

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
KEEMIA INSTITUUT

Markus Raudkivi

**pH MÕJU NITRITLÄMMASTIKU AKUMULATSIOONILE
MAGEDAVEELISES DENITRIFIKATSIOONISÜSTEEMIS**

Magistritöö

Juhendaja: dotsent Taavo Tenno

Tartu 2016

Sisukord

Sissejuhatus	3
I Kirjanduse ülevaade	4
1.1 Lämmastik toitainena	4
1.2 Lämmastikuärastus reoveepuhastuses	4
1.3 Denitrifikatsioon	6
1.3.1 Kineetika	6
1.3.2 Nitriti akumulatsioon	9
1.3.3 Rakendusvõimalused	11
II Eksperimentaalne osa	13
2.1 Katse üldisloomustus	13
2.2 Katse käik	13
2.2.1 Annuskatsed	13
2.2.2 Pilootkatsed	14
2.3 Metoodika	16
2.3.1 Atsetaatsüsiniku ionkromatograafiline määramine	17
2.4 Tulemused ja analüüs	19
2.4.1 Annuskatsed	19
2.4.2 Pilootkatsed	25
Kokkuvõte	33
Kasutatud kirjandus	34
Summary	37
Tänuavaldused	39
Infoleht	40
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	41

Sissejuhatus

Lämmastik on eluslooduses väga oluline toiteelement, mida vajavad peaaegu kõik elusorganismid igapäevaseks elutegevuseks. Lihtsasti kättesaadavaid lämmastikuühendeid on looduses enamasti piiratud koguses ning enamik kooslusi on sellega kohanenud. Kui keskkonda satub aga oluliselt suuremas koguses lämmastikuühendeid kui tavaliselt, võib muutuda ökosüsteemide tasakaal, mis loob tingimused näiteks vetikate vohamiseks ning pikemas perspektiivis ka veekogude kinnikasvamiseks.

Üks lämmastikuühendite potentsiaalseid allikaid on meie enda elutegevuse käigus tekkiv reovesi. Puhastatud reoveele ehk heitveele on kehtestatud ranged piirnormid nii orgaanilise aine, fosfori kui lämmastikusisalduse osas. Olmereoveepuhastis ongi põhiohk just nende ainete võimalikult efektiivsel äraostmisel. Denitrifikatsioon kui olmereoveepuhastuses väga levinud bioloogiline lämmastikuärastusprotsess on antud töö põhifookuseks. Tegemist on ülemaailmselt põhjalikult uuritud protsessiga, enamasti just olmereoveepuhastuse vaatepunktist. Teatud artiklites on täheldatud protsessi mittetäielikku kulgu (nitritlämmastiku akumulatsiooni), mida tavapärase puhasti seisukohast tuleb vältida. Enamik antud nähtusele keskenduvad artiklid on üritanud nitritlämmastiku kuhjumist hoida minimaalsena.

Viimase paarikümne aastaga on tänu mikrobioloogia ja geenitehnoloogia valdkonnas tehtud edusammudele arusaam lämmastikuringest tugevalt avardunud. Mitmed uued lähenemised bioloogilisele lämmastikuärastusele on toonud kaasa valdkonna olulise arengu. Tänu uutele teadmistele on võimalik ka nitriti akumulatsiooni denitrifikatsioonis eesmärgipõhiselt ära kasutada. Antud töö eesmärgiks on uurida nitriti akumulatsiooni tekkimist mageveelises süsteemis ning seda võimalusel võimendada. Tekkinud nitritit saaks edasi kasutada näiteks anammoks (anaeroobne ammoniumi oksüdatsioon) protsessi lähteainena. Selline kombinatsioon võimaldab puhastada tavapärasest kõrgema lämmastiku- kuid madalama süsinikkoormusega reovett.

Käesolevas töös teostati denitrifikatsiooni uuringuid nii lühiajalistes annuskatsetes kui pidevtoitelises bioreaktoris. Katsetest analüüsiti lämmastikuühendeid, atsetaatsüsinikku, pH-d, kuivainet ja temperatuuri, saadud tulemuste järgi arvutati C/N suhted.

I Kirjanduse ülevaade

1.1 Lämmastik toitainena

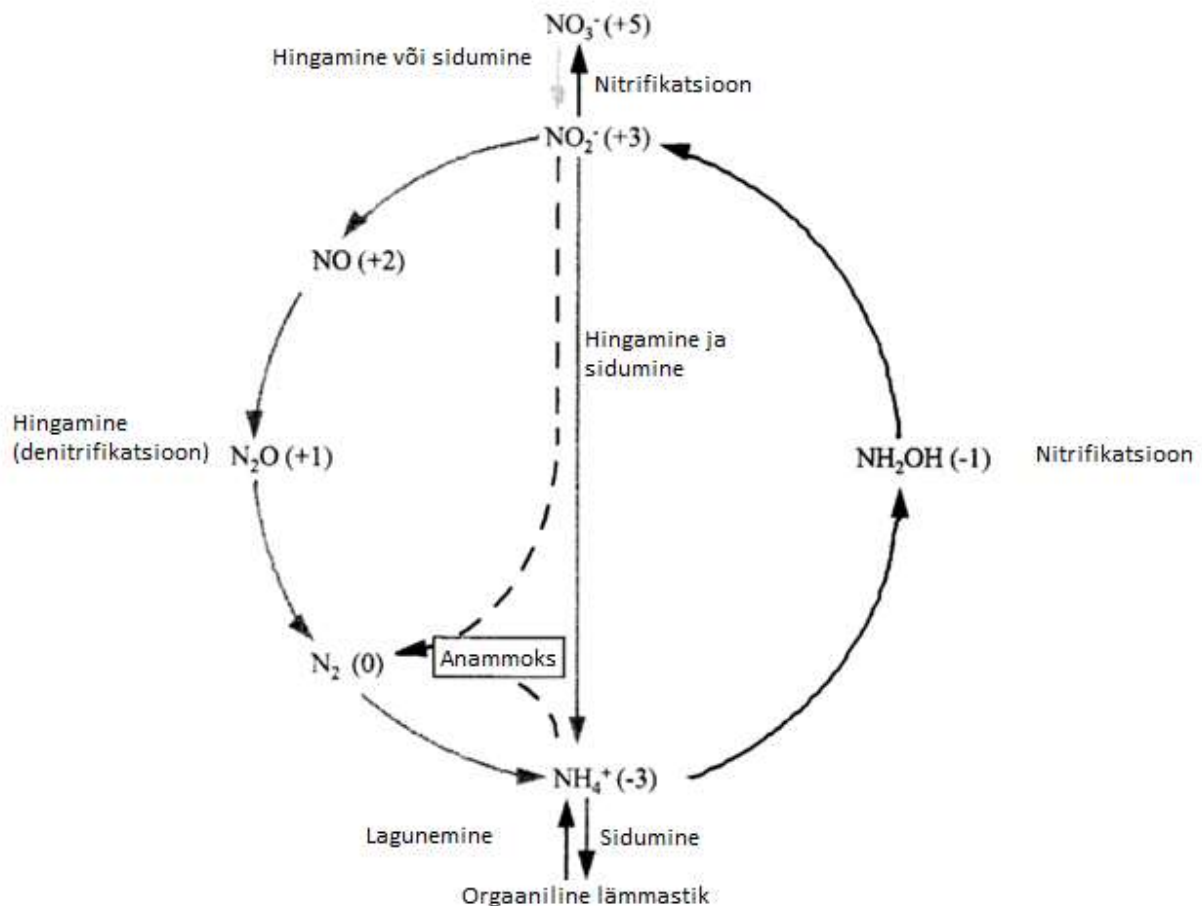
Lämmastik on orgaaniliste ühendite koosseisus väga levinud element, seetõttu ka üks tähtsamaid toitaineid. Looduses on lämmastik oluline limiteeriva toitainena (koos fosforiga), piirates mitmete autotroofsete organismide kasvu (taimed ja vetikad). Põllumajanduses kasutatakse taimekasvu parandamiseks lämmastikväetisi, mis näiteks vihmaveega looduslikesse veekogudesse jõudes muudavad oluliselt sealset ökoloogilist tasakaalu. Suurenenud lämmastikukoguseid suudavad efektiivselt ära kasutada näiteks vetikad, kattes looduslikud veekogud suvel roheline vetikakihiga. Öösiti kasutavad vetikad hingamiseks aga vees lahustunud hapnikku ning sellest põhjustatud hapnikupuudus võib tuua looduslikus koosluses kaasa olulisi muutusi. Pikemaajalise saastatuse korral võivad veekogud hakata ka kinni kasvama ehk eutrofeeruma.

Lämmastik on liikuv ühend ning võib looduslikus keskkonnas esineda viies vormis: gaasilise, orgaanilise, ammoonium-, nitrit- ja nitraatlämmastikuna (Kumar and Lin 2010). Evolutsiooniliselt on biosfääris välja kujunenud olulised protsessid, mis suudavad lämmastikku muundada ühest vormist teise. Mitmetel mikroorganismidel on võimalus oma metabolismis energia saamiseks lämmastikuühendeid redutseerijate või oksüdeerijatena kasutada. Hapnikuvaestes tingimustes on hingamiseks üks energeetiliselt efektiivsemaid meetodeid nitraadi koosseisus oleva hapniku omastamine. Looduslikult lihtsa ja levinud protsessina kasutatakse bioloogilist lämmastikuärastust ka olulise lämmastikuärastustehnoloogiana reoveepuhastuses.

1.2 Lämmastikuärastus reoveepuhastuses

Olmereovesi sisaldab keskmiselt 60 mg-N/L lämmastikku, mis tuleb reoveepuhastuse käigus veest ärastada. Reovees esineb lämmastik suuremas osas maksimaalselt redutseerunud kujul – ammooniumioonina. Enamikes tänasel päeval töötavates suuremates reoveepuhastites kasutatakse lämmastiku eemaldamiseks reoveest bioloogilisi meetodeid. Bioloogilised meetodid on füüsikaliste ja keemiliste meetodite ees eelistatud peamiselt kuluefektiivsuse poolest (Vacková *et al.* 2011).

Kõige levinumaks bioloogiliseks lämmastikuärastusprotsessiks on nitrifikatsioon-denitrifikatsioon (Wu *et al.* 2011). Lisaks on viimase paarikümne aastaga arendatud anoksilist ammooniumi oksüdatsiooni ehk anammoks-protsessi, mida hetkel kasutatakse mitmetes reoveepuhastites näiteks metaankääritist väljuva lämmastikurikka settevee puhastamiseks. Üldised bioloogilised muundumised erinevate lämmastikuvormide vahel ning neile vastavad bioloogilised protsessid on toodud Joonis 1.



Joonis 1 - Lämmastikuvormid ning omavahelisi muundumisi kirjeldavad protsessid

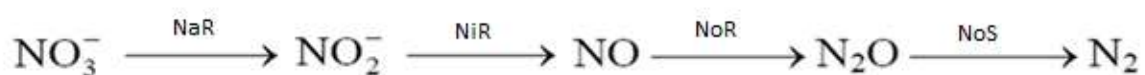
(Berks *et al.* 1995)

Efektive lämmastikuärastuse saavutamiseks on reoveepuhastitel võimalik säästa nii raha (keskkonnatasud ja -trahvid) kui keskkonda. Seetõttu uuritakse ja arendatakse lämmastikuärastusprotsesse laialdaselt nii teaduses kui praktikas. Selle töö kontekstis on põhjalikumalt neist käsitletud vaid denitrifikatsiooni, mis oli ka teostatud katsete peamiseks uurimisobjektiks.

1.3 Denitrifikatsioon

Denitrifikatsioon on anoksilistes tingimustes heterotroofsete bakterite poolt läbi viidud protsess. Denitrifikatsioonil kasutatakse oksüdeeritud lämmastikuvorme, mille redutseerimisel orgaanilise süsiniku kaasabil on võimalik saada energiat ka hapnikuvaestes tingimustes (Godden *et al.* 1991). Denitrifikatsioonivõime on väga paljudel bakteritel, osa mikroorganismide on suutelised vastavalt keskkonnatingimustele kasutama nii aeroobset hingamist (energia saamiseks kasutatakse hapnikku) kui ka denitrifikatsiooni (Lu *et al.* 2014).

Peamiselt käsitletakse denitrifitseerivate organismidena gram-negatiivseid baktereid, kuid denitrifikatsioonivõimet on täheldatud ka gram-positiivsetel bakteritel. Laia kasutuse tõttu mikroorganismide metabolismis, võib denitrifikatsiooni täpne kineetika ja seda läbiviivad ensüümid oluliselt erineda. Traditsioonilist denitrifikatsiooni võib kirjeldada etapiviisilise protsessina (Joonis 2):



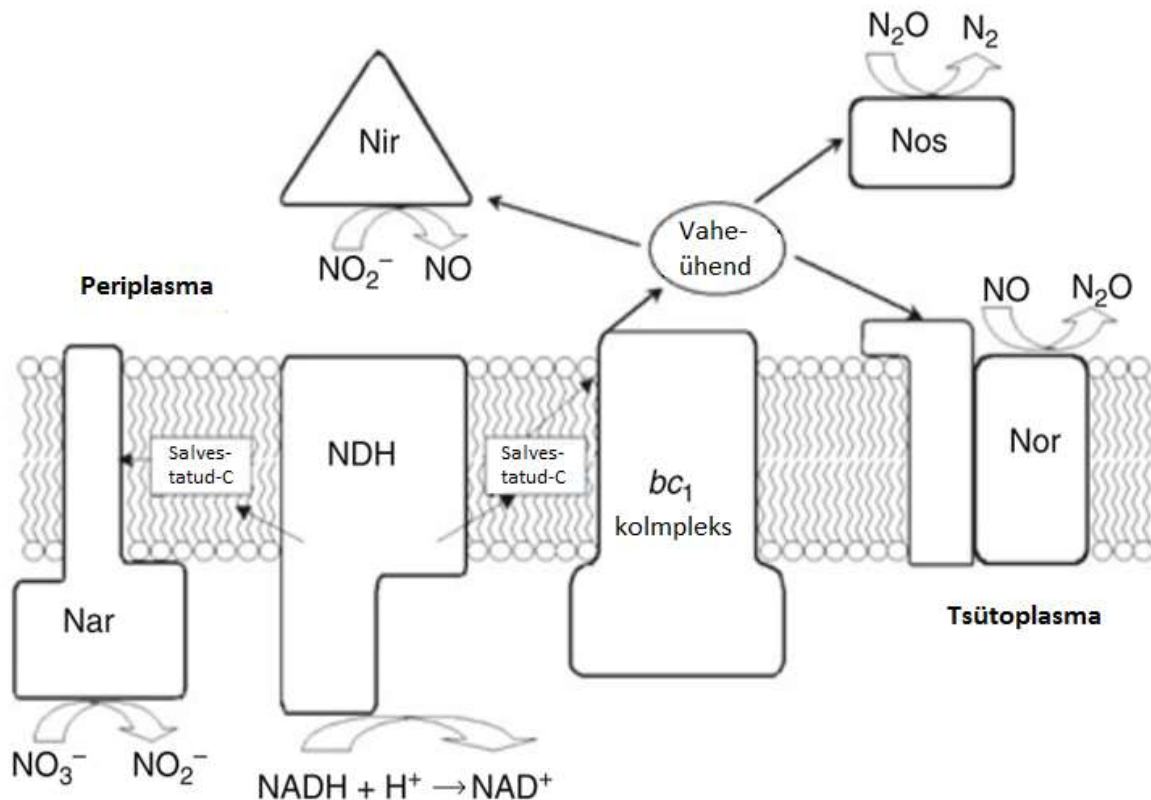
Joonis 2 - Traditsioonilist denitrifikatsiooni läbiviivad ensüümid: NaR - nitraadi reduktaas, NiR - nitriti reduktaas, NoR - lämmastikoksiidi reduktaas, NoS - dilämmastikoksiidi reduktaas (Sun *et al.* 2009)

Lõpliku denitrifikatsiooni puhul, mida enamasti ka rakenduslikult saavutada soovitakse, redutseeritakse nitraat täielikult gaasiliseks lämmastikuks (N₂). Olenevalt keskkonnatingimustest on aga täheldatud olukordi, kus denitrifikatsiooni erinevad etapid ei ole tasakaalus ja ei toimi samaaegselt. Sellises nähtuse puhul kuhjuvad lahuses vaheühendid.

