

Tartu Ülikool
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia instituut
Kolloid- ja keskkonnakeemia õppetool

Kärt Kingisepp
**Lenduvate rasvhapete analüüsimetoodikate võrdlev
analüüs**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

**Juhendajad: PhD Taavo Tenno
PhD Siiri Velling**

Tartu 2023

Infoleht

Lenduvate rasvhapete analüüsimetoodikate võrdlev analüüs

Bakalaureusetöös võrreldi kolme erinevat meetodikat lenduvate rasvhapete määramiseks: Nordmanni FOS/TAC kahepunktiline tiitrimismeetod (Nordmann), Hach LCK365 Organic acid (fatty acid)/Butanoic acid kolorimeetriline meetodika (HACH) ning DiLallo ja Albertsoni tagasitiitrimismeetodikat (DiLallo&Albertson). Analüüsiti tööstusreovee anaeroobse seadme sisse- ja väljavoolu. Töö eesmärgiks oli võrrelda reoveest lenduvate rasvhapete kontsentratsiooni määramise meetodikaid. Selleks analüüsiti kahte tiitrimismeetodit ja ühte spektrofotomeetrilist määramismeetodikat ning võrreldi neid tulemuste täpsuse ning meetodika lihtsuse ja kiire rakendatavuse seisukohast. Bakalaureusetöös teostati ka kõige kiirema ja lihtsama, automaat-titreerimise seadmel AT1000 Biogas Titrator rakendatava Nordmanni FOS/TAC meetodika jaoks korrektsioonifunktsioon. Töö tulemusel töötati välja usaldusväärne, lihtne ja kiire meetodika anaeroobse reoveepuhastusprotsessi jälgimiseks lenduvate rasvhapete ja leelisuse suhtes.

Märksõnad: lenduvad rasvhapped, leelisus, anaeroobne kääritamine, tiitrimine, kolorimeetria
CERCS kood: P305 Keskkonnakeemia, T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

Abstract

A comparative study of volatile fatty acid analysis methodologies

In this thesis three different methodologies for the determining volatile fatty acids (VFAs) were compared: the Nordmann FOS/TAC two-point titration method (Nordmann), the Hach LCK365 Organic acid(fatty acid)/Butanoic acid colorimetric method (HACH) and the DiLallo and Albertson back-titration method (DiLallo&Albertson). The analysis was conducted on the influent and effluent of an industrial wastewater anaerobic treatment system. The aim of this study was to compare the methodologies for determining VFAs in wastewater. Two titration methods and one spectrophotometric method were analyzed and compared in terms of accuracy of results, simplicity, and fast applicability of the methodology. Additionally, a correction function was developed for the Nordmann FOS/TAC method, which can be implemented on the AT1000 Biogas Titrator, an automated titration device known for its speed and simplicity. As a result of this study, a reliable, simple, and fast methodology was developed for monitoring volatile fatty acids and alkalinity in anaerobic wastewater treatment processes.

Keywords: volatile fatty acids, alkalinity, anaerobic digestion, titration, colorimetry

CERCS code: P305 Environmental chemistry, T270 Environmental technology, pollution control

Sisukord

Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade.....	7
1.1. Anaeroobne käärivamine	7
1.1.1. Orgaaniliste polümeeride lagundamine	7
1.2. Lenduvad rasvhapped (VFA-d).....	8
1.3. VFA-de määramismeetodid	9
1.4. pH ja leelisus anaeroobses käärivamis	10
2. Metoodika	12
2.1. Nordmanni FOS/TAC metoodika.....	12
2.1.1. Määramisprotseduur	13
2.1.2. Tulemuseks kasutatavad empiirilised arvutused.....	13
2.2. DiLallo ja Albertsoni tagasiitrimismetoodika.....	13
2.2.1. Määramisprotseduur	14
2.2.2. Segavad faktorid	15
2.3. HACH küvett kolorimeetriline metoodika	15
2.3.1. Määramisprotseduur	16
2.4. Valideerimislahused.....	16
2.4.1. Kontrolliks kasutatavad reagentid ja valmistamisjuhend	17
3. Tulemused ja analüüs	18
3.1. Valideerimislahuste tulemused ja analüüs	18
3.1.1. Metoodikate korrektsioonifunktsioonid.....	19
3.1.2. Proovi lahjendamise mõju DiLallo ja Albertsoni metoodika tulemustele	20
3.1.3. Leelisuse sisalduse mõju hinnang Nordmanni metoodika tulemustele	21
3.2. Anaeroobse käärivamis veeproovide analüüsitulemused.....	22
3.3. Aegrida lenduvate rasvhapete ja leelisuse analüüsitulemustest anaeroobse käärivamis sisse- ja väljavoolust	25
Kokkuvõte	27

Summary.....	29
Tänuavaldused.....	31
4. Kasutatud kirjandus.....	32
Lihtlitsents.....	34

Sissejuhatus

Tööstusreovee anaeroobse töötusega saadakse orgaanikarikkast reoveest kasulik ressurss, nagu biogaas, millega kaasneb ka keskkonnamõjude vähenemine. Lisaks energia saamisele väheneb tööstusreovee eeltöötuse käigus reoveepuhastisse saadetava vee reostuskoormus ning seeläbi vähenevad ka kulud. Anaeroobse töötuse käigus kasutatakse spetsiaalseid mikroorganisme, mis lagundavad orgaanilisi aineid hapniku puudumisel. Üks oluline parameeter anaeroobse töötuse jälgimiseks, on lenduvate rasvhapete (VFA) sisaldus.

Lenduvad rasvhapped on orgaanilised ühendid, mis tekivad keerulise, mitmeetapilise anaeroobse lagundamise käigus. VFA-d on mikroorganismide toitaineks ja aitavad hoida protsessi stabiilsena. Anaeroobse kääritusprotsessi efektiivseks opereerimiseks tuleb jälgida VFA-de sisaldust anaeroobse reaktori töötamise ajal. Liiga madal VFA-de sisaldus võib viidata toitainete puudusele, mis pärsib mikroorganismide aktiivsust. Liiga kõrge VFA-de sisaldus võib aga viidata protsessi häiretele, nagu rasvhapete kuhjumine või pH tasakaalust väljumine. Anaeroobse kääritamise protsessi optimaalne pH on üldiselt vahemikus 6,0–8,5, mis on oluline mikroorganismide kasvu seisukohalt. Vajaliku puhversüsteemi selleks annab leelisus, mis on oluline anaeroobses kääritus oleva keskkonna stabiilsena hoidmiseks.

Anaeroobse kääriti opereerimisel on oluline jälgimisparameeter lenduvate rasvhapete ja leelisuse (FOS/TAC) suhe, mis on fermentatsiooniprotsesside hindamise indikaator. FOS tähistab lenduvate rasvhapete sisaldust, TAC on leelisus, millega saab hinnata protsessi hapete suhtes. Üldiselt peetakse optimaalseks FOS/TAC suhteks vahemikku 0,3–0,6, kuid see võib varieeruda sõltuvalt reovee koostisest, mikroorganismide tüübist ja protsessi tingimustest.

Täpset lenduvate rasvhapete kontsentratsiooni on nende lenduvuse tõttu keeruline mõõta. Tuntumad VFA-de määramismeetodid on gaaskromatograafia, tiitrimine, kolorimeetria ja destilleerimine. Gaaskromatograafia on kallid, kolorimeetriat peetakse ebatäpseks ning destilleerimine on aeganõudev protsess, seega eelistatuid määramismeetodid on tiitrimine, millele põhinevalt on tehtud eelmise sajandi lõpust mitmeid erinevaid meetodikaid.

Bakalaureusetöös võrreldakse kolme erinevat meetodikat lenduvate rasvhapete määramiseks: Nordmanni FOS/TAC meetod (Nordmann), Hach *Organic acid/Butanoic acid LCK365* kolorimeetrilist meetodikat (HACH) ning DiLallo ja Albertsoni tagasitiitrimismetoodikat (DiLallo&Albertson).

Bakalaureusetöö teoreetilises osas antakse ülevaade anaeroobse kääritamise protsessidest, sealhulgas tähtsaimatest opereerimis- ja jälgimisparameetritest, kuhu kuuluvad lenduvad

rasvhapped ning pH ja leelisus. Käesolevas töös käsitletakse ka kasutatavate meetodikate üldist tausta ja määramisprotseduure.

Töö eesmärgiks on võrrelda reoveest lenduvate rasvhapete kontsentratsiooni määramise meetodikaid. Selleks analüüsiti kahte tiitrimismeetodit ja ühte spektrofotomeetrilist määramismetoodikat ning võrreldi neid tulemuste täpsuse ning meetodika lihtsuse ja kiire rakendatavuse seisukohast. Bakalaureusetöö üheks hüpoteesiks olnud väite, et automaattitrimise seadme tulemus on madalamatel VFA-de sisalduselt suurema mõõtemääramatusega võrreldes kõrgemate kontsentratsioonidega, kontrollimiseks ning tulemuste ümberarvutamiseks koostati rakendatava Nordmanni FOS/TAC meetodika jaoks korrigeerimisfunktsioon.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Anaeroobne kääritamine

Anaeroobne kääritamine on protsess, mille käigus erinevad mikroorganismid lagundavad ja kasutavad elutegevuse käigus orgaanilisi materjale, mille tulemuseks on puhas ja taastuv energiaallikas, mida tuntakse biogaasi nime all. Biogaas on biokütus, mis koosneb peamiselt metaanist ja süsinikdioksiidist. Protsess on mitmeastmeline, mis hõlmab nii fakultatiivsete kui ka rangelt anaeroobsete organismide sünergilist koostööd (Onwosi et al., 2019). Anaeroobse kääritamisprotsessi eelduseks on orgaanilise materjali kättesaadavus ja madal redokspotsentsiaal. (Henze et al., 2008)

