halo Kirjastus, 2006, pp. 100-101.
- [16] R. R. Stickney, „Encyclopedia of Aquaculture,“ Texas, A Wiley-Interscience Publication, 2000, pp. 729-730.
- [17] J. P. Schroeder, S. F. Klatt, M. Schlachter, Y. Zablotzki, S. Keuter, E. Spieck ja C. Schulz, „Impact of ozonation and residual ozone-produced oxidants on the nitrification performance of moving-bed biofilters from marine recirculating aquaculture systems,“ *Aquacultural Engineering*, pp. 27, 35, 2015.
- [18] L.-F. Pedersen, P. B. Pedersen, J. L. Nielsen ja P. H. Nielsen, „Peracetic acid degradation and effects on nitrification in recirculating,“ *Aquaculture*, pp. 246, 247, 253, 2009.
- [19] T. Tohvert ja T. Paaver, „Kalakasvatus Eestis,“ Tartu, Tõravere trükikoda, 1999, p. 17.
- [20] P. Päkk, „Kalakasvatus perspektiivsed liigid,“ Pärnu, Kalanduse teabekeskus, 2015, pp. 27-134.
- [21] J. Dalsgaard, I. Lund, R. Thorarinsdottir, A. Drengstig, K. Arvonen ja P. B. Pedersen, „Farming different species in RAS in Nordic countries: Current status and future,“ *Aquacultural Engineering*, pp. 2-3, 2013.

- [22] M. Badiola, D. Mendiola ja J. Bostock, „Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management,“ *Aquacultural Engineering*, pp. 26-35, 2012.
- [23] C. I. M. Martins, E. H. Eding, M. C. J. Verdegem, L. T. N. Heinsbroek, O. B. J. P. Schneider, E. Roque d’Orbcastel ja J. A. J. Verreth, „New developments in recirculating aquaculture systems in Europe:,“ *Aquacultural Engineering*, pp. 83, 84, 91, 2010.
- [24] J. Bregnballe, *A Guide to Recirculation Aquaculture*, Denmark, The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) , 2016, p. 56.

Biofilter's Nitrifying Biomass and its Activity in Recirculating Aquaculture System

Helena Hallasoo

Summary

In today's world the growth of population means also bigger demand of food and water. Traditional fish farming involves breeding fish in big tanks or pools, which takes a lot of area and freshwater or marine water. Therefore it is important to develop recirculating aquaculture systems (RAS). RAS enables to use less water and area to produce as much as traditional fish farming does. RAS's main component is the biofilter. Biofilter is a tank that includes biofilm carriers on what nitrifying bacteria can grow.

The aim of this study was to examine how adding NO_2^- -N to biofilter, while it starts, affects the length of the starting time. It's the time that nitrifying bacteria need to carry out full nitrification process. Also, to find out if there is a difference in between new and previously used biofilm carriers. Fish farming includes water temperature changes and changes in pH. This study also examines how changes in temperature or pH of the water influence nitrification rate.

The experimental part of this study includes experiments where results of work efficiency from imitations of biofilter's were analysed. This work includes also observations of a certain RAS starting process.

The results show that adding NO_2^- -N to biofilter while it starts doesn't affect the length of the starting time. There was quite a difference between new filter media and earlier used media. Total nitrification started quicker when the biofilm carriers were previously used in RAS. Previously used biofilter media helped to manage changes in pH or temperature of the water. The observed RAS starting process results showed that total nitrification started in 43 days. Until then nitrite levels were growing and were even lethal to fish.

Tänuõnad

Autor soovib tänada inimesi, kes olid abiks antud bakalaureusetöö valmimisel:

Taavo Tenno

Anne Paaver

Christina Mürk

Kristel Kroon

Martin Liiv

Silver Kohv

Vee korduvkasutusega kalakasvanduse biofiltri nitrifitseeriva biokile aktiivsuse uuringud

Vee korduvkasutusega kalakasvatussüsteem (RAS) annab võimaluse kalakasvanduses veeressurssi mõistlikult kasutada. Vee korduvkasutusega kalakasvatussüsteemi olulisemaks osaks võib pidada biofiltrit, mis puhastab bakterite kaasabil reostunud vee. Bakterite poolt läbi viidud nitrifikatsioon on kaheosaline protsess, milles toimub ammooniumi oksüdatsioon nitritiks ja nitriti oksüdeerimine nitraadiks. Töös uuriti nitrifitseeriva biokile teket ja aktiivsust biofiltris ning prooviti leida lahendus, kuidas biofiltri käivitamisprotsessi oleks võimalik ajaliselt lühendada. Tulemustest selgub, et nitritlämmastiku lisamisel biofiltrile selle käivitumisprotsess ei lühene ja varasemalt kalakasvanduses kasutuses olnud biokilekandjatele moodustus kiiremini täielikult nitrifitseeriv biokile. Töö käigus analüüsiti konkreetse kalakasvanduse käivitumist.

Vee korduvkasutusega kalakasvatussüsteem (RAS), biofilter, nitrifikatsioon, biokilekandjad.

P305 Keskkonnakeemia

Biofilter's Nitrifying Biomass and its Activity in Recirculating Aquaculture System

Recirculating aquaculture systems (RAS) enables to use less water and area to produce as much as traditional fish farming does. RAS's main component is the biofilter where nitrifying bacteria can grow. Nitrifying bacteria plays an important role in nitrification. Nitrification is the biological oxidation ammonium to nitrite followed by the oxidation of the nitrite to nitrate. The aim of this study was to examine biofilter's nitrifying biomass and its activity in RAS while it starts. The results show that adding NO_2^- -N to biofilter while it starts doesn't affect the length of the starting time. Total nitrification started quicker when the biofilm carriers were previously used in RAS. This work includes observations of a certain RAS starting process.

Recirculating aquaculture systems (RAS), biofilter, nitrification, biofilm carriers.

P305 Environmental chemistry

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks

Mina, Helena Hallasoo,
(*autori nimi*)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Vee korduvkasutusega kalakasvanduse biofiltri nitrifitseeriva biokile aktiivsuse uuringud,

(*lõputöö pealkiri*)

Mille juhendaja on Taavo Tenno,
(*juhendaja nimi*)

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **16.05.2016**