1.3.1 Kineetika

Traditsioonilist denitrifikatsiooni viivad läbi neli ensüümi: nitraadi reduktaas (NaR), nitriti reduktaas (NiR), lämmastikoksiidi reduktaas (NoR) ja dilämmastikoksiidi reduktaas (NoS) (Joonis 3). Kokkuleppeliselt on denitrifitseerijad sellised bakterid, kellel esineb vähemalt 2 või 3 nimetatud ensüümidest (Chen and Strous 2013). Väga laia leviku tõttu on

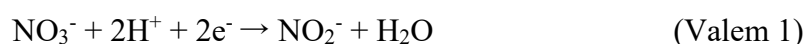
denitrifikatsioonil mitmeid erijuhte, kus spetsiifilised ensüümid suudavad kasutada lisaks lämmastikühenditele teatud etappides ka näiteks hapnikku (osaliselt aeroobne denitrifikatsioon) või metalliioone (rauda või vaske). Antud töös on pikemalt käsitletud traditsioonilist denitrifikatsioonirada, mis on bakterite seas enamlevinud (Chen and Strous 2013).



Joonis 3 - Traditsiooniline denitrifikatsiooni metabolismirada (Shapleigh 2006)

1.3.1.1 Nitraadi reduktaas

Nitraati redutseerivad ensüümid täidavad bakterites mitmeid füsioloogilisi rolle ning leiavad lisaks denitrifikatsioonile kasutust ka käärimises ja fotosünteesis (Chen and Strous 2013; Richardson *et al.* 2001). Üldist nitraadi redutseerimist kirjeldab valem 1 (Berks *et al.* 1995):



Eristatakse kolme erinevat nitraadi reduktaasi klassi: NAS, NAP ja NAR. NAS on tsütoplasmas asuv lämmastikku assimileeriv (NO_3^- viiakse NH_4^+ kujule) ensüüm, peamiselt tuvastatud fotosünteesivatest tsüanobakteritest (Richardson *et al.* 2001). NAP asub periplasmas ning võib

osa võtta nii denitrifikatsioonist kui fermentatsioonist, tsütoplasmas asuv NAR on spetsiifiline denitrifikatsioonile. NAR on hapnikuvaestes tingimustes energeetiliselt efektiivsem ning denitrifitseerivate bakterite puhul enim kirjeldatud. Samas on täheldatud, et nitraadivaestes tingimustes avaldub eelistatumalt NAP ja süsinikuvaesetes tingimustes NAR (Richardson *et al.* 2001). NAR-i ja sellega seotud kompleksi töö käigus kasutatakse elektronpaari kohta 2 prootonit nitraadi redutseerimisel ning lisaks transporditakse 6 prootonit periplasmasse (Chen and Strous 2013).

1.3.1.2 Nitriti reduktaas

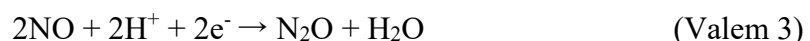
Nitriti reduktaas on spetsiifiline denitrifikatsiooni ensüüm, mis redutseerib nitritist lämmastikoksiidi. Nitriti redutseerimist kirjeldab valem 2 (Berks *et al.* 1995):



Ka nitriti reduktaasil on kaks erinevat vormi, kuid erinevalt nitraadi reduktaasi vormidest, erinevad need üksteisest ainult ehituslikult, täites rakkudes samasugust eesmärki (Shapleigh 2006). Üks nitriti reduktaasidest kasutab protsessi käigus vaheühendina vaske, teine rauda (Godden *et al.* 1991). Sama liigi bakteritel on tähendatud mõlemat ensüümivormi olemasolu, kuid milline neist üksikisenditel välja kujuneb, ei ole selge (Shapleigh 2006). *A. Cylolastes* bakteriga teostatud täpsema uuringus käigus leiti, et NIR pH optimumiks antud bakteri puhul on 6.2 (Godden *et al.* 1991).

1.3.1.3 Lämmastikoksiidi reduktaas

Lämmastikoksiidi reduktaas on rakumembraani sees asuv kahest osast koosnev kompleks, mis suudab kahest lämmastikoksiidist redutseerida dilämmastikoksiidi (Valem 3) (Watmough *et al.* 2009):



Kompleksi esimene osa NorB võtab vastu periplasmast elektroni ning transpordib selle kompleksi teise ossa (NorC). NorC ensüüm on suure rauasisaldusega (koosneb nii heemsest kui metallilisest rauast), mis võtab aktiivtsentrites vastu kaks lämmastikoksiidi molekuli, lõhub mõlemas N-O sideme ja tekitab asemele N-N sideme (Shapleigh 2006). Vajalikud prootonid

saadakse periplasmast (Hino *et al.* 2012). Mõnedes mikroorganismides on olemas ka ensüümi erijuht NorZ, mis koosneb ainult ühest osast, kasutades membraanis talletatud energiat (Chen and Strous 2013). Kuna lämmastikoksiidi kasutatakse antibakteriaalse ühendina, leiab NorZ kasutust ka mitmetes patogeenides, kes rakendavad ensüümi enda kaitseks (Hino *et al.* 2012; Watmough *et al.* 2009).

1.3.1.4 Dilämmastikoksiidi reduktaas

Dilämmastikoksiidi (Nos) reduktaas on periplasmas asuv homodimeer. Nos koosneb kahest aktiivtsentrist (vask), millest üks võtab periplasmast vastu elektroni (tsütokroom c) ning teine viib läbi dilämmastikoksiidi redutseerimist (Chen and Strous 2013). Reaktsiooni kirjeldab valem 4 (Berks *et al.* 1995):



Dilämmastikoksiidi reduktaasi on leitud lisaks denitriifitseerijatele ka muudes organismides, kes suudavad dilämmastikoksiidi kasutada ainsa oksüdeerijana (Shapleigh 2006). Kuna N_2O on üks tähtsamaid kasvuhoonegaase, tuleb selle püsivaks redutseerimiseks tagada keskkonnas piisav vasekontsentratsioon (Shapleigh 2006).

1.3.2 Nitriti akumulatsioon

Nitriti ehk ühe denitriifikatsiooni vaheühendi kuhjumist on senini põhiliselt uuritud reovee denitriifikatsioonil tekkiva probleemina. Vaheühendite kuhjumine tähendab enamasti, et denitriifikatsioon ei ole täies ulatuses lõpuni toimunud. Teatud mikroorganismid on võimelised läbi viima aga vaid üksikuid lämmastikühendite redutseerimisetappe. On võimalik, et kui nitraati redutseerivate mikroorganismide arvukus on suurem, kui nitriti redutseerijatel, tarbitakse rohkem nitraati kui nitritit.

Praktikas on nitriti akumulatsiooni täheldatud peamiselt süsinikupuuduse või bioreaktorite ülekoormusel (Fernández-Nava *et al.* 2008). Seni teostatud uuringud näitavad, et nitritit kuhjub enamasti madalates kontsentratsioonides ning lühiajaliselt. Tehnoloogilise protsessina nitriti kuhjamist tänaseks rakendatud ei ole. Nitriti akumulatsiooni esilekutsuvate tingimustena on peamiselt uuritud C/N suhet, erinevate süsinikuallikate mõju, soolsust ning pH-d.

1.3.2.1 C/N suhte mõju

Süsiniku ja lämmastiku suhe on seniste tööde põhjal üks olulisi tegureid, mis mõjutab akumulatset nitriti kogust. Samas ei mõjuta C/N suhe oluliselt nitriti ja nitraadi redutseerimiskiiruseid. Sun et al., 2009 saavutas sama nitraadi ja nitriti redutseerimiskiiruse (35 ja 15 mg N * l⁻¹ * h⁻¹) nii C/N suhte 2,25:1 kui 12:1 korral. Oluline mõju esineb aga olukorras, kus nitraat on lahuses peaaegu otsas. Sellisel juhul jätkatakse süsiniku ülejäägi puhul senini akumulatset nitriti redutseerimist. Kõrgemate C/N suhete korral redutseeritakse nitrit lõpuni. Väljavoolu jääb nitrit ainult siis, kui süsinik saab nitraadi redutseerimise käigus otsa. Shen et al., 2009 saavutasid C/N suhetel 1,25, 1,45 ja 1,56 vastavalt 950, 50 ja 4 mg * l⁻¹ akumulatset nitritit. Täpne nitraadi redutseerimiseks kulumine süsiniku kontsentratsioon, on aga süsinikudonorist, täielik nitraadi ja nitriti redutseerimine võib varieeruda C/N suhtest 1,6 kuni 3,75 (Jafari et al. 2015; Shen et al. 2009; Sun et al. 2009).

1.3.2.2 Süsinikuallika mõju

Ka konkreetne süsinikuallikas, mida protsessis kasutatakse, võib mõjutada nitriti akumulatsiooni. Sun et al., 2009 viis läbi katse C/N suhtel 6:1 (16 °C, pH 8,3) viie erineva orgaanilist süsinikku sisaldava ühendiga (metanool, etanool, naatriumatsetaat, naatriumpropionaat ja glükoos). Kõige kiirem nitriti akumulatsioon saavutati etanooliga (16 mg NO₂⁻-N * h⁻¹ * l⁻¹, maksimum 32 mg * l⁻¹), kõige kõrgem akumulatsioon aga naatriumatsetaadiga (10 mg NO₂⁻-N * h⁻¹ * l⁻¹, maksimum 40 mg * l⁻¹). Kõigi katsete puhul oli süsinikku liias, seega püüvat nitriti akumulatsiooni ei saavutatud. Glükoosiga sooritatud katsetes nitraadi redutseerimist 10 tunni jooksul ei täheldatud. Samas Ge et al., 2012 katsetes 28 ± 2 °C (pH 7,5) juures saavutati kõrgeim nitriti akumulatsioon glükoosiga (14,5 mg * l⁻¹), keskmine metanooliga (10,8 mg * l⁻¹) ja madalaim naatriumatsetaadiga (8,4 mg * l⁻¹). Konkreetse süsinikuallika mõju võib seega suuresti erineda, olenedes näiteks väljakujunenud biomassi tüübist ja täpsematest mikroorganismide tüvedest.

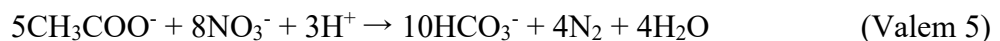
1.3.2.3 Soolsuse mõju

Denitritifitseerivate mikroorganismide koostis sõltub oluliselt lahuse soolsusest. Kõrgema soolsusega lahuses on eelistatud halofiilsemad mikroorganismid, näiteks mitmed denitritifikatsiooni läbiviivad arhed (*Haloferax denitrificans* (Shapleigh 2006)). Tavapärastele

denitritseerijatele võib kõrge soolsus tekitada stressi ning vähendada nende aktiivsust, tekitades lisaks nitritile ka N₂O akumulatsiooni (Zhao *et al.* 2013). Pikemalt kõrge soolsusega (pärast paari päeva kuni 20 g * l⁻¹) opereeritud katsetes aga kummagi ühendi akumulatsiooni ei täheldatud (Jafari *et al.* 2015). See tähendab, et pikemaajalises katses võivad mikroorganismid kõrgema soolsusega kohaneda ning olulist mõju nitriti akumulatsioonile ei esine (Zhao *et al.* 2013; Jafari *et al.* 2015).

1.3.2.4 pH mõju

pH on denitrifikatsiooni üks olulisemaid parameetreid, mille optimum enamike mikroorganismide jaoks on 7-8 (Wang *et al.* 1995). Samas on täheldatud, et denitrifikatsiooni kiirus ei sõltu pH-st vahemikus 7,5 - 9,5 (Glass and Silverstein 1998). Madalama soolsusega ja puhvrita süsteemides pH denitrifikatsiooni käigus tõuseb. Valem 5 kirjeldab prootonite tarbimist täieliku denitrifikatsiooni korral, kus süsinikuallikana on kasutatud atsetaatiooni (Glass and Silverstein 1998):



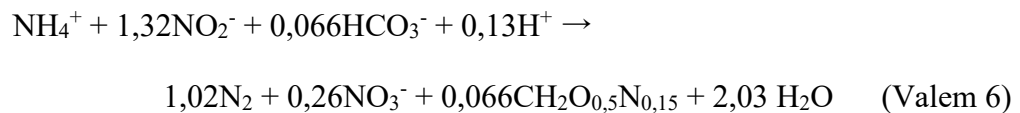
Hoolimata otsese mõju puudumisest denitrifikatsiooni kiirusele, on kõrgematel pH väärtustel saavutatud kõrgemaid akumulatsioonivahemikke nitriti kontsentratsioonideks. Kõrgema soolsusega vees (ligikaudu 20 g * l⁻¹) sooritatud katses saavutasid Glass ja Silverstein, 1998 pH väärtustel 7,5, 8,5 ja 9,0 nitriti akumulatsioonikiirused vastavalt 19, 24 ja 44 mg NO₂⁻-N/(g*MLSS*h). Võttes arvesse, et näiteks *Achromobacter cycloclastes* puhul on nitriti reduktaasi (Nir) optimaalseks pH-ks mõõdetud 6,2 (Godden *et al.* 1991) võib suurenev akumulatsioon toimuda just Nir-i aktiivsuse vähenemise tõttu.

1.3.3 Rakendusvõimalused

Nitriti akumulatsiooni denitrifikatsioonil on siiani vaadeldud peamiselt ebasoodsa nähtusena, mida tuleks korralikult töötava denitrifikatsiooniprotsessi puhul vältida (Fernández-Nava *et al.* 2008). Teiste lämmastikuärastusprotsessidega kombineeritult võimaldab osaline denitrifikatsioon välja arendada uusi tehnoloogilisi lahendusi. Osalise denitrifikatsiooni käigus kulutatakse ligikaudu 50% vähem orgaanilist süsinikku, seega madalama orgaanilise aine sisaldusega reovee puhul puuduks vajadus lisada reoveepuhastusel välist süsinikuallikat (Luo

et al. 2014). Tekkinud nitrit võib olla tavapärasel reoveepuhastis bakteritele toksiline, kuid kombinatsioonis anammoks-protsessiga tekib võimalus see lähteainena ära kasutada.