Anaeroobne töötlemine on väga tõhus biolagunevate orgaaniliste ühendite eemaldamisel, jättes lahusesse mineraliseerunud ühendid (NH_4^+ , PO_4^{3-} , S_2). Seda saab läbi viia lihtsates süsteemides, tekkiva liigmuda kogus on väga väike ja hästi stabiliseerunud. (Henze et al., 2008)

Anaeroobset kääritamist mõjutavad tegurid hõlmavad olulisi jälgimisparameetreid, näiteks pH, leelisus ning lenduvad rasvhapped ja opereerimisparameetreid, näiteks, temperatuur, orgaanika laadimismäär, hüdrauliline retentsiooniaeg ning substraadi koostis ja tasakaal. Need opereerimis- ja seireparameetrid mõjutavad mikroorganismide kasvu anaeroobses kääritis ja toimivad vastavalt kogu protsessi stabiilsuse indikaatoritena. (Onwosi et al., 2019)

Evolutsiooni käigus on välja kujunenud erinevad metaani moodustavate bakterite liigid erinevate temperatuurieelistustega ning on tuvastatud kolm suurenenud gaasitootmisega temperatuurivahemikku: psührofiilne– $\sim 10^\circ \text{C}$, mesofiilne– $32\text{--}50^\circ \text{C}$ ning termofiilne– $50\text{--}70^\circ \text{C}$. Kuigi kääriti töötamine termofiilsetes tingimustes annab suurema biogaasi saagise, on reaktoris termofiilse temperatuuri hoidmiseks vaja suuremat energiasisendit, tehnoloogilisi jõupingutusi ning termofiilne fermentatsioon on bioloogiliselt vähem stabiilne, seetõttu töötavad enamused reaktorid mesofiilsetel temperatuuridel. (Bilitewski et al., 1996; Onwosi et al., 2019)

1.1.1. Orgaaniliste polümeeride lagundamine

Anaeroobne kääritamine on mitmefaasiline ja omavahel seotud mikroobne protsess, mis hõlmab hüdrolüüsi, atsidogeneesi, atsetogeneesi ja metanogeneesi (Henze et al., 2008; Onwosi et al., 2019). Nende etappidega seotud mikroorganismid klassifitseeritakse bakteriaalseteks ja arheaalseteks mikroorganismideks. Viimased osalevad metanogeenses staadiumis, esimesed aga etappides, mis pakuvad sobivaid substraate metaani tootmiseks. Biogaasi tootmise

stabiilsus anaeroobsetes kääritites sõltub tugevalt selle mikroobikoosluse stabiilsusest. (Onwosi et al., 2019)

Anaeroobne lagunemisprotsess hõlmab keerulist toiduvõrku, milles orgaanilist ainet lagundavad järjestikku mitmed mikroorganismid. Peamised reaktsioone vahendavad bakterirühmad:

- fermentatiivsed bakterid
- vesinikku tootvad atsetogeensed bakterid
- vesinikku tarbivad atsetogeensed bakterid
- süsinikdioksiidi redutseerivad metanogeenid
- atsetiklastsed metanogeenid

Hüdrolüüsi käigus eritavad fermentatiivsed bakterid ensüüme, mis lagundavad aeglaselt lagunevad ühendid ning lahustumata materjali vähem keerukateks lahustunud ühenditeks, mis võivad läbida fermentatiivsete bakterite rakuseinu ja membraane. (Henze et al., 2008)

Atsidogeneesi käigus fermentatiivsete bakterite rakkudes olevad lahustunud ühendid muudetakse paljudeks lihtsateks ühenditeks, mis seejärel fermentatiivsete bakterite rakkudest erituvad. Selles faasis toodetud ühendite hulka kuuluvad lenduvad rasvhapped (VFA), alkoholid, piimhape, CO₂, H₂, NH₃ ja H₂S, mis on samuti uus rakumaterjal. (Henze et al., 2008) Atsetogeneesi, mis on hapete vahepealne tootmine, kus laguproduktid muudetakse atsetaadiks, vesinikuks (H₂) ja CO₂-ks. (Henze et al., 2008)

Metanogeneesi käigus muudetakse atsetaat, vesinik ja karbonaat, formiaat või metanool metaaniks, CO₂-ks ja uueks rakumaterjaliks. (Henze et al., 2008)

1.2. Lenduvad rasvhapped (VFA-d)

Lenduvateks rasvhapeteks (VFA), tuntud ka kui lühikese ahelaga rasvhapped (SCFA), peetakse vastavalt orgaaniliste ühendite süstemaatilisele nomenklatuurile 1–6 süsinikuaatomiga karboksüülhappeid: metaan-, etaan-, propaan-, butaan-, pentaan- ja heptaanhape. Erialases kirjanduses kasutatakse ka triviaalseid nimetusi nagu näiteks äädikhape, propioonhape jt. Need happed (enamasti äädik- ja propioonhape) on potentsiaalselt taastuvad süsinikuallikad ja neil on lai valik kasutusalasid, nagu bioplasti, biogaasi, biodiisli tootmine ning toitainete bioloogiline eemaldamine reoveest. (Mu et al., 2018)

Lenduvad rasvhapped on anaeroobse lagunemise (atsidogeneesi) vaheproduktid ja nende logaritmilise happed dissotsiatsioonikonstandist (pKa) on tavaliselt vahemikus 4–5, mis tagab selles pH vahemikus puhverduisvõime. Kõrge VFA kontsentratsioon põhjustab pH languse ja

mikroorganismide inhibeerumise, mille tulemuseks võib olla ebastabiilne keskkond. VFA-de määramine on vajalik anaeroobsete reaktorite töötingimuste hindamiseks. (V. T. Mota et al., 2015)

Üldiselt on VFA-de tootmine reoveest anaeroobne protsess, mis hõlmab atsidogeneesi, mida tuntakse ka kui atsidogeenset kääritamist või tumekääritamist. VFA-de tootmise maksimeerimiseks on tehtud mitmeid jõupingutusi, uurides eri tüüpi jäätmeid ja reguleerides anaeroobse reaktori töötingimusi.

1.3. VFA-de määramismeetodid

Tuntumad VFA-de määramismeetodid on gaaskromatograafia, tiitrimine, kolorimeetria, destilleerimine. Võrreldes aeganõudva destilleerimise, ebatäpse kolorimeetria ja kalli gaaskromatograafiaga on tiitrimine eelistatud meetod VFA kontsentratsiooni määramiseks. (Mu et al., 2018)

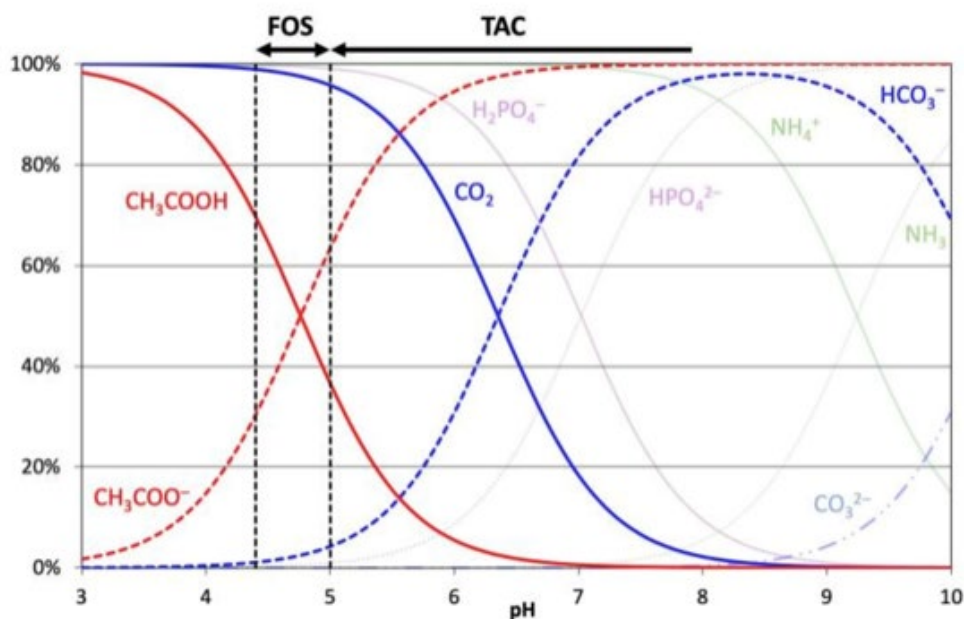
Gaaskromatograafia on segus olevate ühendite eraldamise protsess, mille käigus proov aurustatakse ja liikuv gaasifaas ehk kandegaas kannab seda läbi kolonni. Erinevate komponentide eraldamine toimub nende suhtelise aururõhu ja afiinsuse alusel statsionaarse faasi suhtes. Tehnika toimimiseks peavad analüüsitavad komponendid olema lenduvad ja termiliselt stabiilsed. See on üks täpsem analüütiline meetod. (Fernández et al., 2016)

Kuna VFA-d on termostabiilsed ja lenduvad ühendid, saab neid gaaskromatograafia abil kergesti eraldada, muutes need seega mõõdetavaks. Üldiselt pakub gaaskromatograafia kõrget eraldusvõimet, madalaid tuvastamispiire ja laia dünaamilist ulatust, kuid kuna seda kasutatakse keerukate maatriksite jaoks, on vaja rohkem proovi eeltötlust, mistõttu on see töömahukas ja kulukas tehnika. (Fernández et al., 2016)

Lihtsamad meetodid VFA-de ja leelisuse määramiseks põhinevad happe-aluse tiitrimisel, mis on lihtne ja odav meetod. Tiitrimisel tugeva happega (HCl või H₂SO₄) jälgitakse reagenti kulu ja pH muutumist vastavalt süsihappe- ja äädikhappe dissotsiatsioonikontstantidele. (Liu et al., 2021)

Joonisel 1 tähistab TAC üldleelisust ning FOS lenduvaid rasvhappeid. Esimese etapina tiitritakse proovi happega kuni pH-ni 5, millega määratakse leelisust põhjustavate vesinikkarbonaationide ja süsihappegaasi sisaldust proovis. Jooniselt on näha, et pH 4–5 juures on proovis veel HCO₃⁻ ja ka CO₂, kuigi töö teise etapina alustatakse juba rasvhapete tiitrimist. Liu jt (Liu et al., 2021) on leidnud, et VFA-de sisalduse tiitrimisel pH vahemikus 4–5 tuleb arvestada, et tulemusest umbes 5% moodustavad anorgaanilised süsinikuühendid.