Anammoks-protsess (anaeroobne ammooniumi oksüdatsioon) on eelmise sajandi lõpus avastatud lämmastikuärastuse protsess, milles kasutatakse ammooniumi oksüdeerimiseks elektronaktseptorina nitritiooni (Hu *et al.* 2014). Anammoks-protsess on väiksema aeratsioonienergia tarbe ja madalamate opereerimiskulude (tekib vähem liigmuda) tõttu tavapärasele nitrifikatsioon-denitrifikatsioon protsessile heaks alternatiiviks (Ahn 2006; Wang *et al.* 2010). Protsessi viivad läbi litoautotroofid, kes kasutavad orgaanilise süsiniku asemel karbonaatset süsinikku (HCO_3^-) (Ahn 2006). Protsessi stöhhiomeetria, taandatult ühe mooli kulutatud ammooniumiooni kohta on toodud valemis 6 (van der Star *et al.* 2007).



Ligikaudu 10% lämmastikust oksüdeeritakse anammoks-protsessi käigus nitraatiooniks, mida oleks denitrifikatsiooni käigus võimalik kasutada. Seega võimaldaks nitriti akumulatsioon saada ühte anammoks-protsessi lähteainetest (Kumar and Lin 2010). Lisaks tarbitakse denitrifikatsiooni käigus orgaaniliste süsinik (tekib surnud baktermassi lagunemisel), mis võib kõrgemates kontsentratsioonides olla anammoks-protsessile inhibeeriv (You *et al.* 2009). Osalist nitrifikatsiooni (nitritatsiooni), anammoksi ja osalist denitrifikatsiooni kombineerides oleks võimalik saavutada 99% lämmastikuärastus olenemata lämmastiku kontsentratsioonist reovees (Lan *et al.* 2011).

II Eksperimentaalne osa

2.1 Katse üldiseloostus

Annus- ja pilootkatseid teostati perioodil 08.10.2014 - 20.04.2016. Annuskatsetes uuriti nitriti akumulatsiooni lühiajaliselt, ühe katse pikkuseks oli keskmiselt 6 tundi. Pilootkatsetes uuriti antud efekti pikemaajaliselt (poolteist kuud). Mõlemate katsete tulemused on esitatud alapeatükis 2.4.

Mõlema katsetüübi puhul kasutati nitraadiallikana KNO_3 (kaaliumnitraati) või NaNO_3 (naatriumnitraati), süsinikuallikana CH_3COONa (naatriumatsetaati). Atsetaati kasutati nii veevaba kui hüdraatunud soolana ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). Reaktorkatsetes lisati sissevoolu ka lisatoitaineid, et baktermassi pikemaajaliselt elujõulisena hoida (koostis peatükis 2.2.2). pH reguleerimiseks kasutati vajadusel 1,5M NaOH-d.

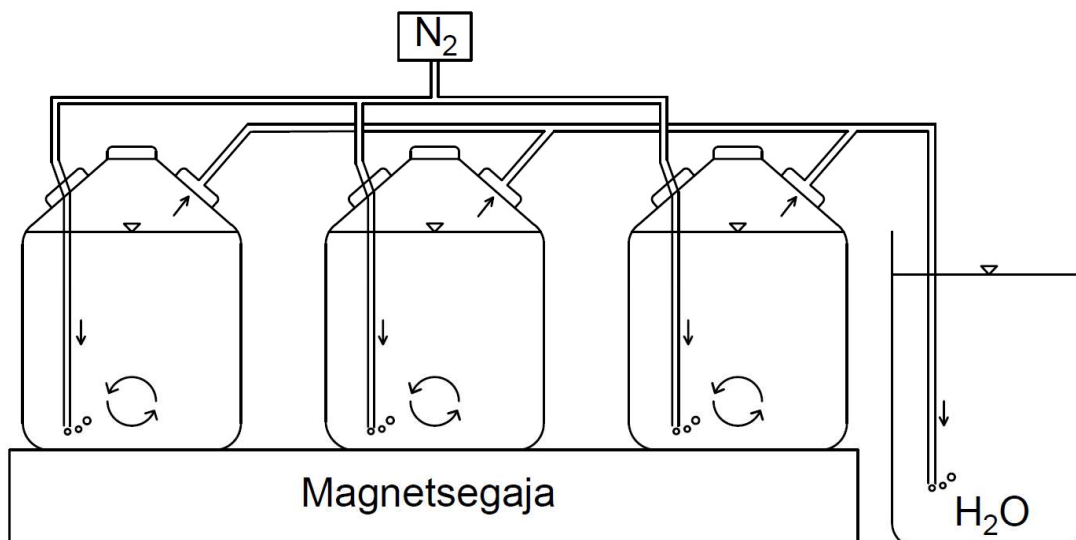
2.2 Katse käik

2.2.1 Annuskatsed

Lühiajalisi katseid teostati kümme korda, iga katse kolmes paralleelses 1-liitrisel annuspudelil (Joonis 4). Anoksiliste tingimuste loomiseks deaereeriti katsepudeleid terve katse jooksul gaasilise lämmastikuga. Katsed toimusid toatemperatuuril ($21,9 \pm 0,7 \text{ }^\circ\text{C}$). Kasutati ühte viie kaelaga ja kahte kolme kaelaga pudelit, viie kaelaga pudelisse oli lisatud katse paremaks kontrollimiseks pH ja temperatuuri andurid. Katsed kestsid 4 - 6 tundi. Katsepudelitest võeti proovi lämmastikuga ülerõhu tekitamise teel. Katsepudelites toimus pidev segamine magnetsegajaga.

Enne annuskatse algust lisati katsepudelitesse:

- 300 ml (3x läbipestud) Tartu reoveepuhasti aktiivmuda;
- 92,5 ml 2 g/l $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ lahust;
- 40 ml 1 g/l KNO_3 lahust;
- lisati destilleeritud vett 1 liitrisel ruumala saavutamiseni.



Joonis 4 - Annuskatse tehniline ülesehitus

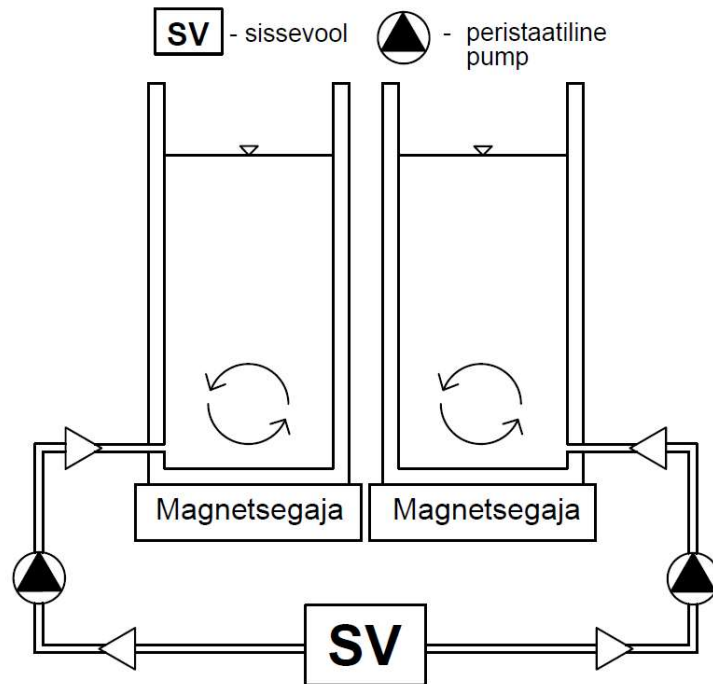
Pärast muda lisamist ning enne reagentide lisamist deaereeriti pudeleid 15 minutit gaasilise lämmastikuga. Pärast reagentide lisamist võeti nullproov ning edasised proovid iga tunni aja tagant. Aktiivmuda suspensiooni (MLSS) proovid võeti pärast aktiivmuda läbipesu, kuid enne katsepudelitesse lisamist. Katsete keskmiseks MLSS-i väärtuseks oli $2,1 \pm 0,6$ g/l. Mõõdetud C/N suhe oli katsetes $2,19 \pm 0,24$. Teostatud annuskatsed jagunevad kahte seeriasse, mis erinesid üksteisest vaid pH kontrolli (1,5M NaOH lisamise) poolest:

1. Baaskatsed (6 katset) - katsete pH-d ei reguleeritud
2. Kõrge pH katsed (4 katset) - katse käigus lisati 1,5M NaOH lahust

2.2.2 Pilootkatsed

Reaktorkatseid teostati 48 päeva pikkusel perioodil, kahes paralleelses reaktoris (Joonis 5). Kasutati 10 l ruumalaga pleksiklaasist ümmarguse põhiplaaniga reaktoreid. Reaktoreid opereeriti toatemperatuuril ($20,5 \pm 1$ °C), segunemine reaktorites saavutati magnetsegajatega. Käivitamisel lisati reaktoritesse:

- 1,5 l Tartu reoveepuhasti aktiivmuda (3x läbipestud);
- 460 ml 2 g/l $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ lahust;
- 200 ml 1 g/l KNO_3 lahust;
- Lisati destilleeritud vett 5-liitrise ruumala saavutamiseni.



Joonis 5 - Pilootreaktorite tehniline ülesehitus

Opereerimisel kasutati annusreaktorite põhimõtet: iga 4 tunni tagant said reaktorid toidet, reaktorite tühjendamine toimus aga keskmiselt 5 - 6 päeva tagant (tagasi 5 liitrit). Tühjendamisele eelnes settimisperiood 30 minutit, et vähendada tühjendamise käigus biomassi väljakannet. Iga tühjendamise järel mõõdeti reaktoritest MLSS. Reaktorite ruumala oli muutuv, jäädes vahemikku 5-10 liitrit. Reaktorid olid pealt avatud (kaaneta), mis on anoksiliste mahutite puhul praktikas tavaline. Proove võeti reaktoritest iga paari päeva tagant, alustusperioodil ka lühiajaliselt iga tunni tagant.

Reaktorite sissevoolu lisati katse jooksul erinevas suhtes (C/N suhe 1,5 - 2,0) KNO_3 ja $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (või periooditi asendusena NaNO_3 ja hüdraadivaba CH_3COONa). Sissevoolu lisati alati 1 ml/l kohta kõiki alljärgnevaid toitelahuseid (bioloogilise hapnikutarbe toitelahused), et tagada bakteritele pikemaajaliseks ellujäämiseks vajalikud toiteained:

- fosfaatpuhver 29,5 g $\text{PO}_4^{3-}/\text{l}$;
- 22,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 27,5 g/l CaCl_2 ;
- 0,25 g/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
- happeline mikroelementide lahus (Zhang *et al.* 2009);
- aluseline mikroelementide lahus (Zhang *et al.* 2009).

Esimest korda toimus reaktorite toide pärast käivitamist katse 12. tunnil, edaspidi iga kuue tunni tagant 18., 24., 30, 36., 42. ja 48. tunnil. Alates 48. tunnist muudeti toide tihedamalt ning katse lõpuni toimus toide iga 4 tunni tagant. Toiteperioodi pikkus oli 15 minutit, mille jooksul said mõlemad reaktorid ligikaudu 150 ml toitevett. Piloitseadmetel puudus väljavool - reaktoreid tühjendati keskmiselt iga viie päeva tagant, katseperioodi jooksul kokku 9 korda.

2.3 Metoodika

Nitriti akumulatsiooni hindamiseks võetud proovid kõigepealt tsentrifuugiti kiirusel 3000 pöört minutis. Proovidest mõõdeti lämmastikvormide kontsentratsioonid (mg NO₃⁻-N/l, mg NO₂⁻-N/l ja mg NH₄⁺-N/l), atsetaatsüsiniku kontsentratsioon (mg CH₃COO⁻-C/l), aktiivmuda suspensiooni kontsentratsioon (g MLSS/l) ja pH (Tabel 1). Atsetaatsüsiniku kiiremaks ja odavamaks määramiseks töötati katsete käigus välja meetod atsetaatsüsiniku ionkromatograafiliseks määramiseks, kasutades referentsina (kalibratsioon) Hach Lange küvett-testi LCK 380. Kasutatud referents on toodud peatükis 2.3.1.

Proove analüüsiti Tartu Ülikooli Katsekoja Keskkonnaanalüüsi laboris. Analüüsitulemuste töötlemiseks kasutati programme MS Excel, AutoCAD ja OriginLab.

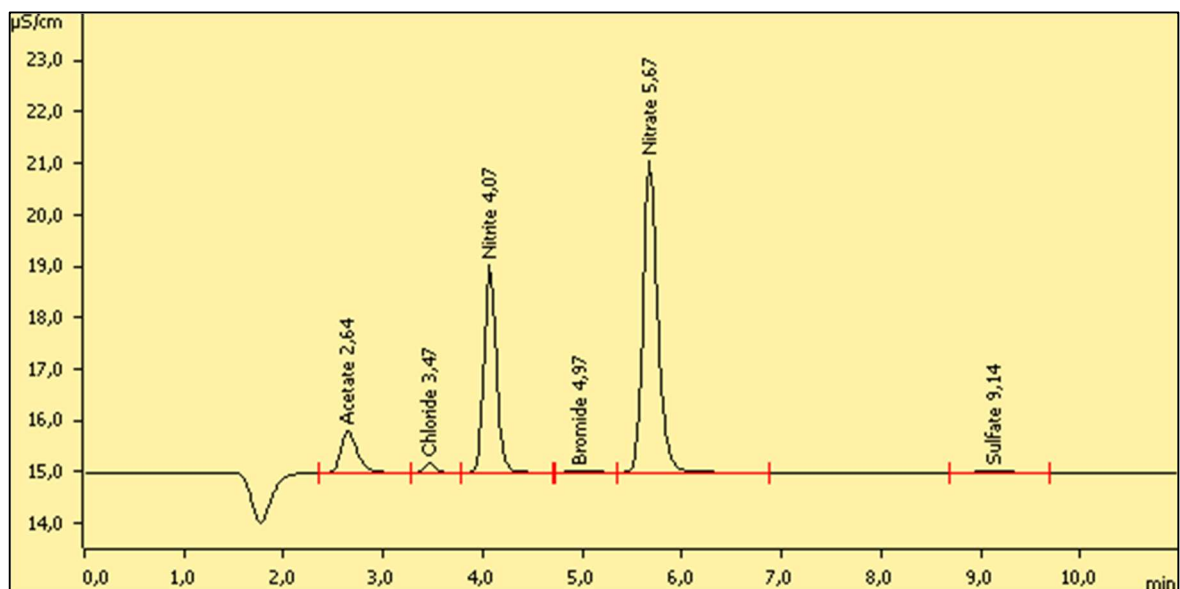
Tabel 1 - Kasutatud analüüsimetoodikad ja aparatuur

Mõõdetud parameeter	Meetod	Aparatuur
NO ₃ ⁻ -N NO ₂ ⁻ -N CH ₃ COO ⁻ -C	Ionkromatograafilise määramine	Ionkromatograaf: Metrohm 930 Compact IC Flex; kolonn: METROSEP A Supp 5 100/0,4; elluent: 3,2 mM Na ₂ CO ₃ ja 1,0 mM NaHCO ₃ ;
CH ₃ COO ⁻ -C	Hach Lange küvett LCK 380 (diferentsiaalmeetod, persulfaatne lagundamine)	Spektrofotomeeter: Hach Lange DR 2800; termostaat: Hach Lange LT 200
NH ₄ ⁺ -N	USEPA 8038 - Nessleri meetod	Spektrofotomeeter: Hach Lange DR 2800

Aktiivmuda-suspensiooni kontsentratsioon (MLSS)	Gravimeetriline määramine	Kaal: Scaltech SBC 31; kuivatuskapp: SNOL 67/350, Leedu.
pH	Potentsiomeetriline määramine	pH meeter: Jenway 3520

2.3.1 Atsetaatsüsiniku ionkromatograafiline määramine

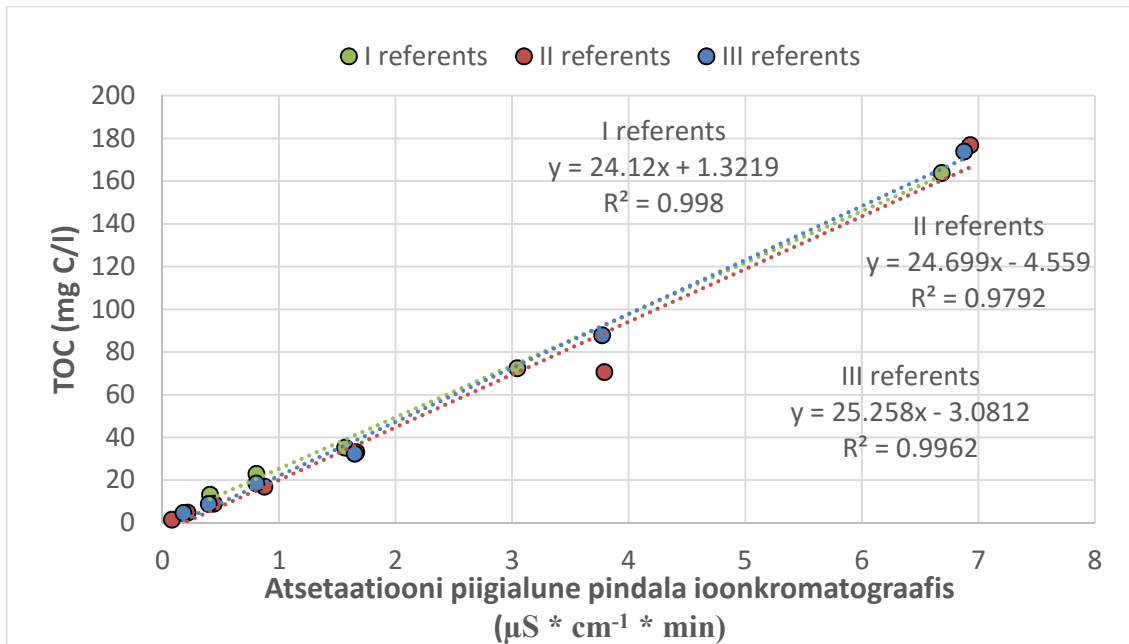
Atsetaatsüsiniku odavamaks ja kiiremaks määramiseks töötati magistritöös välja meetod selle ionkromatograafiliseks määramiseks. Varasemate katsete käigus on täheldatud, et anioonide määramiseks kasutatava meetodi käigus tekib atsetaati sisaldava lahuse puhul kromatogrammile lisapiik (Joonis 6). Kontakteerudes Metrohm-i põhjamaade müügiesindajaga, saadi kinnitust, et antud meetodiga on võimalik atsetaatiooni lahusest eraldada.



Joonis 6 - Atsetaadi piik kromatogrammil A supp 5 100/0,4 kolonniga

Kuna kromatograafilise meetodi kalibreerimiseks kasutatud standardlahus (Thermo Scientific Dionex Secen Anion Standard II) ei sisalda atsetaatiooni, tuli kontsentratsiooni mõõtmiseks vajalik kalibratsioonigraafik teha teiste vahenditega. Kalibreerimiseks kasutati 2 g CH₃COO⁻/l lahusest valmistatud proove, mida määrati korraka nii ionkromatograafia kui TOC määramiseks mõeldud Hach Lange küvettidega LCK 380. Küvettidega mõõdetud

konsentratsiooni suhestamisel kromatogrammilt saadud piigi pindalasse saadi kalibratsioonikõver. Kalibreerimist teostati kokku 3 korda, saadud kalibratsioonikõverad on toodud Joonis 7.



Joonis 7 - Atsetaadi ionkromatograafilise määramise kalibratsioonigraafikud Hach Lange LCK 380 küvetiga.

Kõik saadud kalibratsioonikõverad on väga tugeva ühilduvusega, millest võib välja lugeda, et atsetaadi ionkromatograafiline määramine on kasutuskõlblik ja kõrge täpsusega meetod. Kalibratsioonid on teostatud keskmiselt poole aasta tagant (seoses ionkromatograafi üldise kalibreerimisega) ning proovide atsetaatsüsiniku kontsentratsiooni arvutamisel on kasutatud ajaliselt kõige lähema kalibratsiooni sirge võrrandit. Tulemused näitavad, et antud meetod on sobilik sagedaseks atsetaatsüsiniku määramiseks. Samas on meetodit võimalik kasutada ainult juhul, kui proovi lisatakse ainsa süsinikallikana atsetaati, näiteks inhibitsioonitestide ja mudelkatsete puhul. Teistest allikatest pärit orgaanilise süsiniku määramiseks antud meetod ei sobi, kuna kasutatud on ionkromatograafi määratud spetsiifilist atsetaatiooni piiki. Kasutatav ionkromatograafiline meetod on võimeline eraldama ka üksikuid muid süsinikku sisaldavaid anioone, kuid nende täpsemaks mõõtmiseks on vaja teostada uus spetsiifiline kalibratsiooni.

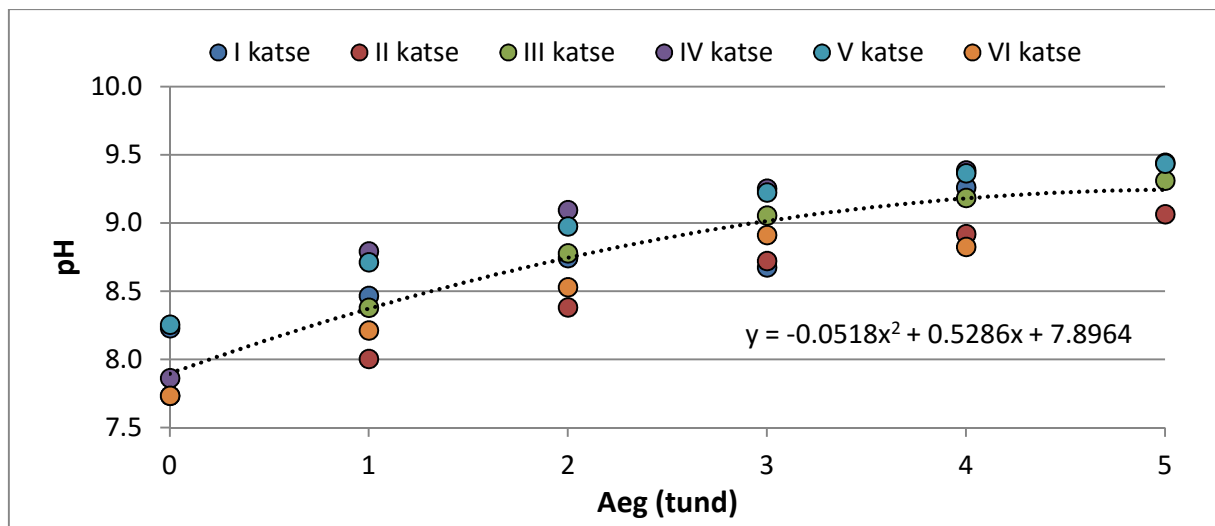
2.4 Tulemused ja analüüs

2.4.1 Annuskatsed

Annuskatsete tulemused ja nende analüüs on esitatud kolmes osas. Esimeses ja teises osas on vaadeldud pH muutust erinevate katsete jooksul. Kolmandas osas on toodud summaarsed tulemused ning katsete käigus välja tulnud üldised seosed. Kõigil summaarsetel graafikutel on kasutatud keskmistatud pH väärtusi - pH tugeva muutumise tõttu kasutatakse katsetunni iseloomustamiseks tunni alguses ja tunni lõpus mõõdetud väärtuse keskmist. Antud väärtuse kasutamine tagab tugevamad seosed pH ja teiste parameetrite vahel ning aitab paremini aru saada toimuvate protsesside iseloomust.

2.4.1.1 Baaskatsed

Baaskatseid sooritati kokku 6 korda, igaüks neist kolmes iseseisvas katsepudelis. Baaskatsete käigus ei lisatud pH-d puhverdavaid või muutvaid lahuseid. pH muutumist baaskatsete käigus kirjeldab joonis D1. Katsete alg-pH oli $7,9 \pm 0,3$ ning pH tõusis kõigis katsetes. Kõrgematel pH väärtustel tõus aeglustub, selle kirjeldamiseks saab kasutada Joonis 8 toodud valemit.

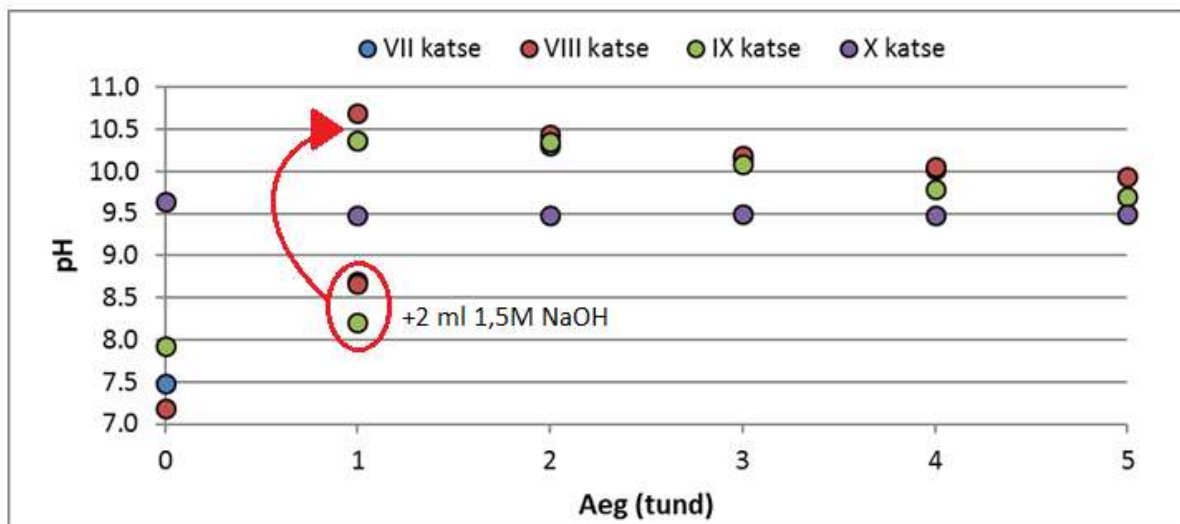


Joonis 8 - Baaskatsete pH muutumine katsetundide jooksul

pH tõus katses on seletatav prootonite tarbimisega denitrifikatsiooni käigus. Baaskatsete tulemustest lähtuvalt toimub pH iseeneslik tõus optimumini 9,5. Kõrgemate pH väärtuste saavutamiseks sooritati 4 katset, kus katse käigus doseeriti juurde leelist.

2.4.1.2 Kõrge pH katsed

Kõrge pH katseid sooritati kokku 4 korda, igäüks neist kolmes iseseisvas katsepudelis. VII - IX katses doseeriti teisel katsetunnil 2 ml 1,5 M NaOH lahust, X katses kohe katse alguses 1 ml 1,5 M NaOH lahust. Saavutatud pH tulemused ja nende ajaline muutumine on esitatud Joonis 9. VII-IX katse nullproov ja esimene tund on sarnased baaskatsetes toodud tulemustega, pärast leelise lisamist toimus aga pH märgatav hüpe väärtuseni $10,5 \pm 0,2$.

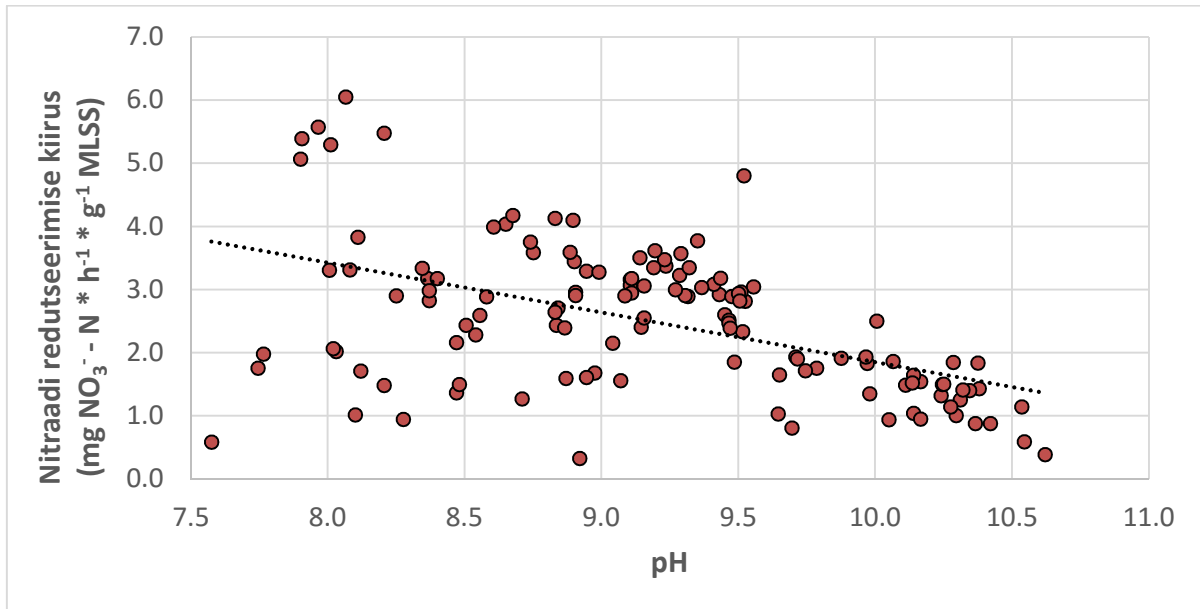


Joonis 9 - Kõrge pH katsete pH muutumine katsetundide jooksul

Kõrge pH katsetes selgus, et väga kõrgete pH väärtuste korral hakkab pH optimumini (9,5) langema. Selle põhjuseks võib olla nitriti reduktaasi töö peatumine, mille tulemusena prootonite tarbimine väheneb. Prootoneid tekib juurde nitraadi reduktaasi töö käigus, kus iga kasutatud elektronpaari kohta transporditakse periplasmasse 6 prootonit (Chen and Strous 2013). pH lähenedes optimumile hakkab nitriti reduktaas järk-järgult tööle ning prootonite tarbimine taastub. Viimases katses lisati leelist katse alguses ning saavutatud optimaalne pH edasistel tundidel enam oluliselt ei muutunud (pH väärtus terve katse jooksul oli $9,51 \pm 0,07$). Sellest võib järeldada, et pH 9,5 juures muutub protsess stabiilseks ning tarbitavad ja toodetavad prootonid on omavahel tasakaalus.