Sarnane kattuvus on pH vahemikus 5–6, kus leelisuse tiitrimise vahemikus määratakse ka VFA-sid, peamiselt dissotsieerunud kujul.



Joonis 1. Erinevate ühendite happe-aluse tasakaalud pH funktsioonina 25° C juures (Liu et al., 2021)

Tiitrimismeetoditel on eeliseks lihtsus, kiirus ja madal hind, selle peamiseks puuduseks on aga madal selektiivsus, hapete eristamise ja detekteerimise keerulisus ning nende ebatäpsus, mis on tingitud segavate ühendite olemasolust. Anaeroobsete reaktorite seireks kasutatakse laialdaselt Ripley, Kapi ja DiLallo meetodeid. (V. T. Mota et al., 2015)

Käesolevas bakalaureusetöös on kasutatud tiitrimis- ja spektrofotomeetrilist meetodit.

1.4. pH ja leelisus anaeroobses käärítés

Anaeroobse käärítamise protsessi pH on üldiselt vahemikus 6,0–8,5. Kuna metanogeenide optimaalne kasv on neutraalse pH ümber, võivad sellest vahemikust välja jäävad väärtused nende kasvu pärssida, põhjustades käärítit ebastabiilset jõudlust ja mõnikord isegi protsessi ebaõnnestumist. Seetõttu on väga oluline säilitada metanogeense tegevuse jaoks optimeeritud pH, et tagada käärítimisprotsessi jätkuv toimimine. Vajaliku puhversüsteemi selleks annab leelisus, mida antud pH vahemikus põhjustavad peamiselt vesinikkarbonaatioonid. pH kasvamisel lisanduvad karbonaatioonid ning madalate pH väärtuste juures esineb süsteemis lahustunud CO₂. Lisaks omavahel pH-st sõltuvas tasakaalus olevatele anorgaanilistele süsinikühenditele seovad vesinikioone ka muud anioonid, kuid nende osa leelisuses on juba väiksem. Anaeroobse käärítit opereerimise seisukohalt on leelisus oluline keskkonna stabiilsena

hoidmiseks, tagades käärimisprotsessi puhverduisvõime happeid neutraliseerida. Kõrgemad leelisuse kontsentratsioonid väljendavad anaeroobse kääriti võimet seista vastu pH muutustele ja aitavad seda stabiliseerida. (Onwosi et al., 2019)

Leelisust näitab proovis leiduvate anorgaaniliste anioonide võimet siduda vesinikioone, mida väljendatakse molaarse kontsentratsiooniga. Praktikas kasutatakse mitmesuguseid erinevaid ühikuid, nagu kareduskraadid, meq/l, mg Ca²⁺/l ja ppm. Bakalaureusetöös on leelisus väljendatud kui mg CaCO₃/l, mis näitab, kui palju CaCO₃ tuleb vees lahustada sama leelisusega proovi saamiseks. (Onwosi et al., 2019)

2. Metoodika

Töös võrreldakse kolme erinevat metoodikat lenduvate rasvhapete määramiseks: Nordmanni FOS/TAC meetod (Nordmann) automaattitraatoriga, HACH *Organic acid (fatty acid)/Butanoic acid LCK365* kolorimeetrist metoodikat (HACH) küvettidega ning DiLallo ja Albertson'i tagasitiitrimismetoodikat lenduvate rasvhapete (VFA) ja leelisuse kontsentratsiooni määramiseks (DiLallo&Albertson). Analüüsiti tööstusreovee anaeroobse seadme sisse- ja väljavoolu ning valideerimislahuseid.

Kõikide proovide temperatuurid peavad olema vahemikus 15–35°C. Hõljuvaine eemaldamiseks tsentrifuugitakse või filtreeritakse analüüsitavad proovid läbi 25 µm pooridega filterpaberi.

Lenduvate rasvhapete analüüsimise tulemus näitab erinevaid rasvhappeid kokku, seega määratakse kompleksparameetrit. Ühikutena kasutatakse milliekvivalente, millimoole ja etaanhappele vastavaid milligramme liitri kohta. Viimane ühik võib olla käepärane anaeroobse reaktori opereerimisel, kuna näitab, kui palju etaanhapet tuleks võtta sama suure lenduvate rasvhapete sisalduse saavutamiseks. Milliekvivalent on aine kogus, mis vastab ühele moolile vesinikioonidele. Kasutades etaanhapet mudelmolekulina, on milliekvivalendid ja millimoolid võrdsed, milligrammid saadakse korrutamisel CH_3COOH molaarmassiga (60 g/mol).

2.1. Nordmanni FOS/TAC metoodika

Metoodika põhineb Nordmanni FOS/TAC meetodil, mida Hach Company on modifitseerinud proovi kogusega. FOS/TAC suhe on fermentatsiooniprotsesside hindamise indikaator. FOS (saksa k. *Flüchtige Organische Säuren* – lenduvad orgaanilised happed) väärtus vastab lenduvate rasvhapete sisaldusele ning TAC (*total inorganic carbon*) väärtus on leelisus ehk proovi puhvermahtuvuse hinnang. Tulemused arvutatakse empiiriliselt Nordmanni meetodi järgi. (Liu et al., 2021)

Analüüsiks kasutatav seade on Hach AT1000 *Biogas Titrator*, mille FOS/TAC mg/l programm töötab Nordmanni meetodi põhisel.

Nordmanni meetod FOS-i määramiseks põhineb katsetel 20 ml proovi ja 0,1 N (vastab 0,05 mol/l) H_2SO_4 lahusega. Automaattitraatori valem on tootja poolt kohandatud 5 ml proovi määramiseks. Oluline on teha tiitrimine Nordmanni tingimustele võimalikult lähedal. (Liu et al., 2021)

Programmi FOS/TAC mg/l kuvatavad tulemused on:

- TAC mg CaCO₃/l
- FOS mg CH₃COOH/l
- FOS/TAC.

2.1.1. Määramisprotseduur

Proovi filtreeritakse läbi 25 µm poori suurusega filterpaberi, võetakse 5 ml proovi proovitopsi ja lisatakse 50 ml destilleeritud vett. Segu tiitrimiseks käivitatakse peamenüüs FOS/TAC mg/l väärtuse rakendus ning tiitritakse 0,1 N H₂SO₄ lahusega pH 5,0-ni. Kulunud happe hulga järgi arvutab seade leelisuse väärtuse ühikutes mg CaCO₃/l. Seade jätkab automaatset tiitrimist kuni pH-ni 4,4, mille alusel arvutab lenduvate rasvhapete (FOS) väärtuse ühikutes mg CH₃COOH/l. Titraator teeb kõiki tiitrimisetappe ja arvutusi automaatselt ning kuvab saadud tulemuse ekraanile.

2.1.2. Tulemuseks kasutatavad empiirilised arvutused

Nordmann'i meetodikal põhinevad empiirilised valemid (Liu et al., 2021) VFA (FOS) ja üldleelisuse (TAC) kontsentratsioonide arvutamiseks (1 ja 2):

$$\text{FOS} = ((B \times 4 \times 1,66) - 0,15) \times 500, \quad (1)$$

$$\text{TAC} = \frac{A \times C \times 50045}{SA}, \quad (2)$$

kus:	A	titrandi maht pH-ni 5,0	(ml)
	C	titrandi (H ₂ SO ₄) kontsentratsioon	(0,1 N)
	SA	proovi maht	(ml)
	B	titrandi maht pH 5,0-st kuni pH 4,4-ni	(ml)

2.2. DiLallo ja Albertsoni tagasitiitrimismetoodika

Antud meetoodika on empiiriline tagasitiitrimise meetod, mis on välja töötatud DiLallo ja Albertsoni poolt, aastal 1961. (Lahav & Morgan, 2004)

Metoodika kohaselt tiitritakse proovi vesinikkloriidhappe lahusega pH vahemikku 3,3–3,5, mis vastab leelisusele. Seejärel proovi kergelt keedetakse 3 minutit CO₂ eemaldamiseks. DiLallo&Albertsoni meetoodika järgmiseks etapiks on naatriumhüdroksiidi lahusega tiitrimine

pH-ni 7, mille käigus saadakse VFA kontsentratsiooni arvutamiseks NaOH kogus. (Lahav & Morgan, 2004)

Käesolevas töös on DiLallo&Albertsoni meetodika anaeroobse tehnoloogia tarnija poolt modifitseeritud pH vahemikuga- HCl tiitrimine pH-ni 3,0 ning NaOH-ga tiitrimine 6,5-ni.

Analüüsis kasutatavad reagentid on 0,1 M vesinikkloriid (HCl) ning 0,1 M naatriumhüdrokksiid (NaOH). Analüüsiks vajalikud seadmed on kuumuskindel kolb 250 ml, pliit, Friedrich'i püstjahuti, tsentrifuug ja tsentrifuugitoru või vähese tuhasisaldusega filterpaber poorisuurusega 25 µm, pH - meeter, magnetsegaja, mõlema reagenti jaoks büretid, keeduklaas, stopper ning mõõtpipett.

Juhendis on märgitud, et täpse tulemuse saamiseks, ei tohi proovis olla VFA-sid rohkem kui 180 mg/l, seega on vajalikud lahjendused. DiLallo ja Albertson on välja toonud ka paranduskoefitsendi (1,5), kui VFA kontsentratsioon on üle 180 mg/l.