2.4.1.3 Summaarsed tulemused

Olulisemate seoste analüüsimisel kasutati kõigi 10 annuskatse tulemusi summaarselt, kus erinevate parameetrite muutumisi suhestati pH väärtustesse. Kõigi parameetriliste seoste vahel on arvatud korrelatsioon ja p-väärtus.

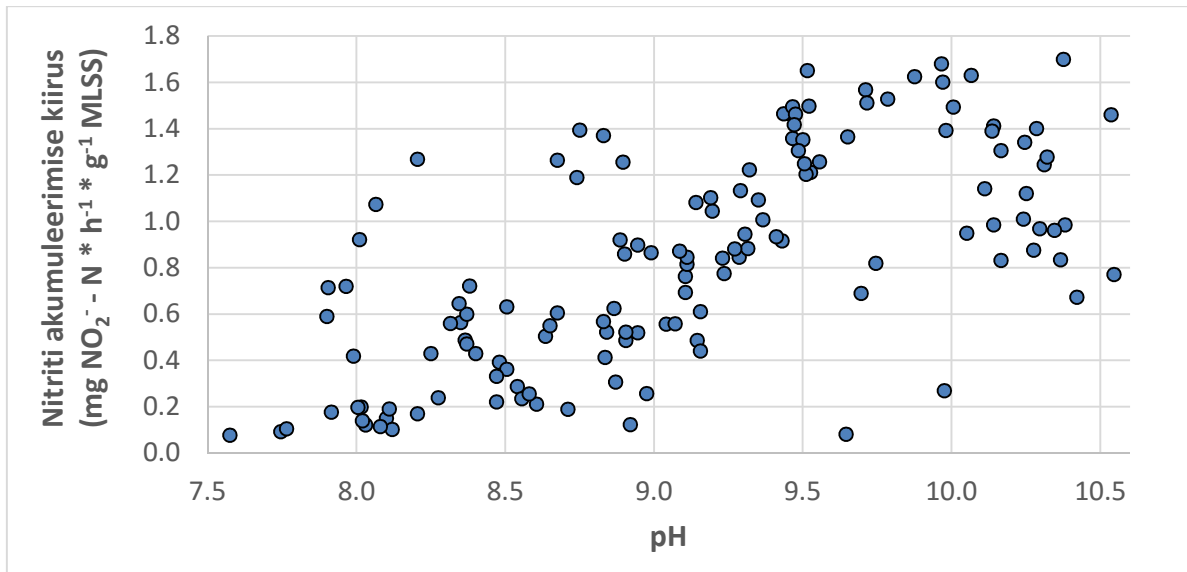


Joonis 10 - Nitraatlämmastiku redutseerimise kiirused aktiivmuda suspensiooni kohta erinevatel pH väärtustel

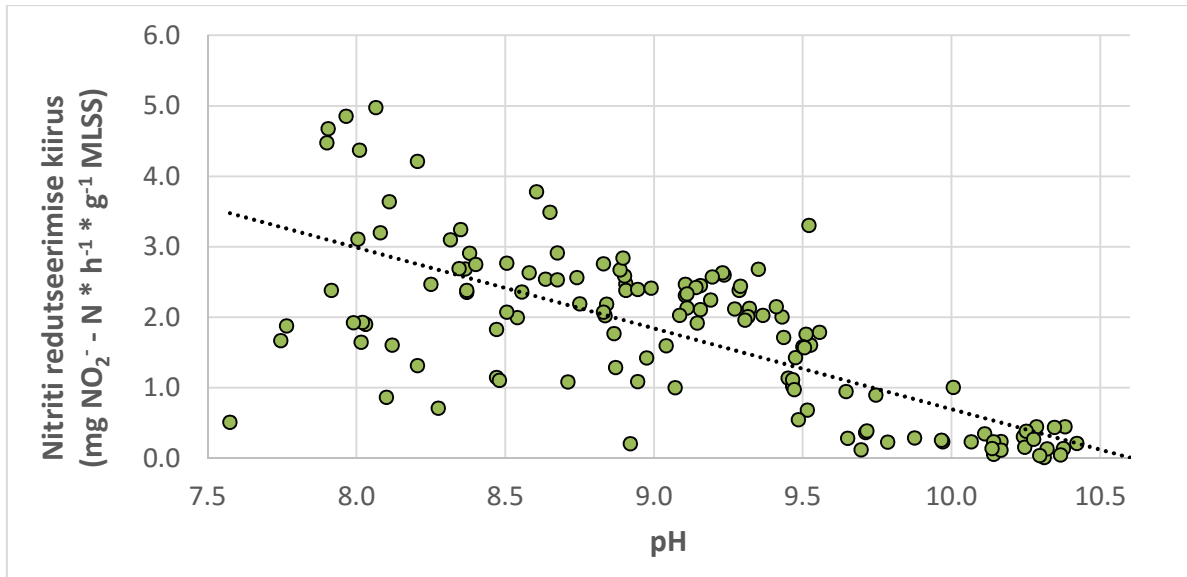
Joonis 10 on toodud nitraadi redutseerimise kiiruse ja pH omavaheline seos ($r = 0,50$; $p < 0,05$). Madalamatel pH väärtustel on antud suhe väga nõrk, reaalne seos avaldub alles lähenedes pH optimumile. Sellest võib järeldada, et optimumist madalamatel pH väärtustel ei sõltu nitraadi reduktaasi aktiivsus oluliselt pH-st. Optimumist kõrgematel pH-del on nitraadi redutseerimine üldiselt aeglasem. Kõrgeimad nitraadi tarbimise kiirused mõõdeti madalamatel pH-del, maksimaalsed ja minimaalsed kiirused erinevad kuuekordselt.

Nitriti akumulatsioon kiiruste ja pH väärtuste sõltuvus on kujutatud Joonis 11 ($r = 0,63$; $p < 0,05$). Hoolimata graafiliselt silma hakkavatest anomaaliatest on statistiline seos pH ja kuhjunud nitritiooni vahel tugev. Erinevalt NO₃⁻-N redutseerimise kiirusest kasvasid NO₂⁻-N akumulatsiooni kiirused edasi ka optimumist (pH 9,5) kõrgematel pH-del, nähtav kiiruse alanemine toimus alates pH-st 10,0. Nitriti kuhjumiseks oli sobivaim pH vahemik 9,0 - 10,0. Tunnis akumuleeriti maksimaalselt 1,75 mg NO₂⁻-N * g⁻¹ MLSS, mis on tunduvalt vähem võrreldes maksimaalse nitraadi redutseerimise kiirusega (6 mg NO₃⁻-N * g⁻¹ MLSS). Sellest

võib järeldada, et ka praktilises kasutuses jääks nitritit akumuleeriva reaktori kiirus tavapärasele denitrifikatsioonile alla.



Joonis 11 - Nitritilämmastiku akumulatsiooni kiirused aktiivmuda suspensiooni kohta erinevatel pH väärtustel



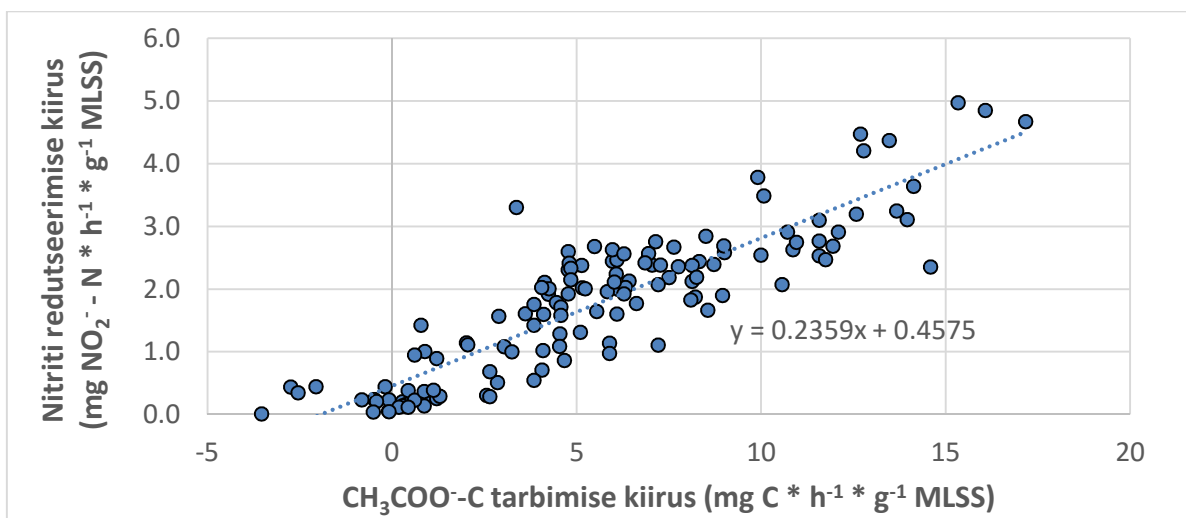
Joonis 12 - Nitritilämmastiku redutseerimise kiirused aktiivmuda suspensiooni kohta erinevatel pH väärtustel

Selleks et hinnata nitriti redutseerimise kiirust, lahutati NO₃⁻-N redutseerimise kiirustest maha NO₂⁻-N kuhjumise kiirused (Joonis 12). Statistiline seos nitritilämmastiku redutseerimise kiiruse

ja pH vahel on tugev ($r = 0,73$; $p < 0,05$). pH tõustes vähenes antud kiirus märgatavalt, eriti järsult joonistub välja kiiruse langus pH väärtustel üle 9,5. On suur tõenäosus, et antud optimum tulenebki sellest, et nitriti reduktaas ei suuda kõrgematel pH-del enam redutseerimist läbi viia. Nitriti redutseerimise peatumine või aeglustumine vähendab prootonite tarvet periplasmas, mistõttu jäävad kasutamata nitraadi redutseerimisega periplasmasse transporditavad prootonid. See võib kaasa tuua pH langemise, mida iseloomustab ka Joonis 9.

Kuna kõigis paralleelides jäid mõõdetud ammooniumlämmastiku kontsentratsioonid alla määramispiiri ($<1 \text{ mg NH}_4^+ \text{-N l}^{-1}$), võib eeldada, et lämmastik, mis ei akumulatsioonid nitritina, redutseeriti edasi mööda tavapärasest denitrifikatsioonirada. Kuna antud töös gaasilisi lämmastikuvorme (NO , N_2O ja N_2) ei mõõdetud, ei ole võimalik hinnata teiste denitrifikatsiooni vaheühendite kuhjumist.

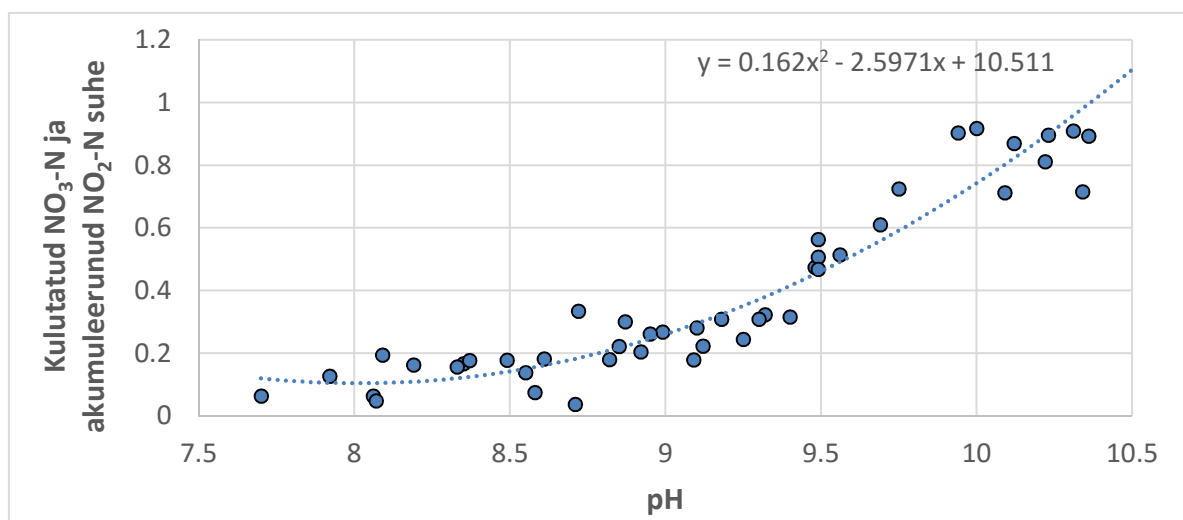
Atsetaatsüsiniku tarbe hindamiseks erinevate redutseerimisprotsesside käigus võrreldi statistiliselt $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{-N}$ tarbimise kiirust nitraadi redutseerimise, nitriti akumulatsiooni ja nitriti redutseerimise kiirustega. Joonis 13 on esitatud süsiniku tarbimise ja nitriti redutseerimise kiiruste vaheline seos ($r = 0,9$; $p < 0,05$). Nitraadi redutseerimise ja süsiniku tarbimise kiiruste vaheline seos oli veidi nõrgem ($r = 0,81$; $p < 0,05$), nitriti akumulatsiooni seos veelgi nõrgem ($r = 0,40$; $p < 0,05$). Nendest tulemustest võib järeldada, et kõige olulisem süsnikutarbija antud katses oli nitriti reduktaas ja sellele järgnevad denitrifikatsiooni etapid. Oluline osa atsetaatsüsinikust kasutati ära ka nitraadi redutseerimisel, kuid eeldatavasti moodustab see alla poole kogusüsiniku tarbimisest.



Joonis 13 - Nitritlämmastiku redutseerimise kiiruse ja tarbitud atsetaatsüsiniku seos

Joonis 13 regressiooni alusel tarbiti 1 mg NO_2^- -N redutseerimiseks keskmiselt 4 mg CH_3COO^- -C. Osa süsinikust tarbiti aga juba nitraadi redutseerimise käigus. Kõiki katseid arvestades, redutseeriti keskmiselt tunnis 2,52 mg NO_3^- -N * g^{-1} MLSS, millest 0,83 mg akumuleerus nitritina ja 1,69 mg redutseeriti nitritist edasi gaasilisteks lämmastikuühenditeks. Reaalne keskmine atsetaatsüsiniku tarve tunnis oli 5,22 mg CH_3COO^- -C * g^{-1} MLSS. Kui nitraadi ja nitriti redutseerimised kulutaksid võrdselt süsinikku, kasutaksid nii 1 mg NO_3^- -N kui ka 1 mg NO_2^- -N redutseerimine 1,24 mg CH_3COO^- -C. Eelmises lõigus toodud statistiliste seoste ajendil võib aga eeldada, et päris võrdselt mõlemas redutseerimises süsinikku ei kasutata ja tegelik tarbimine on NO_2^- -N reduktaasil suurem.

Üldiselt võib katsetulemustest järeldada, et osalise denitrifikatsiooni rakendamisel oleks võimalik kokku hoida üle poole orgaanilise süsiniku kuludest. Tavapärastes olmereovetes ei pruugi see eristatav kokkuhoidu veepuhastuse kulude seisukohast anda, sest enamasti on sissevoolus olemas piisav hulk orgaanilist süsinikku. Spetsiifilisemate reovete korral, kus C/N suhe on madalam, võib osalise denitrifikatsiooni rakendamine tuua olulise kulude kokkuhoiu. Kombinatsioonis nitritatsiooni-anammoks protsessiga võib kergestilaguneva süsiniku juurdelisamine muutuda aga täielikult ebavajalikuks.



Joonis 14 - Kulutatud nitraatlämmastiku ja tekkinud nitritlämmastiku katsekeskmised suhted erinevatel pH väärtustel

Osalise denitrifikatsiooni ja selle pH sõltuvuse täpsemaks kirjeldamiseks arvutati välja kulutatud NO_3^- -N ja tekkinud NO_2^- -N suhted. Saadud tulemused on kujutatud Joonis 14. Parameetrite vahel oli statistiliselt tugev nii lineaarne ($r = 0,91$; $p < 0,05$) kui ka ruutsõltuvus (r

= 0,96; $p < 0,05$). Kumbki seos ei väljenda aga suhte tasakaalupunktini jõudmist pH väärtustel üle 10, kus jõutakse ligi 100% nitriti akumulatsioonini. Optimaalsel pH-l 9,5 on nitriti akumulatsioon stabiilselt 50-60% vahel.

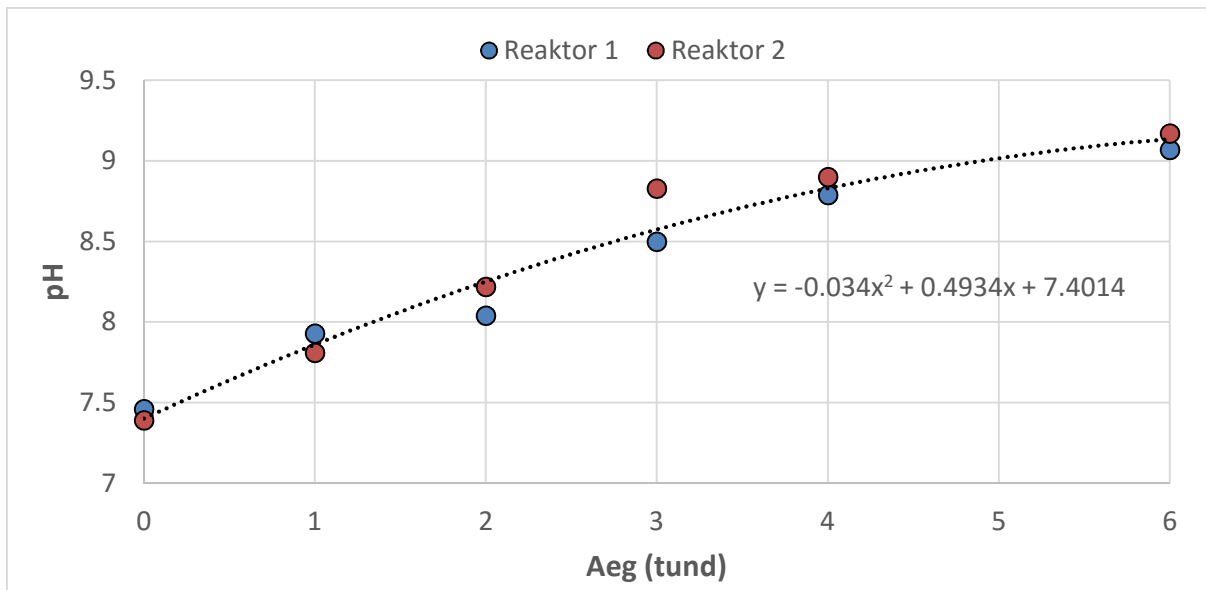
Soovides arendada võimalikult odavat tehnoloogiat, peab ka pikaajaliselt töötavas reaktoris opereerima pH-d optimaalse väärtuse lähedal. Väline pH mõjutamine suuremahulistes reaktorites tekitab lisakulusid nii doseeritavate kemikaalide kui automaatsete juhtimissüsteemide arvelt. See tähendab, et hinnanguliselt on pikaajaliselt opereeritud reaktoris võimalik nitritina akumuleerida 50-60% nitraatlämmastikust, ülejäänud nitraat redutseeritakse tõenäoliselt tavapärasest denitrifikatsioonirada pidi gaasiliseks lämmastikuks.

2.4.2 Pilootkatsed

Kuna lühiajaliste annuskatsete tulemustega ei ole võimalik kirjeldada protsessi pikaajalist käiku, otsustati teostada pilootkatsed nitriti akumulatsiooni iseloomustamiseks pikemal perioodil kui 6 tundi. Korraga pandi käima kaks paralleelset reaktorit, mis opereerisid sama toitevee ja -tsükliga. Reaktoreid opereeriti kokku 48 päeva. Võrreldes annuskatsetega võib reaktoritega sooritatud katsetes välja tuua 2 peamist erinevust:

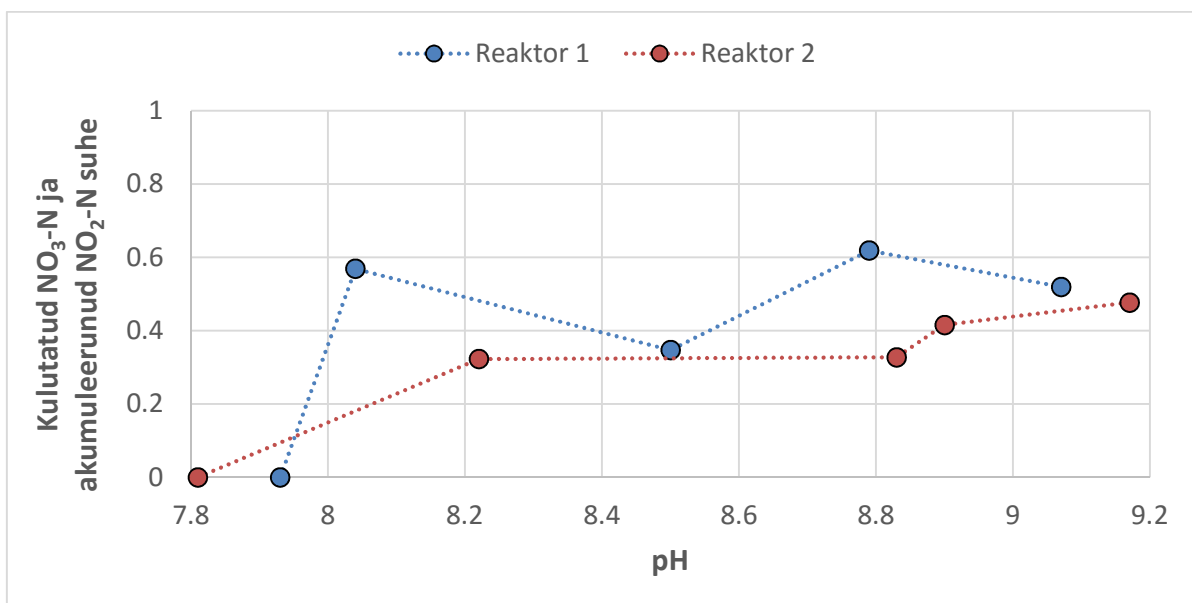
- Reaktoreid ei opereeritud rangelt anoksilistes oludes - reaktorid olid pealt avatud ning seetõttu oli võimalik hapniku osaline ligipääs. Ka reoveepuhastites rakendatavad anaeroobsed ja anoksilised reoveemahutid on enamasti pealt avatud.
- Toitelahus sisaldas lisaks nitraadi- ja atsetaadiühenditele ka väikeses koguses muid toitelahuseid, et tagada bakteritele pikemaajaliseks ellujäämiseks ja kasvamiseks vajalikud mikro- ja makrotoitained. Annuskatsetes neid katse lühiduse tõttu ei lisatud.

Pilootreaktorite käivitamisel jälgendati annuskatsete metoodikat - reaktoritest võeti ja analüüsiti proove 0., 1., 2., 3., 4. ja 6. tunnil. Antud katse eesmärgiks oli jälgida, kas pilootkatsete esimesed tunnid on sarnased annuskatsetes saavutatud tulemustega. Toitainete puhverdava mõju uurimiseks on Joonis 15 toodud esimese kuue tunni pH muutused.



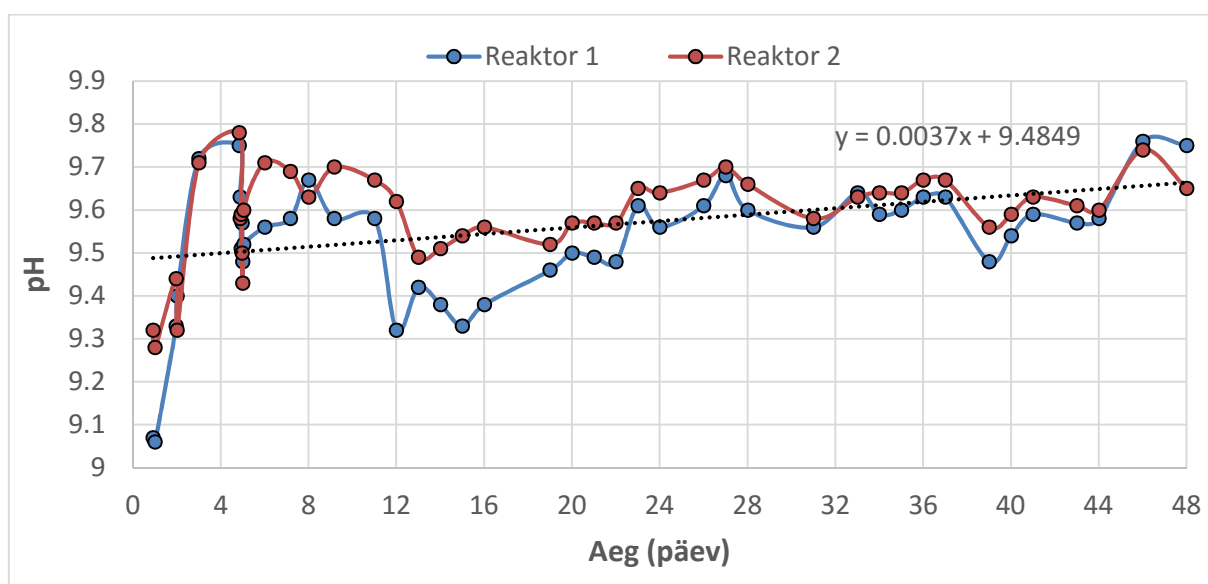
Joonis 15 - pH muutus pilootreaktorite esimese kuue tunni jooksul

Joonis 8 ja 15 võrreldes on võimalik näha deaeratsiooni ära jätmise mõju pH tõusule. Annuskatsetes oli pH tõus tunni kohta suurem, mis võib tuleneda mikroaeroobsetest tingimustest pilootreaktorites. Lahustunud hapnik on reaktorites otsa saanud tõenäoliselt 2. ja 3. tunni vahel, sest kolmanda tunni tulemustest on näha järsemat pH tõusu. Osaliselt aeroobsete tingimuste mõju on näha ka Joonis 16, kus on toodud tekkinud NO_2^- -N ja kasutatud NO_3^- -N suhte muutumine pH kasvades.



Joonis 16 - Kulutatud nitraatlämmastiku ja tekkinud nitritlämmastiku suhted erinevatel pH väärtustel

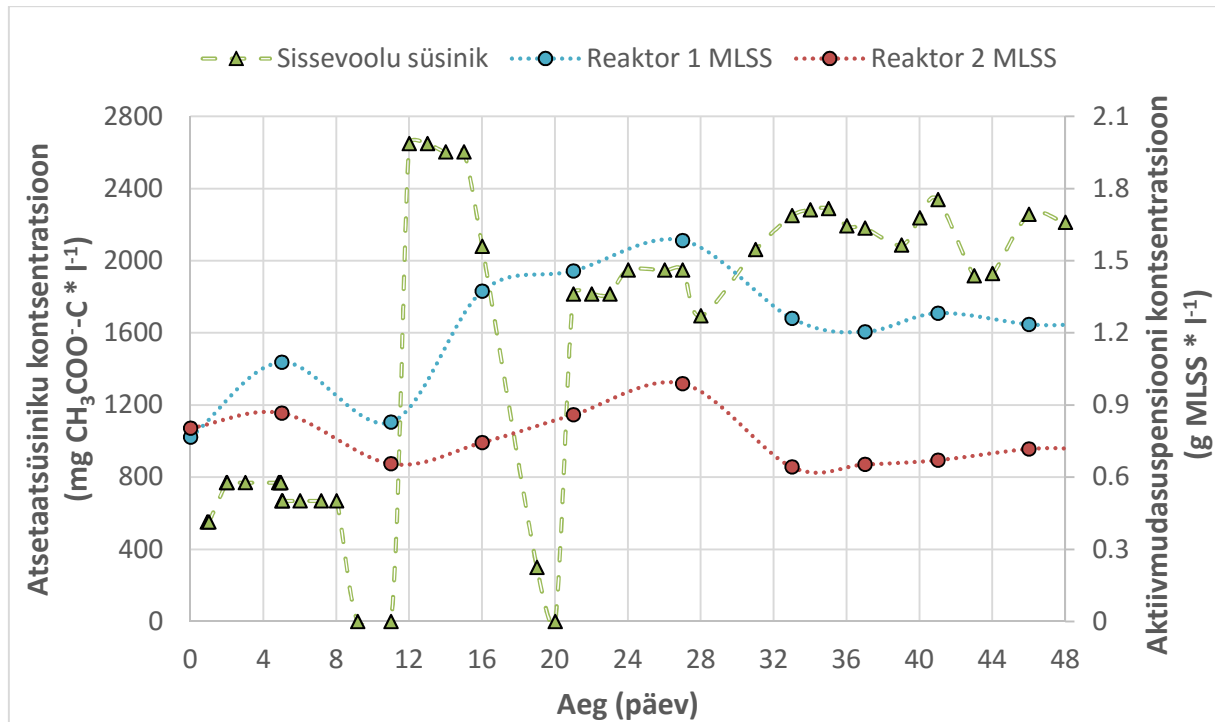
Nähtav denitrifikatsiooniprotsess hakkas reaktorites käima alles alates 1. tunnist ning ka joonisel on nähtav teatud hüppelisus reaktor 1 tulemustes. Alates 3. tunnist on tulemused stabiilsemad ning saavutati ligikaudu 50% nitriti akumulatsioon, mida annuskatsete tulemuste põhjal ka eeldati. Üldiselt on saavutatud akumulatsioonid veidi kõrgemad, kui annuskatsetel samadel pH-del. Põhjuseks võivad taas olla osaliselt aeroobsed tingimused, mille tõttu võidi osa tekkinud nitritist tagasi nitraadiks oksüdeerida. Pikema perioodi jooksul peaks hapnik aga vedelik-gaas piirpinnalt piisavalt väikestes kogustes lahustuma, mistõttu nitrifikatsioon reaktoreid oluliselt ei mõjuta.