2.2.1. Määramisprotseduur

Proov filtreeriti läbi 25 µm paberfiltrit, pipeteeriti 10 ml filtreeritud proov 250 ml keeduklaasi ning lisati 90 ml destilleeritud vett ja magnetsegaja pulga. pH-elektrood asetati lahusesse ning proovi tiitriti 0,1 M HCl lahusega, kuni saavutati pH 3,0 ja märgiti üles tiitritud HCl lahuse maht (Z). Lahus kallati ümarapõhjalisse kolbi ning ühendati Friedrichs'i püstjahutiga. Keedeti lahust õrnalt 3 minutit. Seejärel võeti kolb pliidiplaadilt ja lasti 2 minutit jahtuda jahutiga ühendatult. Jahutit loputati destilleeritud veega. Püstjahuti eemaldati ning kolb sulgeti ja lasti proovil jahtuda toatemperatuurini. Vedelik valati ettevaatlikult tagasi 250 ml keeduklaasi ja loputati destilleeritud veega, mis kallati samuti keeduklaasi. Proovi tiitriti 0,1 M NaOH-ga, kuni saavutati pH 6,5 ja märgiti üles tiitritud NaOH lahuse maht (B).

DiLallo ja Albertson'i meetodikal põhinevad empiirilised valemid (Laan & Hobma, 1978) VFA ja leelisuse arvutamiseks (3 ja 4):

$$\text{VFA} = \frac{(B \times 101) - (Z + 100)}{99,23} \times \frac{100}{V} \quad (3),$$

kus:	VFA	lenduvate rasvhapete kontsentratsioon	(meq/l)
	Z	tiitritud 0,1 M HCl maht	(ml)
	B	tiitritud 0,1 NaOH maht	(ml)
	V	proovi maht	(ml)

$$\text{Leelisus} = (Z - B) \times \frac{100}{V} \quad (4),$$

kus:	Leelisus	üldleelisuse kontsentratsioon	(meq/l)
	Z	tiitritud 0,1 M HCl maht	(ml)
	B	tiitritud 0,1 NaOH maht	(ml)
	V	proovi maht	(ml)

Tulemused on väljendatud meq/l, et saada ühik milligrammi liitri kohta, korrutatakse leelisuse tulemus CaCO_3 molaarmassiga ($M= 100 \text{ g/mol}$) ning VFA tulemus CH_3COOH molaarmassiga ($M= 60 \text{ g/mol}$).

2.2.2. Segavad faktorid

DiLallo ja Albertsoni pakutud meetodil on mitmeid puudusi. Nimelt meetod nõuab nii happe kui ka aluse kohustuslikku lisamist ning proovi keetmist, mis muudab protsessi pikaajaliseks ja ressursikulukaks. Lisaks nendivad Lahav & Morgan, (2004), et mitmed protseduuri etapid võivad põhjustada suurt ebatäpsust. Kuigi DiLallo ja Albertson soovivad 3-minutilist „õrna“ keetmist, siis sellist protseduuri on keeruline standardiseerida ning proovi keetmisel CO_2 eemaldamiseks võib eralduda ka lenduvaid rasvhappeid. Metoodikas on välja toodud paranduskoefitsient VFA kontsentratsioonidele, mis ületavad 180 mg/l (1,5), kuid Lahav & Morgan, (2004) läbiviidud uuringus andis antud koefitsiendi kasutamine VFA kontsentratsioonides 23% vea.

2.3. HACH küvett kolorimeetriline metoodika

HACH metoodika on küvetttestidega spektrofotomeetriline protseduur, mis põhineb Montgomery meetodil. Meetodi põhimõte on määrata kolorimeetriliselt raudhüdrosamaadiga karboksüülseid. Kõik proovis leiduvad VFA-d on esitatud nende ekvivalentidena mg CH_3COOH /l kohta. Seda meetodit iseloomustab lihtne protseduur, üldiselt kättesaadavad reaktiivid ja lühike analüüsiaeg. (Siedlecka et al., s.a.)

Rasvhapped reageerivad happelises keskkonnas dioolidega, moodustades rasvhapete estereid. Neid redutseerivad raud(III)soolad, moodustades punaseid komplekse, mida hinnatakse spektrofotomeetriliselt. (Hach Company, 2020)

Metoodika määramispiirkond on 50-2500 mg/l CH_3COOH või 75-3600 mg/l $\text{C}_3\text{H}_7\text{COOH}$. (Hach Company, 2020)

Vastavalt LCK365 juhendile soojendatakse termostaati esterdamiseks 100° C-ni ja küvette kuumutatakse 10 minutit. (Hach Company, 2010)

HACH küvettidel on peal triipkoodid, mille kaudu spektrofotomeeter tuvastab, millise analüüsiga tegu on ja määrab automaatselt vajaliku lainepikkuse, mis antud meetodika puhul on 495 nm.

Analüüsis kasutatavad reagentid on märgistatud A, B, C, D. Küvett sisaldab etüleenglükooli ((CH₂OH)₂), seega, A – 19,5 N väävelhape (H₂SO₄), B - 10% hüdroksüülamiin vesinikkloriid (NH₂OH · HCl), C - 4,5 N naatriumhüdroksiid (NaOH) ning D - raud(III)kloriid (FeCl₃) (Siedlecka et al., s.a.). Analüüsis kasutatavad seadmed on HACH LCK365 küvetttestid, 1 ml automaatpipett, termostaati (Hach HT200S), spektrofotomeeter (Hach DR3900) ning stopper.

2.3.1. Määramisprotseduur

Küvetid sisaldavad etüleenglükooli, kuhu pipeteeritakse 0,4 ml reagenti A ning 0,4 ml proovi. Seejärel sulletakse küvett ja pööratakse paar korda ümber, et kõik seguneks. Küvett sisestatakse 10-ks minutiks termostaati, mis on soojendatud 100°C-ni. Küvett peab pärast kuumutamist laskma jahtuda toatemperatuurini ja siis lisada ülejäänud reagentid. Pärast iga reagenti lisamist peab küveti sulgema ja pöörama, et proov oleks segunenud. Seega, 0,4 ml reagenti B, 0,4 ml reagenti C ning 2 ml reagenti D. Seejärel peab laskma küvetil seista 3 minutit ning mõõta kolorimeetriliselt.

2.4. Valideerimislahused

Bakalaureusetöös valmistati meetodite kontrollimiseks valideerimislahused, et võrrelda erinevate meetoditega saadud tulemusi. Valideerimislahused valmistati Hach Company poolt avaldatud „EZ7252 *Volatile Fatty Acids and Total Alkalinity analyser*“ juhendi järgi. Valideerimislahused on mõeldud seadme AT1000 *Biogas Titrator* kontrolliks, mis põhineb Nordmanni meetodikal, kuid antud lahuseid kasutati ka DiLallo&Albertsoni ja HACH meetodikate kontrolliks. (Hach Company, 2021)

2.4.1. Kontrolliks kasutatavad reagentid ja valmistamisjuhend

Tabel 1. Põhilahusteks vajalikud ühendid ja kogused

Kasutatavad ühendid	Valem	Molaarmass (g/mol)	Kaalutis (g) 1 liitri lahuse kohta
Naatriumatsetaat	$C_2H_3NaO_2$	82,03	13,67
Naatriumvesinikkarbonaat	$NaHCO_3$	84,01	84,04

10000 mg CH_3COOH/l lenduvate rasvhapete põhilahuse valmistamiseks lahustati täpselt 13,67 g naatriumatsetaati 300 ml destilleeritud vees, kasutades 1000 ml mõõtekolbi. Seejärel täideti kuni 1000 ml-ni destilleeritud veega. (Hach Company, 2021)

50000 mg $CaCO_3/l$ üldleelisuse põhilahuse valmistamiseks lahustati täpselt 84,04 g naatriumvesinikkarbonaati ($NaHCO_3$) 300 ml destilleeritud vees, kasutades 1000 ml mõõtekolbi. Seejärel täideti kuni 1000 ml-ni destilleeritud veega. (Hach Company, 2021)

Uuritavas tööstusreovees ulatusid VFA kontsentratsioonid ligikaudu 200–2000 mg/l, leelisuse kontsentratsioonid 500 – 2000 mg/l. Kuna käesolevas bakalaureusetöös on peamiseks uuringuteemaks VFA-de kontsentratsioon, tehti VFA põhilahusest kuus erineva kontsentratsiooniga valideerimislahust ning üldleelisuse põhilahusest tehti üks valideerimislahus, mis jäi igas lahuses samaks. 10000 mg/l VFA põhilahusest tehti 126 mg/l, 180 mg/l, 300 mg/l, 480 mg/l, 720 mg/l ja 1000 mg/l VFA lahused. Üldleelisuse jaoks tehti 50000 mg/l $CaCO_3$ põhilahusest 1000 mg/l $CaCO_3$ lahus. Kõik lahjendused tehti 100 ml-sse mõõtekolbi.