Joonis 17 - Pilotreaktorite pH muutus alates esimesest toitetsüklist

Joonis 17 on toodud pH muutus mõlemas pilotreaktori kogu 48 päevase katseperioodi ajal. Selleks, et paremini näidata pH väiksemaid muutusi, on joonisel välja jäetud esimesed 12 tundi, mille pH väärtused on toodud juba varem joonisel R1. Kogu katseperioodi jooksul oli 1. reaktori keskmine pH $9,53 \pm 0,15$ ning 2. reaktori pH $9,59 \pm 0,11$. Tervel katseperioodil oli aga tuvastatav aeglane pH optimumi tõus ($r = 0,41$; $p < 0,05$). 48 päeva jooksul tõusis pH optimum algselt 9,5-lt ligikaudu 9,65-ni. Antud muutuse võis põhjustada mikroorganismide kohanemine - näiteks nitriti reduktaas, mille töö aeglustumine tõenäoliselt annuskatsetes pH optimumi tekitas, võis pikema perioodi jooksul aeglaselt kohastuda töötama ka veidi kõrgematel pH-väärtustel. Lisaks võisid antud nähtuse põhjustada pikema perioodi jooksul tekkivad muutused bakterikoosluses. Reaktorites mõõdetud aktiivmuda suspensioonide (MLSS) ja sissevoolu süsinikukontsentratsioonide võrdlus on toodud Joonis 18. Aktiivmudasuspensiooni

konsentratsioonide puhul on joonisele lisatud vaid tühjendamisjärgsed väärtused, reaktori ruumala kõikumisega seotud muutused on selguse tagamiseks välja jäetud.



Joonis 18 - Sissevoolu atsetaatsüsiniku ja reaktorite tühjendamisjärgse aktiivmudasuspensiooni kontsentratsioonide võrdlus

Kuigi algselt inokuleeriti mõlemaid reaktoreid sama koguse biomassiga, on juba 5. päeval tehtud mõõtmiste alusel aktiivmuda suspensiooni kontsentratsioonid oluliselt erinevad. Terve katseperioodi jooksul oli reaktor 2 MLSS ligi kaks korda madalam, kui reaktor 1 oma. Selle põhjuseks võivad olla reaktorite erinevad magnetsegajad. Kuigi mõlema reaktori magnetsegajate võimsus oli keeratud samale tasemele, tekitab reaktor 1 magnetsegaja tunduvalt suurema segunemise ja hapniku sissekande läbi piirpinna kui reaktor 2 magnetsegaja. Hilisemad magnetsegajate võimsuse korrigeerimised enam MLSS-i kontsentratsiooni oluliselt ei mõjutanud.

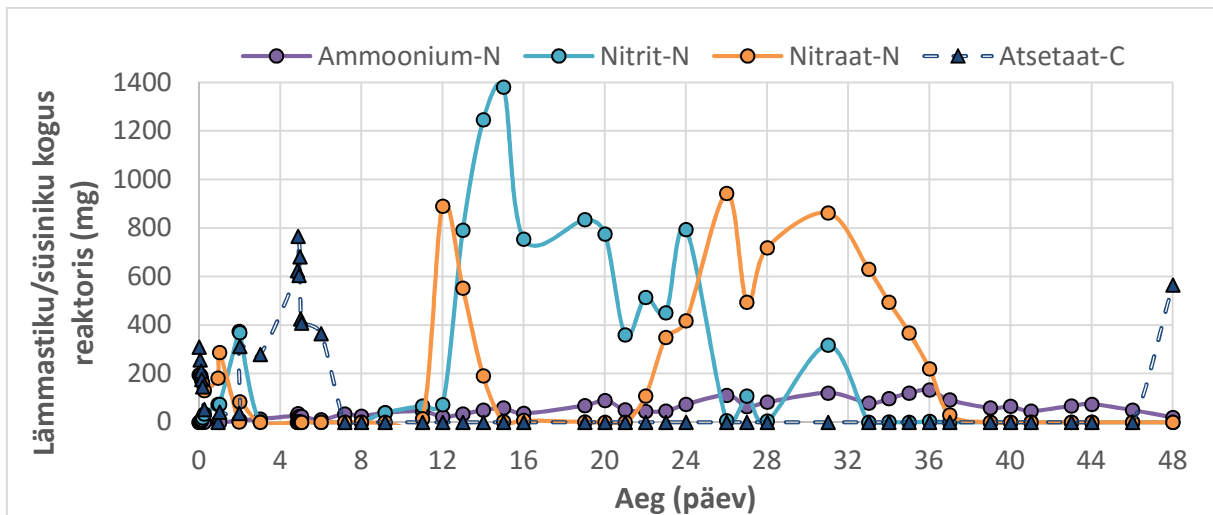
Suurema MLSS-i kontsentratsiooni tõusu põhjus 16. päevaks (Joonis 18) on tõenäoliselt süsinikukontsentratsiooni tõstmine sissevoolus. Oluliselt suurema orgaanilise süsiniku hulga tõttu hakkasid mikroorganismid kiiremini poolduma, nähtav biomassi koguse suurenemine toimus 24. opereerimispäevani. 32. opereerimispäevaks oli toimunud aktiivmudasuspensiooni kontsentratsioonis suur langus, mis võib olla tingitud reaktoris akumulatsioonist

saamisest. Kuigi CH_3COO^- -N kontsentratsioon oli alates 32. opereerimispäevast püsivalt kõrge, siis uut kiiret mikroorganismide kasvu ei täheldatud.

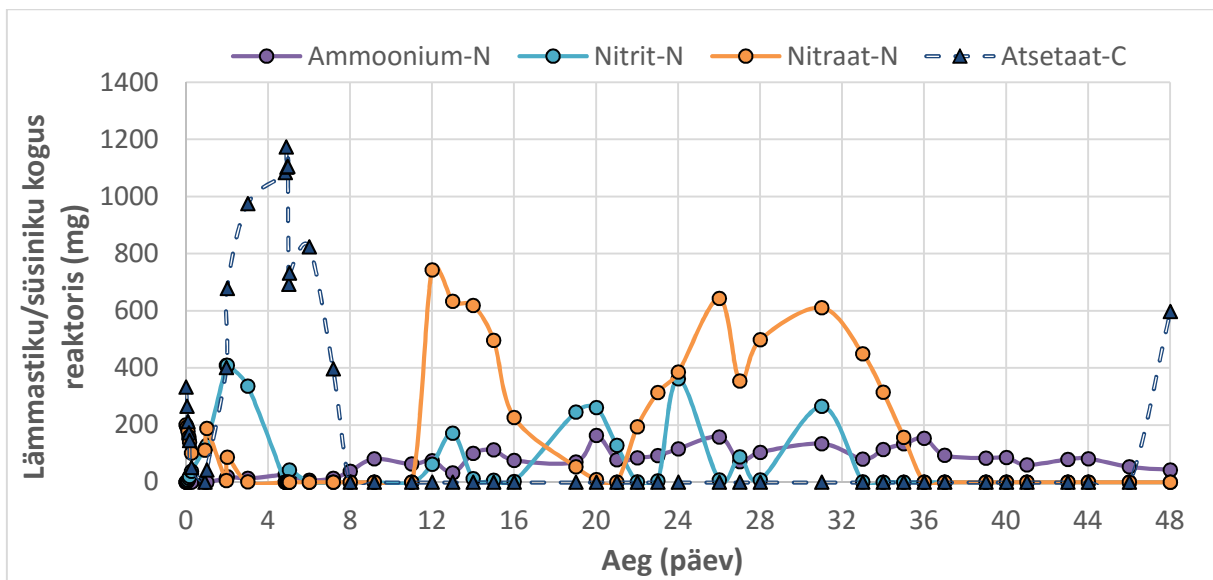
Vahepealsed langused atsetaatsüsiniku kontsentratsioonis on seotud sissevoolu riknemisega - nimelt suure kergesti laguneva süsiniku kontsentratsiooni tõttu hakkasid sissevoolus toimuma mikrobioloogilised protsessid, mille käigus süsinik ära tarbiti. Alates 20. opereerimispäevast hakati sissevoolu tegema ette vaid 2-3 päevaks, mis vältis toiteainerikka vee riknemise. Siiski näitasid juhuslikult teostatud analüüsid, et ka teiseks ja kolmandaks päevaks oli aeg-ajalt kuni 10% sissevoolu süsinikust ja lämmastikust sissevoolukanistris ära tarbitud. Selle vältimiseks oleks vajalik edaspidistel reaktorkatsetel vahetada süsinikuallikat või saavutada hermeetiline ja bakterivaba keskkond sissevoolu hoiustamiseks. Antud katsetes ei saanud aga võrdlusmomendi saavutamiseks süsinikuallikat vahetada ning seetõttu üritati sissevoolu valmistada tihedamini.

Joonis 19 ja 20 on toodud mõlemas pilootreaktoris mõõdetud lämmastikvormide ja atsetaatsüsiniku kogused terve katseperioodi jooksul. Üldiselt saavutas reaktor 1 tunduvalt parema nitritilämmastiku akumulatsiooni. Efektiivse akumulatsiooni periood oli nii 1-3 päev kui 12-24 päev. Mõlemat perioodi iseloomustab kõrge atsetaatsüsiniku kontsentratsioon ning eelnev nitraatlämmastiku kuhjumine. Sarnased tingimused olid loodud reaktoris 1 ka alates 31. päevast, kuid tulemused näitavad, et kogu reaktoris tekkinud nitrit redutseeriti ka ära. Joonisel R4 on kujutatud biomassi madalseis 32. päeval, mis võis olla tingitud akumulatsioonist toitainete (eriti atsetaatsüsiniku) vähesusest. On ka võimalik, et kuu ajaga oli reaktorisse kasvanud baktermass, mis suutis läbi viia efektiivset nitriti redutseerimist ka kõrgema pH (9,6) juures. On võimalik, et see viis nitraadi ja nitriti reduktaaside kiirused võrdseks ning akumulatsiooni seetõttu ei toimunud.

21-31 päevadeks vähendati sissevoolus 30% võrra atsetaatsüsiniku kontsentratsiooni, et vältida süsiniku ülejäägi tõttu akumulatsioonist nitriti aeglast äredutseerimist. Saavutati aga vastupidine tulemus: mõlemas reaktoris vähenes selle perioodi jooksul oluliselt akumulatsioonist nitriti kogus ning kasvas kuhjunud nitraadi kogus. Põhjuseks võib olla vaikselt toimuma hakanud nitriti redutseerimine, mis ka süsinikukontsentratsiooni vähenedes püsis aktiivsena ning tarbis osaliselt ära nitraadi redutseerimiseks mõeldud süsiniku. Eeldatavasti redutseeriti nitraati vähem kui nitritit, mis tekitas reaktorites peaaegu täieliku nitrititarbe ning nitraadi 70-80% akumulatsiooni.



Joonis 19 - Reaktor 1 akumulatsioonid lämmastikuvormide ja atsetaatsüsiniku kogused



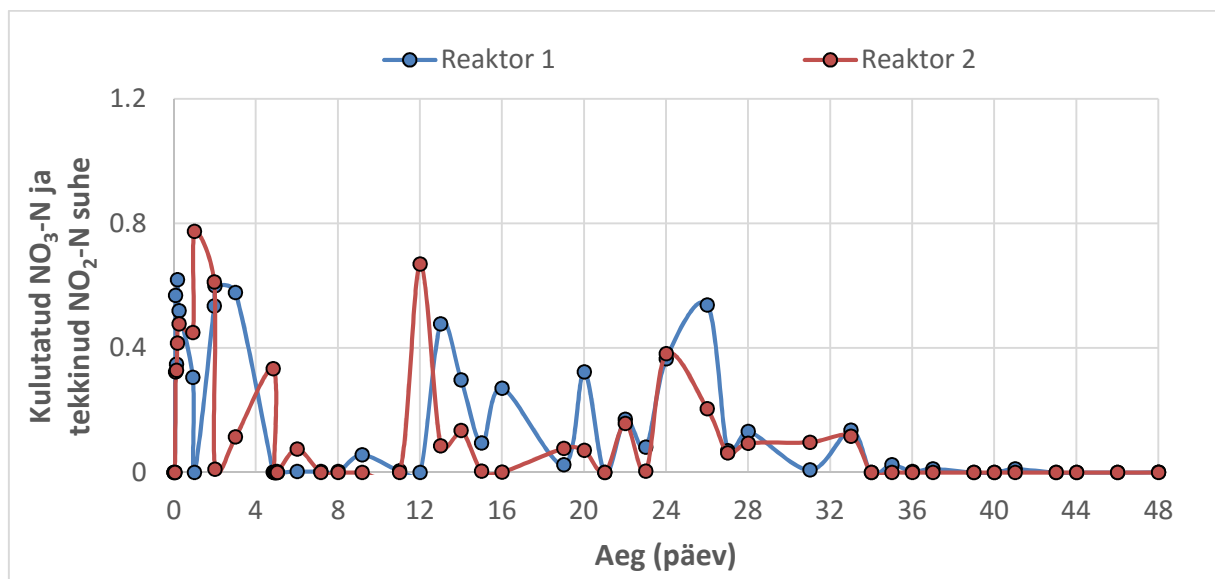
Joonis 20 - Reaktor 2 akumulatsioonid lämmastikuvormide ja atsetaatsüsiniku kogused

Reaktor 2 tulemuste puhul peab tõdema, et olulist pikaajalist nitriti akumulatsiooni ühelgi perioodil ei täheldatud. Väiksemad nitriti akumulatsiooni piigid, mille käigus püsisid reaktoris kuhjununa suuremad nitriti kontsentratsioonid olid 2.-3., 12.-13., 19.-20., 24. ja 31. päeval. Vahepealsetel päevadel toimus aga olulisel määral nitriti redutseerimine. Kuna ainsaks suuremaks erinevuseks kahe reaktori vahel oli segamiskiirus, võib eeldada, et kohev ja suspendeerunud denitrifikatsiooni biomass on paremini suuteline nitritit akumulerima kui väiksema kohevusega biomass. Üldised nitraatlämmastiku ja atsetaatsüsiniku muutuste trendid on mõlemal reaktoril sarnased.

Pilootkatsete perioodil toimus mõlemas reaktoris ka mõõdetav ammooniumlämmastiku kuhjumine, reaktoris 2 aga ligi 40% suuremates kogustes (keskmine $72,5 \pm 42,6 \text{ mg NH}_4^+\text{N}$) kui reaktoris 1 ($53,5 \pm 33,2 \text{ mg NH}_4^+\text{N}$). Ammooniumlämmastik võis tulla kahest allikast:

- osa nitritlämmastikust võidi redutseerida ammooniumlämmastikuni, reaktor kahes on 20-28 päeval näha $\text{NH}_4^+\text{-N}$ tõusu kohe pärast $\text{NO}_2^-\text{-N}$ langemist, mis võib viidata antud protsessile;
- mikroorganismide suremuse tagajärjel vabaneb nende massi seotud orgaaniline lämmastik, mis vette jääb enamasti ammooniumi kujul. Seda võivad väljendada ammooniumlämmastiku tõusud reaktorites päevadel 8-12 ja 28-32.

Reaktor 2 suurema ammooniumlämmastiku koguse põhjuseks on arvatavasti eelmise kahe kombinatsiooni - väiksema segamise tõttu sattus reaktorisse läbi vedelik-gaas piirpinna vähem hapnikku, mistõttu oli üldine bakterite suremus kõrgem. Lisaks võisid anoksilisemad tingimused tekitada eelise selliste bakterite kasvuks, kes seovad nitritiooni ammooniumiooniks või orgaaniliseks lämmastikuks.