Tabel 2. Lahjenduskordajad 10000 mg/l VFA põhilahusest valideerimislahuste valmistamiseks

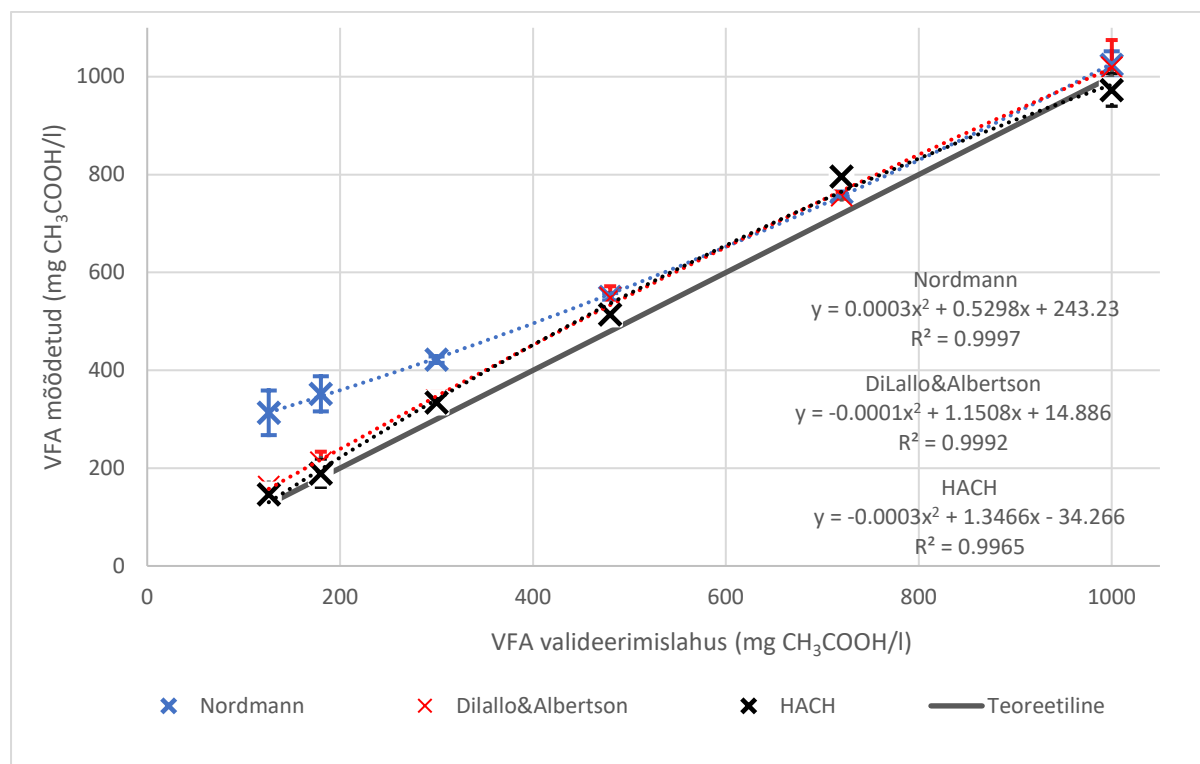
Kontsentratsioon (mg CH_3COOH/l)	126	180	300	480	720	1000
Lahjenduskordaja	79,37	55,56	33,3	20,83	13,89	10

3. Tulemused ja analüüs

3.1. Valideerimislahuste tulemused ja analüüs

Bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida lenduvate rasvhapete määramismetoodikate mõõtemääramatust ning leida korrektsioonifunktsioon mõõtmisandmete täpsustamiseks. Seejuures on üheks hüpoteesiks, et kõrgeim mõõtemääramatus on praktikas eelistatava automaat-tiitrimise meetodi madalamate lenduvate rasvhapete mõõdetud väärtuste puhul. Töö käigus viidi läbi analüüsid kindla teadaoleva kontsentratsiooniga lahustega ning koostati kõikidele uuritud meetodikatele korrektsioonifunktsioonid.

VFA valideerimislahused tehti kontsentratsioonidel 126 mgCH₃COOH/l, 180 mgCH₃COOH/l, 300 mgCH₃COOH/l, 480 mgCH₃COOH/l, 720 mgCH₃COOH/l ja 1000 mgCH₃COOH/l. Leelisuse kontsentratsioon oli kõikides valideerimislahustes sama – 1000 mg CaCO₃/l.



Joonis 2. Nordmann FOS/TAC, DiLallo&Albertson ja HACH küvett meetodikatega valideerimislahuste mõõdetud tulemused võrreldes valideerimislahuste teoreetilise kontsentratsiooniga (teoreetiline trendijoon). Paralleelmõõtmiste veapiirid väljendavad standardhälvet.

Jooniselt 2 ilmneb sissejuhatuses mainitud hüpoteesi kinnitus- Nordmanni FOS/TAC meetodika hindab VFA madalaid kontsentratsioone silmnähtavalt üle, mida kõrgemaks

konsentratsioon lähed, seda lähemal on mõõdetud tulemused teoreetilisele trendijoonele. DiLallo&Albertsoni ja HACH meetoodika mõõtmistulemused paigutuvad stabiilselt teoreetilise trendijooneläheduses. Mõõdetud tulemuste protsendiline erinevus on välja toodud tabelis 3.

Tabel 3. Lenduvate rasvhapete analüüsitulemuste keskmine eksperimentaalne tulemuse erinevatel kontsentratsioonidel ning selle erinevus valideerimislahustest (%)

Meetod/konsentratsioon	126 mg/l	180 mg/l	300 mg/l	480 mg/l	720 mg/l	1000 mg/l	Keskmine %
Nordmann (%)	148,41	95,44	40,56	14,64	6,04	2,42	51,25
DiLallo&Albertson (%)	28,95	18,02	12,95	14,20	5,14	1,97	13,54
HACH küvett (%)	16,01	5,06	11,33	7,08	10,60	2,70	10,02

Nordmanni FOS/TAC meetoodika erineb valideerimislahuste teoreetilisest kontsentratsioonist keskmiselt 51,25%, DiLallo ja Albertsoni meetoodika 13,54% ja HACH küvett meetoodika 10,02%.

3.1.1. Meetoodikate korrektsioonifunktsioonid

Käesolevas bakalaureusetöös tehti valideerimislahuste mõõtmises kajastuvate tulemuste põhjal Nordmanni, DiLallo ja Albertsoni ja HACH meetoodikatele korrektsioonifunktsioonid. Valideerimislahuste analüüsidel saadud tulemused on kantud joonisele 3. Nende tulemuste kirjeldamiseks on arvatud 2. astme polünoom, mis kirjeldab Nordmanni meetoodikaga mõõdetud tulemuste puhul 99,92% ($R^2 = 0,9997$), DiLallo ja Albertsoni meetoodika puhul 99,92% ($R^2 = 0,9992$) ja HACH meetoodika puhul 99,65% ($R^2 = 0,9965$) uuritava tunnuse hajuvusest. Et saadud polünoome saaks kasutada edaspidi korrektsioonifunktsioonidena, tuleb leida pöördfunktsioonid uuritavates vahemikes. Pöördfunktsioonid (5, 6 ja 7) vastavalt meetoditele on kujul:

$$\text{Nordmann: } y = -0,000465x^2 + 1,843x - 403,112 \quad (5)$$

$$\text{DiLallo\&Albertson: } y = 0,0002x^2 + 0,8295x - 7,4815 \quad (6)$$

$$\text{HACH küvett: } y = 0,0003x^2 + 0,645x + 39,893 \quad (7),$$

kus: x on meetodiga mõõdetud tulemus ja y on korrigeeritud VFA tulemus.

Korrektsioonifunktsioon peaks teoreetiliselt hästi töötama madalate kontsentratsioonitulemuste korrigeerimiseks, kuna valideerimislahuseid tehti vaid vahemikus

126–1000 mg CH₃COOH /l. Et teada, kuidas uuritavad meetodikad kõrgemaid VFA kontsentratsioone mõõdaksid, tuleks teha kontrollkatseid suuremas vahemikus.

Saadud korrektsioonifunktsioone kontrolliti valideerimislahuste tulemustega ning kasutati sisse- ja väljavoolu tulemuste võrdluses.

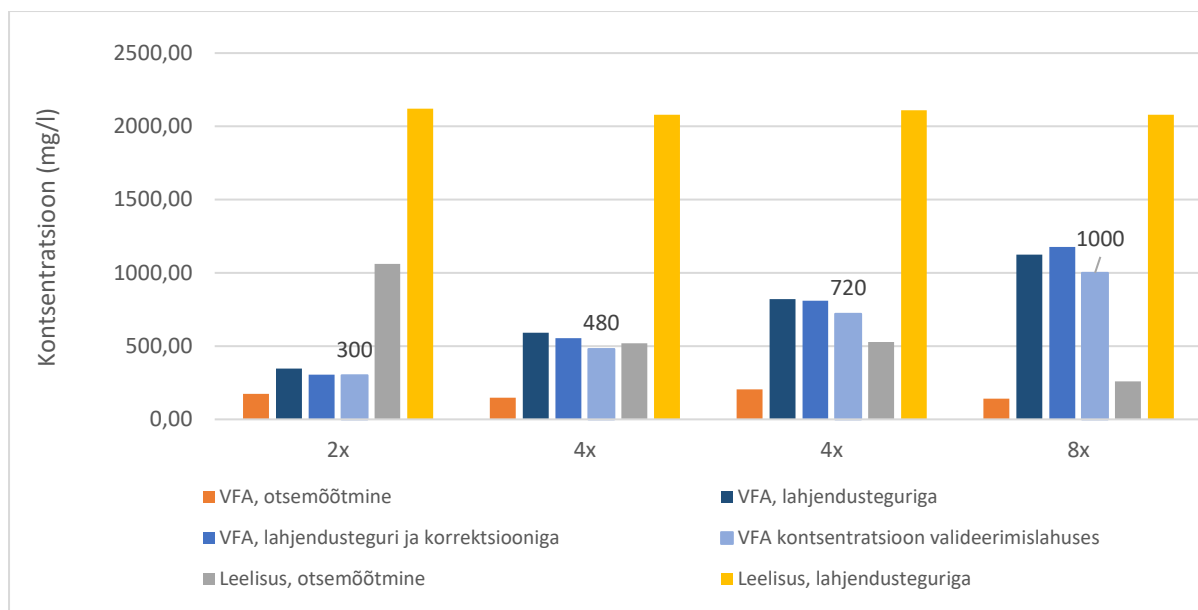
Tabel 4. Korrektsioonifunktsiooniga läbi arvatud keskmiste VFA eksperimentaaltulemuste erinevus valideerimislahuste teoreetilisest kontsentratsioonist (%)

Meetod/kontsentratsioon	126 mg/l	180 mg/l	300 mg/l	480 mg/l	720 mg/l	1000 mg/l	Keskmine %
Nordmann (%)	1,70	4,25	2,91	2,07	1,76	0,38	2,18
DiLallo&Albertson (%)	5,22	1,25	1,15	5,69	2,09	4,63	3,34
HACH küvett (%)	11,59	4,09	3,71	6,09	3,32	4,83	5,61

Tabelist 4 on näha meetodikate korrekteeeritud tulemuste paremat kokkulangevust valideerimislahuste teoreetilise kontsentratsiooniga, kui oli näidatud tabelis 3. Võrreldes erinevate meetodikate valideerimislahuste korrekteeeritud mõõtmistulemusi, saime madalaima keskmise erinevuse teadaolevast kontsentratsioonist Nordmanni FOS/TAC meetodikaga. Viimane asjaolu on oluline tulemus bakalaureusetöö rakendatavuse seisukohalt. Korrektsioonifunktsiooni rakendamine võimaldab oluliselt täpsemalt lenduvate rasvhapete määramist kiire ja lihtsa automaat-tiitrimise meetodiga, mida kasutatakse praktikas anaeroobse käärsti protsesside jälgimiseks.

3.1.2. Proovi lahjendamise mõju DiLallo ja Albertsoni meetodika tulemustele

Bakalaureusetöö hüpoteesi, et mõõtmismetoodika (eriti automaat-tiitrimise) tulemuse mõõtemääramatus võib sõltuda proovi sisaldusest, kontrollimiseks, viidi läbi uuring lahjendatud proovidega DiLallo ja Albertsoni meetodikale. Juhendi järgi on meetodi määramispiir VFA-de suhtes 180 mgCH₃COOH/l, kuid mitmed keskkonnaproovid on kõrgema lenduvate rasvhapete sisaldusega (vt. Joonis 6).



Joonis 3. Proovi lahjendamise mõju lenduvate rasvhapete ja leelisuse määramisel DiLallo ja Albertsoni meetodiga.

Valideerimislahuste lahjendatud proovide tulemustest nähtub, et korrektsioonifunktsiooni rakendamine lähendab mõõtmistulemust kontrollkontsentratsioonile, kuid alates kontsentratsioonist 480 mgCH₃COOH/l saadakse lahjendustegurit arvesse võttes kuni 15% kõrgemad tulemused.

3.1.3. Leelisuse sisalduse mõju hinnang Nordmanni meetodika tulemustele

Leelisuse määramiseks tiitritakse Nordmanni meetodis proovi H₂SO₄ lahusega pH-ni 5, kuid seejuures võidakse analüüsida ka väheses koguses lenduvaid rasvhappeid. Selle hüpoteesi kontrollimiseks viidi automat-titraatoriga läbi analüüsiseeria, kus proovides muudeti lenduvate rasvhapete sisaldust, kuid leelisus oli kõikidel juhtudel 1000 mgCaCO₃/l (Tabel 5).

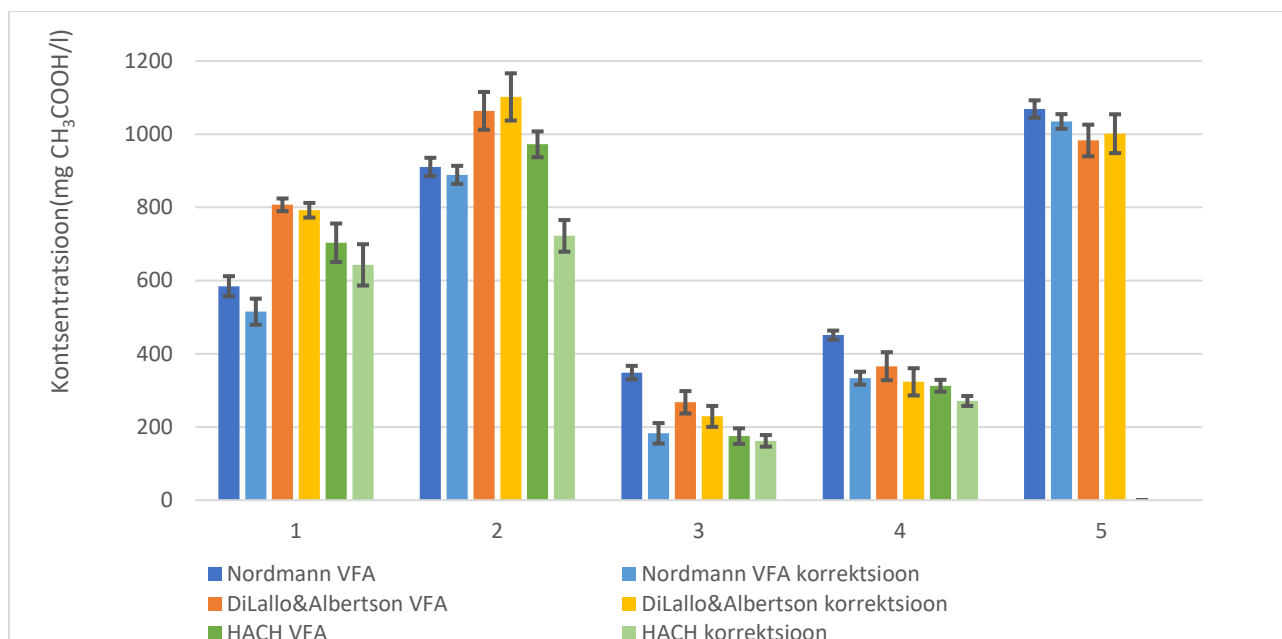
Tabel 5. Leelisuse mõõtetulemuse muutus sõltuvalt lenduvate rasvhapete kontsentratsioonist ning kõrgete leelisuse sisalduste mõju VFA-de määramistulemusele. Valideerimislahuse leelisus on kõigil juhtudel 1000 mgCaCO₃/l, tulemused vähemalt 3 paralleelkatse keskmised

Lenduvate rasvhapete kontsentratsioon valideerimislahuses (mgCH ₃ COOH/l)	126	180	300	480	720	1000
Mõõdetud leelisus (mgCaCO ₃ /l)	961	963	985	1018	1050	1091
Mõõdetud ja korrekteeritud lenduvate rasvhapete kontsentratsioon, (mgCH ₃ COOH/l)	120	183	291	470	733	977
Mõõdetud ja korrekteeritud rasvhapete kontsentratsiooni erinevus kontrollist, (%)	4,4	1,9	2,9	2,0	1,8	2,3

Tabel 5 toodud andmetest nähtub, et automaat-tiitrimise seade mõõdab kõrgemate lenduvate rasvhapete kontsentratsioonide juures ka kõrgemaid leelisuse väärtusi. Tiitrimise meetod ei ole spetsiifiline leelisuse suhtes ning osaliselt määratakse ka lenduvaid rasvhappeid. Sarnaselt mõjutab leelisuse sisaldus VFA-de määramist, kuna pH 5 juures on lahuses veel vesinikkarbonaatiooni. Eksperimentaalsete ja korrekteeritud mõõtetulemuste väike erinevus teadaolevast kontsentratsioonist langeb kokku Liu jt (*Liu et al., 2021*) uuringuga, et lenduvate rasvhapete määramisel moodustavad tulemusest umbes 5% anorgaanilised süsinikuühendid.

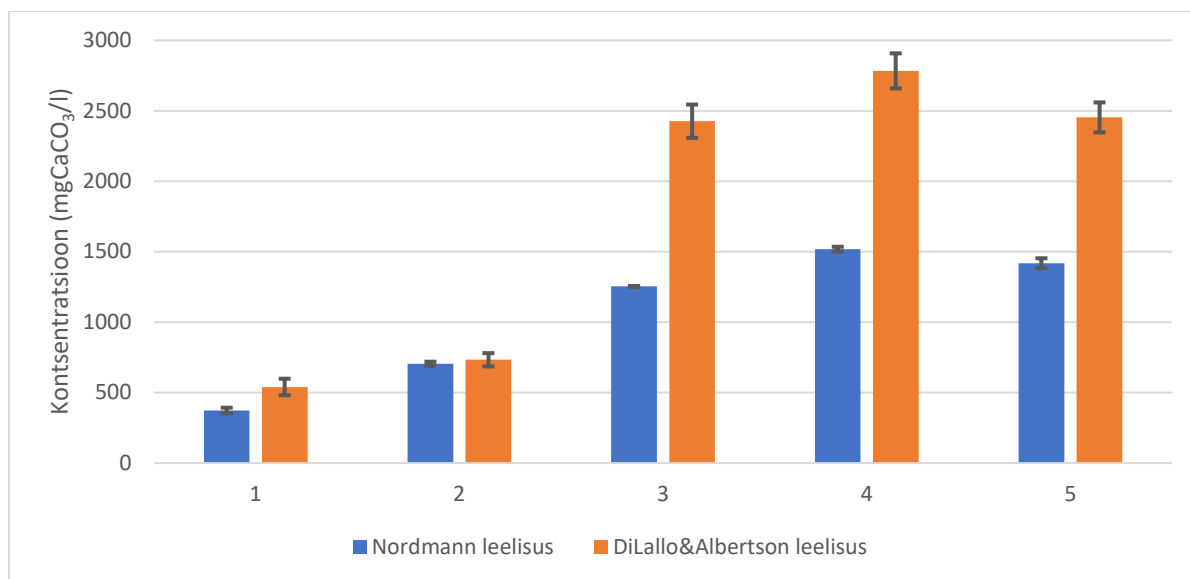
3.2. Anaeroobse kääríti veeproovide analüüsitulemused

Töö käigus mõõdeti Nordmann, DiLallo&Albertson ja HACH meetodikatega viite proovi erinevate VFA sisadustega. Proovid 1 ja 2 on sissevoolust; 3, 4 ja 5 väljavoolust. Nii sisse- kui väljavoolule tehti kõikide meetodikatega kolm paralleelproovi ning arvutati tulemuste keskmine, mis kajastuvad joonistel 4 ja 5. Joonisele 4 on lisatud kõikidele meetoditele koostatud korrektsioonifunktsiooniga läbi arvutatud keskmised tulemused.