Joonis 21 - Pilootreaktorites kulutatud nitraatlämmastiku ja akumulatsioonid nitritlämmastiku suhe

Kogu perioodi jooksul mõõdetud kulutatud $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ja akumulatsioonid $\text{NO}_2^-\text{-N}$ suhted on toodud Joonis 21. Esimese nelja päeva jooksul on mõlema reaktori puhul võimalik täheldada kõrgeid $\text{NO}_2^-\text{-N}$ akumulatsioone, kuni 80% redutseeritud $\text{NO}_3^-\text{-N}$ kuhjus reaktorisse nitritlämmastikuna. Ka 12.-32. päeval on mõlema reaktori puhul näha akumulatsioonipiike, kuid reaktor 1 puhul on

need oluliselt tihedamad. Reaktor 2 puhul on antud perioodil näha kaks suuremat piiki (päevad 12 ja 24), mõlemad vahetult pärast uue sissevoolu valmistamist (uus sissevool 11. ja 24. päeval). On võimalik, et reaktoris oli tekkinud mõne mikro- või makrotoitainete puudus, mida nitriti akumulatsiooniks vajati, ning selle tõttu suudeti nitritlämmastikku akumulatsiooniks ainult kohe pärast uue sissevoolu valmistamist.

Selleks, et saavutada reaktoris püsivat nitritlämmastiku akumulatsiooni peaksid olema antud katseandmete järgi täidetud järgmised tingimused:

- optimaalne orgaanilise süsiniku kogus (atsetaadi puhul ligikaudu C/N suhe 1.8/1), et nitraadi redutseerimise käigus saaks otsa ka orgaaniline süsinik;
- piisavalt tugev segamine, et anda reaktorisse piisavas koguses hapnikku biomassi paremaks kasvatamiseks ning hoida biomassi suspendeerunud olekus;
- pH puhvrite ja suuremate mõjutajate vaba keskkond, et protsess saaks kulgeda iseenesliku optimumi lähedal;

Lisaks on katsetulemustest lähtuvalt vajalik vahetada näiteks 30 päeva tagant mahutis biomassi - eraldada vana aktiivmuda ning lisada uus aeroobsest mahutist pärit biomass. Täpsem biomassi vahetamise sagedus võib oleneda ka muudest tingimustest ja mahtudes, mida tuleb täpsemate tehnoloogiliste lahenduste puhul eraldi vaadelda. Võimalik on ka biomassi pidevas ringluses hoidmine, mille puhul vahetub reaktoris biomass iga päev teatud koguses. Kui suudetakse tagada, et mikroorganismid ei kohastu läbi viima täielikku denitrifikatsiooni väga kõrgetel pH väärtustel ($\text{pH} > 9,5$), on võimalik saavutada ka pikaajaliselt stabiilne nitritlämmastiku akumulatsioon.

Kokkuvõte

Selles magistritöös uuriti pH mõju nitritlämmastiku akumulatsioonile magedaveelises denitrifikatsioonisüsteemis. Selleks teostati nii annuskatseid (kuni 6 tundi) kui ka pilootkatseid reaktorites (48 päeva). Töö käigus mõõdeti regulaarselt lämmastikuühendite, atsetaatsüsiniku ja aktiivmuda suspensiooni (MLSS) kontsentratsioone ning pH väärtust.

Annuskatsetest selgus, et denitrifikatsiooni käigus tõuseb pH iseeneslikult väärtuse 9,5 poole. Antud väärtusest kõrgemal pH väärtusel on nitriti reduktaasi aktiivsus juba niivõrd madal, et protsessi efektiivselt läbi ei viida. Sellest tulenevalt leiti ka tugev nitritilämmastiku akumulatsiooni kasvamine pH tõustes. pH optimaalsel väärtusel 9,5 jäi nitritlämmastiku akumulatsioon vahemikku 50-60%. Kuigi veelgi kõrgematel pH väärtustel jõudis nitriti akumulatsioon peaaegu 100%-ni, ei ole sellistes tingimustes reaalse reaktori opereerimine otstarbekas ning pH pideva tõstmisega kaasneksid reoveepuhastile lisakulutused kemikaalide osas.

Pilootkatsetes selgus, et biomassi kohastumisel võib optimaalne pH väärtus veidi tõusta (9,65- ni 48. päevaks). Samas ei saavutanud nitriti akumulatsioon pH 9,65 juures enam annuskatsetes mõõdetud kontsentratsioone. Pigem toimus biomassi kohanedes denitrifikatsioon lõpuni ning nitriti akumulatsiooni alates 32. päevast ei täheldatud. Enne seda saavutati periooditi kõrgeid kuhjunud nitritlämmastiku väärtused (kuni 140 mg/l), mis võiks näidata, et denitrifikatsioon on nitriti akumulatsiooniks rakendatav.

Et suuremahulises katses tagada pikaajaliselt töötav nitritit akumulatsioon denitrifikatsiooniprotsess, on töös toodud välja kaks suuremat soovitus - vahetada reaktoris biomassi iga teatud aja tagant (või pidevalt väikeses mahus) ning jälgida orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni. Liiga suure süsinikukontsentratsiooni korral ärastatakse reaktoris lõpuks ära ka kuhjunud nitritlämmastik, mis ei ole protsessi iseloomu arvestades sobilik.

Töös teostatud tulemuste põhjal võib öelda, et osaline denitrifikatsioon on tehnoloogilise protsessina rakendatav. Kombineeritult nitritatsioon-anammoks protsessiga on nitriti akumulatsiooni võimalik rakendada näiteks kõrge lämmastik- aga madala süsinikkoormusega reovee puhul ning saavutada sealjuures ligi 100% lämmastiku ärastusefektiivsus. Antud lahendust on kavas edaspidises uurimistöös põhjalikumalt uurida.

Kasutatud kirjandus

- Ahn Y. H. (2006) Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochem.* **41**, 1709–1721.
- Berks B. C., Ferguson S. J., Moir J. W. B., Richardson D. J. (1995) Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1232**, 97–173.
- Chen J., Strous M. (2013) Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 136–44.
- Fernández-Nava Y., Marañón E., Soons J., Castrillón L. (2008) Denitrification of wastewater containing high nitrate and calcium concentrations. *Bioresour. Technol.* **99**, 7976–81.
- Ge S., Peng Y., Wang S., Lu C., Cao X., Zhu Y. (2012) Nitrite accumulation under constant temperature in anoxic denitrification process: The effects of carbon sources and COD/NO₃-N. *Bioresour. Technol.* **114**, 137–43.
- Glass C., Silverstein J. (1998) Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Res.* **32**, 831–839.
- Godden J. W., Turley S., Teller D. C., Adman E. T., Liu M. Y., Payne W. J., LeGall J. (1991) The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science (80-)*. **253**, 438–442.
- Hino T., Nagano S., Sugimoto H., Tosha T., Shiro Y. (2012) Molecular structure and function of bacterial nitric oxide reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1817**, 680–7.
- Hu Y., Zhao X., Zhao Y. (2014) Achieving high-rate autotrophic nitrogen removal via Canon process in a modified single bed tidal flow constructed wetland. *Chem. Eng. J.* **237**, 329–335.
- Jafari S. J., Moussavi G., Yaghmaeian K. (2015) High-rate biological denitrification in the cyclic rotating-bed biological reactor: Effect of COD/NO₃(-), nitrate concentration and salinity and the phylogenetic analysis of denitrifiers. *Bioresour. Technol.* **197**, 482–8.
- Kumar M., Lin J. (2010) Co-existence of anammox and denitrification for simultaneous

- nitrogen and carbon removal—strategies and issues. *J. Hazard. Mater.* **178**, 1–9.
- Lan C.-J., Kumar M., Wang C.-C., Lin J.-G. (2011) Development of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a sequential batch reactor. *Bioresour. Technol.* **102**, 5514–9.
- Lu H., Chandran K., Stensel D. (2014) Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Res.* **64**, 237–254.
- Luo G., Li L., Liu Q., Xu G., Tan H. (2014) Effect of dissolved oxygen on heterotrophic denitrification using poly(butylene succinate) as the carbon source and biofilm carrier. *Bioresour. Technol.* **171**, 152–8.
- Richardson D. J., Berks B. C., Russell D. A., Spiro S., Taylor C. J. (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 165–78.
- Shapleigh J. P. (2006) The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry, (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E., eds), pp. 769–792. Springer New York, New York, NY.
- Shen J., He R., Han W., Sun X., Li J., Wang L. (2009) Biological denitrification of high-nitrate wastewater in a modified anoxic/oxic-membrane bioreactor (A/O-MBR). *J. Hazard. Mater.* **172**, 595–600.
- Star W. R. L. van der, Abma W. R., Blommers D., Mulder J. W., Tokutomi T., Strous M., Picoreanu C., Loosdrecht M. C. M. Van (2007) Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Res.* **41**, 4149–63.
- Sun H., Yang Q., Peng Y., Shi X., Wang S., Zhang S. (2009) Nitrite Accumulation during the Denitrification Process in SBR for the Treatment of Pre-treated Landfill Leachate. *Chinese J. Chem. Eng.* **17**, 1027–1031.
- Vacková L., Srb M., Stloukal R., Wanner J. (2011) Comparison of denitrification at low temperature using encapsulated *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens* and mixed culture. *Bioresour. Technol.* **102**, 4661–6.

- Wang C. C., Lee P. H., Kumar M., Huang Y. T., Sung S. W., Lin J. G. (2010) Simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonium oxidation and denitrification (SNAD) in a full-scale landfill-leachate treatment plant. *J. Hazard. Mater.* **175**, 622–628.
- Wang J. H., Baltzis B. C., Lewandowski G. A. (1995) Fundamental denitrification kinetic studies with *Pseudomonas denitrificans*. *Biotechnol. Bioeng.* **47**, 26–41.
- Watmough N. J., Field S. J., Hughes R. J. L., Richardson D. J. (2009) The bacterial respiratory nitric oxide reductase. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 392–9.
- Wu C., Peng Y., Wang S., Li X., Wang R. (2011) Effect of Sludge Retention Time on Nitrite Accumulation in Real-time Control Biological Nitrogen Removal Sequencing Batch Reactor. *Chinese J. Chem. Eng.* **19**, 512–517.
- You J., Das A., Dolan E. M., Hu Z. (2009) Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water Res.* **43**, 1801–1809.
- Zhang L., Zheng P., He Y., Jin R. (2009) Performance of sulfate-dependent anaerobic ammonium oxidation. *Sci. China, Ser. B Chem.* **52**, 86–92.
- Zhao W., Wang Y., Liu S., Pan M., Yang J., Chen S. (2013) Denitrification activities and N₂O production under salt stress with varying COD/N ratios and terminal electron acceptors. *Chem. Eng. J.* **215-216**, 252–260.

The effect of pH on nitric nitrogen accumulation in a freshwater denitrification system

Markus Raudkivi

Summary

As nitric nitrogen accumulation in a denitrification system has been previously reported by many researchers, the aim of this research was to elucidate the effect of pH on aforementioned process. Nitric nitrogen accumulation was researched in both batch tests and pilot-scale reactors. pH and the concentrations of nitrogen compounds, acetate and mixed liquor suspended solids (MLSS) were measured from all samples.

The results of the batch tests showed, that during a denitrification process, the pH value rises to 9,5 by its own. As the optimal pH of nitrite reductase is much lower, no significant nitrite reduction was measured on higher pH values. That also meant a significant rise of nitric nitrogen accumulation, on pH value of 9,5, about 50-60% on reduced nitrate accumulated in the system. Though even higher pH values created even bigger accumulations (up to 100%), operating a reactor on necessary values would be unpractical in real life due to higher expenses of added chemicals.

In the pilot-scale experiments, the optimal pH value rose to 9,65 by the 48th day as the biomass adapted to higher pH values in the environment. While the pH optimum in the reactors rose, no significant rise in nitrite accumulation was measured. Furthermore, from the 32th day on no nitric nitrogen accumulated in the reactors as the biomass adapted to higher pH values and full denitrification process became dominant in the systems. Nevertheless, the high accumulated nitric nitrogen values acquired on the first 30 days (up to 140 mg/L) show the potential of the process for real-life technological use.

In order to operate a full-scale partial denitrification process with nitric nitrogen accumulation, two main recommendations were given - to exchange the biomass in the reactor either once every couple of weeks or continuously in small amounts in order to avoid adaption to higher pH values and to carefully monitor the organic carbon concentrations in the reactor. When the organic carbon is not fully used up by the nitrate reduction stage, the accumulated nitrite nitrogen can also be slowly reduced.

The studied process shows great potential when combined with other biological wastewater treatment process. For example, combination with anammox process could result a cost-effective technology for high nitrogen and low carbon load wastewater with up to 100% effectiveness in nitrogen elimination. The combination of nitrification-anammox and partial denitrification with nitric nitrogen accumulation will be the aim of continued research on given topic.

Tänuavaldused

Autor soovib igakülgse abi eest lõputöö valmimisel tänada järgnevaid inimesi:

Kristel Kroon

Anne Paaver

Kati Klein

Anni Mandel

Arthur Kivi

Aimar Kivirüüt

Veiko Hein

Ivar Zekker

Toomas Tenno

Infoleht

pH mõju nitritlämmastiku akumulatsioonile magedaveelises denitrifikatsioonisüsteemis

Denitrifikatsioon on bioloogiline lämmastikuärastusprotsess, mis teatud tingimustes kulgeb mittetäielikult, tekitades nitriti akumulatsiooni. Töös uuriti pH mõju antud nähtusele, teostati annuskatsed (kuni 6 tundi) ning pilootkatsed (48 päeva). Annuskatsetes täheldati pH iseeneslikku tõusu väärtuse 9,5 poole, millega kaasnes ka oluline nitriti akumulatsiooni tõus. Akumulatsioon võib tuleneda nitriti reduktaasi osalisest inhibeeritusest kõrge pH väärtuse poolt, mille tõttu osa toodetud nitritist jääb keskkonda alles. Pilootkatsetes saavutati katse alguses sarnased tulemused, kuid biomassi kohanedes kõrge pH väärtusega nitriti akumulatsioon vähenes. Nitriti akumulatsiooni kasutamiseks tehnoloogilise protsessina soovitatakse biomassi pidevalt reaktoris vahetada, et vältida selle kohastumist tugevalt aluselise keskkonnaga.

Märksõnad: *denitrifikatsioon, nitritlämmastiku akumulatsioon, magedaveeline keskkond, pH*

CERCS koodid: P305 Keskkonnakeemia, T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

The effect of pH on nitric nitrogen accumulation in a freshwater denitrification system

Denitrification is a biological nitrogen removal process, in which nitric nitrogen can accumulate on certain conditions. In this thesis, the effect of pH on aforementioned process was studied in batch tests (up to 6 hours) and pilot scale tests (48 days). In batch test, the pH value rose towards 9,5 spontaneously during which accumulated nitrite concentrations rose as well. This can be the result of pH inhibition to nitrite reductase, which cannot sufficiently reduce all produced nitrite on high pH values. In pilot scale tests, same effect was observed during the beginning of reactor operation, though due to biomass adaption nitrite accumulation stopped by the 32th day. In order to use nitrite accumulating denitrification as a technological process, the biomass inside the reactor should be changed either once every couple of weeks or continuously every day.

Keywords: *denitrification, nitric nitrogen accumulation, freshwater, pH*

CERCS codes: P305 Environmental Chemistry, T270 Environmental technology, pollution control

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Markus Raudkivi**, (sünnikuupäev: 12.09.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**pH mõju nitritlämmastiku akumulatsioonile magedaveelises denitrifikatsioonisüsteemis**“, mille juhendaja on **Taavo Tenno**,

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**