Joonis 4. VFA kontsentratsioonide analüüsitulemused sisse- ja väljavooluproovides, lisaks kõikide meetodite korrektsioonifunktsiooniga arvatud tulemused. Iga proovi puhul on kasutatud kolme eri meetodikat: Nordmann FOS/TAC, DiLallo&Albertson ja HACH küvett. Paralleelmõõtmiste veapiirid väljendavad standardhälvet.

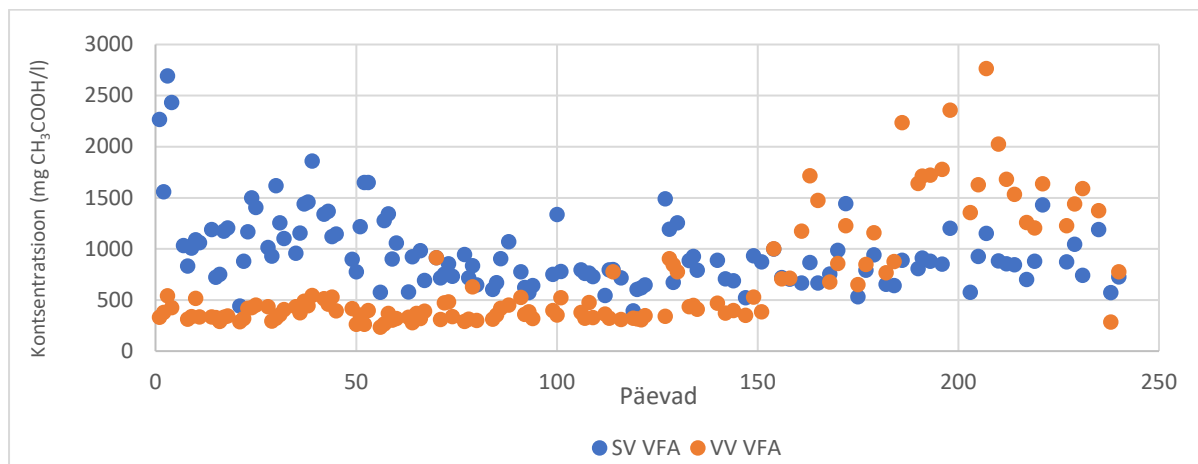
Jooniselt 4 ilmneb korrekteeritud tulemuste madalamatel VFA kontsentratsioonidel meetodikate analüüsitulemuste parem kokkulangevus, võrreldes mõõdetud väärtustega. Proovide 1 ja 2 tulemustes on näha suurt meetodikate vaheliste analüüsitulemuste erinevust, kus korrektsioonifunktsiooni kasutamine kaasa ei aidanud. See viitab peatükis 3.1.1 välja toodud hüpoteesile, et arvatud korrektsioonifunktsioone ei saa usaldusväärselt kasutada VFA kontsentratsioonidel üle 1000 mg CH₃COOH/l. Samuti korrektsioonifunktsioon ei pruugi töötada anaeroobse kääríti proovide kõrgetel kontsentratsioonidel samaväärselt valideerimislahustega, mille põhjuseks võib olla proovi eripära. 5. proovi korrekteeritud Nordmanni ja DiLallo&Albertsoni tulemustes on näha head kokkulangevust, kuigi VFA kontsentratsioon on 1000 mg/l läheduses.



Joonis 5. Leelisuse kontsentratsioonide analüüsitulemused sisse- ja väljavooluproovides. Iga proovi puhul on kasutatud kolme eri meetodikat: Nordmann FOS/TAC, DiLallo&Albertson ja HACH küvett. Paralleelmõõtmiste veapiirid väljendavad standardhälvet.

Jooniselt 5 on näha, et proovides 1 ja 2 oli Nordmanni ja DiLallo ja Albertsoni meetodikate leelisuse kontsentratsioon sarnane, kuid proovides 3-5 esineb ligikaudu kahekordne vahe. See võib olla tingitud mineraalsest karboniseerimisest- lagunemisprotsessi käigus tekkinud CO₂ reageerib anaeroobse kääriti lahuses metallioksiididega ning moodustub vastav karbonaat, praegusel juhul kaltsiumkarbonaat. (Salek et al., 2016)

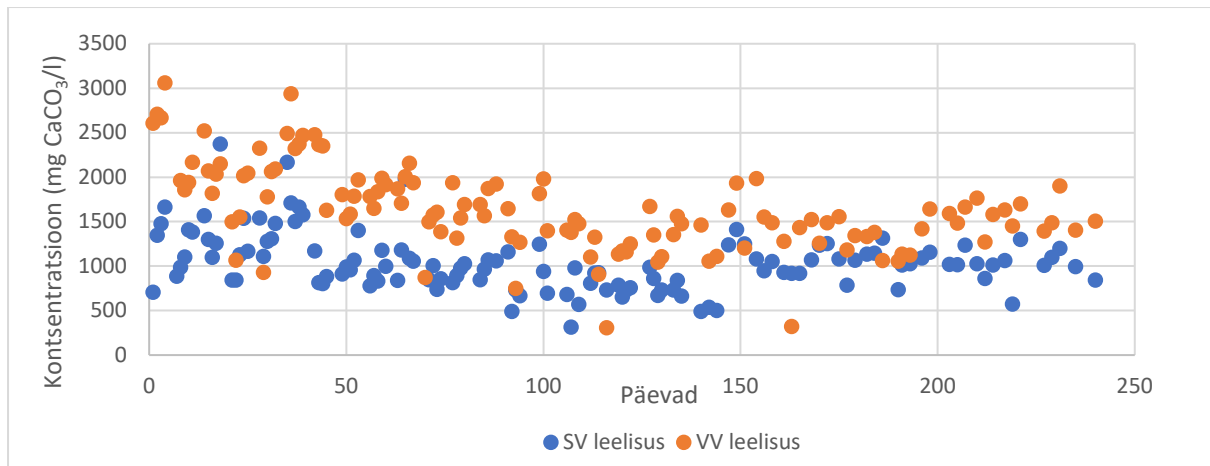
3.3. Aegrida lenduvate rasvhapete ja leelisuse analüüsitulemustest anaeroobse kääriti sisse- ja väljavoolust



Joonis 6. Anaeroobse kääriti sisse- ja väljavooluproovide (vastavalt SV ja VV) VFA kontsentratsioonide mõõtmistulemused Nordmanni meetodit rakendava seadme AT1000 Biogas Titrator'iga kaheksa kuu vältel.

Jooniselt 6 ilmneb kääriti käivitamise alguspäevadel (päevad 1 – 4) sissevoolus kõrgemad VFA kontsentratsioonid, hiljem olukord stabiliseerus ning VFA kontsentratsioonid jäid 500–2000 mg CH₃COOH/l piiridesse, mis on kääriti sissevoolus täiesti normaalne vahemik. Päevadel 1–150 on väljavoolus näha madalaid VFA kontsentratsioone, millest saab järeldada, et VFA-sid tarbivad metanogeensed bakterid suudavad sissevoolust sissekantavat ja kääritist tekkivat VFA-d edukalt ära tarbida ja seeläbi toota metaani, mis viitab anaeroobse kääriti ootuspärasele toimimisele.

Joonisel 6 on näha alates 150-dast päevast lenduvate rasvhapete kontsentratsiooni tõusu, mille kõrgeim piik oli 207-ndal päeval (2760 mg CH₃COOH/l) ja järgnevatel päevadel hakkas vaikselt langema. Viimased päevad (238 ja 240) oli VFA kontsentratsioon jälle kääriti optimaalseks toimimiseks soovituslikus vahemikus. Lenduvate rasvhapete tõus oli tingitud anaeroobse kääriti häirest.



Joonis 7. Anarobse kääriti sisse- ja väljavooluproovide (vastavalt SV ja VV) leelisuse (TAC) kontsentratsioonide mõõtmistulemused Nordmanni meetodit rakendava seadme AT1000 Biogas Titrator'iga kaheksa kuu vältel.

Jooniselt 7 ilmneb sissevoolu leelisuse kontsentratsioonide kõikumine 500–1500 mg CaCO₃/l vahel, väljavoolus on leelisuse kontsentratsiooni kõikumine veidi kõrgemate kontsentratsioonide vahel - ligikaudu 1000–2500 mg CaCO₃/l. Nii sisse- kui väljavoolu proovidel olid mõned mõõtmised kirjeldatud vahemikest väljas, kuid anaerobse tanki opereerimisel jälgitakse proovide kontsentratsioonide valdavalt enamust.

Kokkuvõte

Töö eesmärk oli võrrelda lenduvate rasvhapete kontsentratsiooni määramise meetodikaid tööstusreoveest. Selleks analüüsiti kahte tiitrimismeetodit ja ühte kolorimeetrilist määramismetoodikat ning võrreldi neid tulemuste täpsuse ning meetodika rakendatavuse seisukohast. Bakalaureusetöös töötati välja korrektsioonifunktsioon automaat-tiitimise seadmel AT1000 Biogas Titrator rakendatava Nordmanni FOS/TAC meetodika jaoks.

Töö käigus analüüsiti kuue erineva VFA kontsentratsiooniga (126–1000 mgCH₃COOH/l) valideerimislahuseid ning tööstusreovee anaeroobse seadme sisse- ja väljavoolu.

Metoodikate keskmiste eksperimentaaltulemuste põhjal arvutati protsendilised erinevused valideerimislahustest: Nordmanni FOS/TAC meetod 51,25%, järgnes DiLallo ja Albertsoni meetodika 13,54%-ga ning HACH küvett 10,02%.

Valideerimislahuste mõõtmises kajastuvate tulemuste põhjal arvatud korrektsioonifunktsioonide kasutamine näitas mõõdetud tulemuste paremat kokkulangevust valideerimislahuste teoreetiliste kontsentratsioonidega. Metoodikate keskmiste eksperimentaaltulemuste korrekteeeritud väärtuste keskmised protsendilised erinevused valideerimislahustest: Nordmanni FOS/TAC meetod 2,18%, DiLallo ja Albertsoni meetodil 3,34% ning HACH küvett meetod 5,61%.

Töö käigus uuritud proovi lahjendamise mõju DiLallo&Albertsoni meetodikale näitas, et korrektsioonifunktsiooni rakendamine lähendab mõõtmistulemust kontrollkontsentratsioonile, kuid alates 480 mgCH₃COOH/l saadakse lahjendustegurit arvesse võttes kuni 15% kõrgemad tulemused.

Leelisuse sisalduse mõju hinnang Nordmanni FOS/TAC meetodi tulemustele näitas kõrgemate rasvhapete kontsentratsioonide juures ka kõrgemaid leelisuse väärtusi. See selgitab, et tiitrimise meetod ei ole spetsiifiline leelisuse suhtes ning osaliselt määratakse ka lenduvaid rasvhappeid.

Sisse- ja väljavooluproovides ilmnes kõrgetel VFA kontsentratsioonidel meetodikate vahelistel tulemustel suur erinevus. Tulemuste korrigeerimisel seis ei muutunud. See võib olla tingitud sellest, et valideerimislahused, mille mõõtmiste alusel saadi korrektsioonifunktsioon, tehti kontsentratsioonivahemikus 126–1000 mgCH₃COOH/l. Et korrektsioonifunktsioon hõlmaks suuremat VFA-de vahemikku, tuleks teha mõõtmisi üle 1000 mg CH₃COOH/l. Madalamate kontsentratsioonidega väljavoolu proovidel olid meetodite vahelised erinevused

väiksemad ning meetodite korrekteeritud tulemused ühtisid paremini võrreldes mõõdetud tulemustega.

Kaheksa kuu vältel Nordmanni FOS/TAC analüüsimetoodikaga mõõdetud tulemused näitasid päevadel 1–150 sisse- ja väljavoolus kääriti toimimiseks optimaalset lenduvate rasvhapete sisaldust. Alates 150-dast päevast läks VFA-de kontsentratsioon kõrgeks kuni 207-da päevani ning järgnevatel päevadel hakkas langema. VFA-de kontsentratsiooni tõus oli tingitud anaeroobse kääriti pH langusest ja seetõttu ka rasvhapete kuhjumisest. Sissevoolu leelise kontsentratsioonid püsisid üldiselt stabiilselt vahemikus 500-1500 mg CaCO₃/l, väljavoolus veidi kõrgemas vahemikus – ligi 1000 – 2500 mg CaCO₃/l. Tulemustest järeldati, et lenduvate rasvhapete kontsentratsioonide tõusu ajal jäi leelisus stabiilselt samasse vahemikku. Seega põhjustasid lenduvad rasvhapped anaeroobse reaktori hapestumist ning leelisus kui puhversüsteem ei suutnud pH-d enam tasakaalustada.

Summary

A comparative study of volatile fatty acid analysis methodologies

The aim of this study was to compare methodologies for determining the concentration of volatile fatty acids in industrial wastewater. Two titration methods and one colorimetric method were analyzed and compared in terms of result accuracy and applicability. A correction function was developed for the Nordmann FOS/TAC method, which can be implemented on the AT1000 Biogas Titrator, an automated titration device.

Six validation solutions with varying VFA concentrations (126–1000 mgCH₃COOH/l) were analyzed, as well as the influent and effluent of an industrial wastewater anaerobic treatment system. The percentage differences between the average experimental results of the methodologies and the validation solutions were calculated: Nordmann FOS/TAC method had a difference of 51,25%, followed by the DiLallo and Albertson method with 13,54%, and the HACH cuvette method with 10,02%.

Using the correction functions calculated based on the results from the validation solutions, better agreement was achieved between the measured results and the theoretical concentrations of the validation solutions. The average percentage differences between the corrected values of the average experimental results and the validation solutions were: Nordmann FOS/TAC method 2,18%, DiLallo and Albertson method 3,34% and HACH cuvette method 5,61%.

The effect of sample dilution on the DiLallo and Albertson method showed that applying the correction function brings the measurement results closer to the control concentration, but starting from 480 mgCH₃COOH/l, diluted samples yielded up to 15% higher results when considering the dilution factor.

The influence of alkalinity on the results of the Nordmann FOS/TAC method showed that higher VFA concentrations were associated with higher alkalinity values. This indicates that the titration method is not specific to alkalinity and partly determines the concentration of volatile fatty acids.

Significant differences were observed between the results of the methodologies for influent and effluent samples with high VFA concentrations. Even after result correction, the differences remained. This may be due to the fact that the validation solutions used for calculating the correction function were prepared in the concentration range of 126–1000 mgCH₃COOH/l. To include a wider range of VFA concentrations, measurements above 1000 mgCH₃COOH/l should be conducted. Lower concentration effluent samples showed smaller

differences between the methodologies, and the corrected results of the methods matched the measured results better.

Over the course of eight months, the results obtained using the Nordmann FOS/TAC analytical methodology showed optimal VFA concentrations for proper functioning of the anaerobic digester in the influent and effluent samples from days 1 to 150. From day 150 onwards, VFA concentrations increased until day 207, after which they started to decrease. The increase in VFA concentrations was caused by a decrease in anaerobic digester pH and subsequent accumulation of fatty acids. Alkalinity concentrations in the influent generally remained stable within the range of 500–1500 mgCaCO₃/l, while in the effluent, they were slightly higher, ranging from approximately 1000–2500 mgCaCO₃/l. Based on the results, it was concluded that during the increase in VFA concentrations, alkalinity remained consistently within the same range. Therefore, volatile fatty acids caused acidification of the anaerobic reactor, and the alkalinity buffer system was unstable to balance the pH anymore.

Tänuavaldused

Ma tänan Taavo Tennot, Siiri Vellingut ja Argo Normakut juhendamise, suure pühendumise ja igakülgse abi eest töö valmimisel.

Samuti tänan Anne Paaverit, Tartu Ülikooli kolloid- ja keskkonnakeemia laborist, kes hankis analüüside jaoks vajaliku varustuse ning aitas kaasa valideerimislahuste tegemisele.

4. Kasutatud kirjandus

- Bilitewski, B., Härdtle, G., & Marek, K. (1996). *Waste management*. Springer Science & Business Media.
- Fernández, R., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J., & Premier, G. C. (2016). Critical analysis of methods for the measurement of volatile fatty acids. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(3), 209–234.
- Hach Company. (2010). *Organic acids with HT 200 S*. Hach Company. <https://uk.hach.com/asset-get.download.jsa?id=25593611956>
- Hach Company. (2014). *Determination of FOS/TAC Value in Biogas Reactors*. Hach Company/Hach Lange GmbH. <https://www.hach.com/asset-get.download.jsa?id=29641556309>
- Hach Company. (2020). *LCK365 Organic acid (fatty acid) / Butanoic acid*. Hach Company. <https://uk.hach.com/asset-get.download.jsa?id=25593604510>
- Hach Company. (2021). *EZ7252 Volatile Fatty Acids and Total Alkalinity analyser*. Hach Company. <https://be.hach.com/asset-get.download.jsa>
- Henze, M., van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G. A., & Brdjanovic, D. (2008). *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*. IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781780401867>
- Laan, van der J. B. R., & Hobma, S. W. (1978). *Bepaling van lagere vetzuren en biocarbonaat alkaliteit d.m.v titratie (Determination of lower fatty acids and bicarbonate alkalinity by titration)*. No. 12, 465–467.
- Lahav, O., & Morgan, B. (2004). Titration methodologies for monitoring of anaerobic digestion in developing countries? a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79(12), 1331–1341. <https://doi.org/10.1002/jctb.1143>

- Liu, X., André, L., Mercier-Huat, M., Grosmaître, J.-M., Pauss, A., & Ribeiro, T. (2021). Accurate Estimation of Bicarbonate and Acetic Acid Concentrations with Wider Ranges in Anaerobic Media Using Classical FOS/TAC Titration Method. *Applied Sciences*, *11*(24), 11843. <https://doi.org/10.3390/app112411843>
- Mu, Z.-X., He, C.-S., Jiang, J.-K., Zhang, J., Yang, H.-Y., & Mu, Y. (2018). A modified two-point titration method for the determination of volatile fatty acids in anaerobic systems. *Chemosphere*, *204*, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.038>
- Onwosi, C. O., Eke, I. E., Igbokwe, V. C., Odimba, J. N., Ndukwe, J. K., Chukwu, K. O., Aliyu, G. O., & Nwagu, T. N. (2019). Towards effective management of digester dysfunction during anaerobic treatment processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *116*, 109424. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109424>
- Salek, S. S., Bozkurt, O. D., Van Turnhout, A. G., Kleerebezem, R., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2016). Kinetics of CaCO₃ precipitation in an anaerobic digestion process integrated with silicate minerals. *Ecological Engineering*, *86*, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.10.025>
- Siedlecka, E. M., Kumirska, J., Ossowski, T., Glamowski, P., Gołębiowski, M., Gajdus, J., Kaczyński, Z., & Stepnowski, P. (s.a.). *Determination of Volatile Fatty Acids in Environmental Aqueous Samples*.
- V. T. Mota, Santos, F. S., T. A. Araújo, & Amaral, M. C. S. (2015). Evaluation of titration methods for volatile fatty acids measurement: Effect of the bicarbonate interference and feasibility for the monitoring of anaerobic reactors. *Water Practice and Technology*, *10*(3), 486–495. <https://doi.org/10.2166/wpt.2015.056>

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kärt Kingisepp,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose **Lenduvate rasvhapete analüüsimetoodikate võrdlev analüüs**, mille juhendajad on Taavo Tenno ja Siiri Velling reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kärt Kingisepp

19.05.2023