

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

Bakalaureusetöö keskkonnatehnoloogias (12 EAP)

## **Lenduvate rasvhapete määramine reoveepuhasti sissevoolust**

**Sandra Koplus**

Juhendajad: Siiri Velling, PhD

Taavo Tenno, PhD

Tartu 2024

## **Lenduvate rasvhapete määramine reoveepuhasti sissevoolust**

Läänemere eutrofikatsiooni probleemi on seiratud aastakümneid. Toitainete sissevool Läänemerre oli kõrgeim 80ndatel ning praegusel hetkel on koormuse hulk vähenenud rangete nõuete tõttu reoveepuhasti väljavooludele toitainete suhtes. Fosfori eemaldamiseks on mitmeid protsesse – keemilised (näiteks sadestamine), füüsikalised (näiteks adsorptsioon) ja bioloogilised. Neist viimase edukaks opereerimiseks reoveepuhastis on oluline lenduvate rasvhapete juuresolek süsteemis protsessi energiaallikana fosforit akumul eerivate organismide ehk PAO-de elutegevuseks. Bakalaureusetöös uuritakse lenduvate rasvhapete sisaldust olmereovee sissevoolust mõõtmiste samapäeva proovidest ning kaks päeva anaeroobsetes tingimustest hoitud proovidest, kasutades selleks kolme meetodikat. Töö tulemusena antakse esmane hinnang erinevate analüüsimeetodite omadustele ja sobivusele lenduvate rasvhapete määramiseks heterogeensete omadustega sissevoolus.

Märksõnad: Lenduvad rasvhapped, sissevool, reoveepuhastus, bioloogiline fosforiärastus

CERCS kood: T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll; P305 Keskkonnakeemia

## **Determination of volatile fatty acids in wastewater treatment plant influent**

The problem of eutrophication in the Baltic Sea has been monitored for decades. The inflow of nutrients into the Baltic Sea was highest in the 1980s, and currently, the nutrient load has decreased due to strict requirements for wastewater treatment plant effluents. There are several processes for phosphorus removal – chemical (such as precipitation), physical (such as adsorption), and biological. Successful operation of the latter in wastewater treatment plants is crucial for the presence of volatile fatty acids in the system as an energy source for phosphorus-accumulating organisms, or PAOs. The bachelor's thesis examines the content of volatile fatty acids in raw sewage from same-day measurements and from samples stored under anaerobic conditions for two days, using three different methodologies. The primary aim of the study is to provide an initial assessment of the properties and suitability of different analytical methods for determining volatile fatty acids in heterogeneous inflows.

Keywords: Volatile fatty acids, inflow, wastewater treatment, biological phosphorus removal.

CERCS code: T270 Environmental Technology, Pollution Control; P305 Environmental Chemistry.

# Sisukord

<b>Sissejuhatus .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Kirjanduse ülevaade .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Lenduvad rasvhapped .....</b>	<b>7</b>
1.2. VFA-de määramismeetodid .....	8
1.3. VFA-de olulisus reoveepuhastuses .....	8
1.3.1. Polüfosfaate akumulatsioonid organismid .....	9
1.3.2. VFA-de ja leelisuse (TAC) suhe .....	9
1.3.3. Sissevoolu roll fosfori ärastusel .....	10
1.4. Keemiline hapnikutarve .....	10
<b>2. Materjalid ja meetodika .....</b>	<b>12</b>
2.1. Nordmanni FOS/TAC meetodika .....	12
2.1.1. Katse käik .....	13
2.2. HACH küvett kolorimeetiline meetodika .....	13
2.2.1. Katse käik .....	13
2.3. DiLallo ja Albertsoni tagasitiitrimise meetodika .....	14
2.3.1. Katse käik .....	15
2.4. KHT määramine .....	15
2.5. Heljumi määramine .....	15
<b>3. Tulemused ja arutelu .....</b>	<b>17</b>
3.1. Meetodikate tulemuste võrdlus .....	17
3.1.1. HACH küvett kolorimeetrilise meetodika tulemused .....	17
3.1.2. Nordmanni FOS/TAC meetodika tulemused .....	17
3.1.3. Nordmanni FOS/TAC ja HACH küvett kolorimeetrilise meetodika võrdlus .....	19
3.1.4. DiLallo ja Albertsoni tagasitiitrimise meetodika .....	20
3.2. Lisamismeetodi uurimine .....	21
3.2.1. Lisamismeetodi rakendamise andmed .....	21
3.2.2. Lisamismeetodi tulemused .....	24

3.3. Heljumi määramise tulemused.....	25
3.4. VFA/KHT suhe .....	26
3.4.1 VFA/KHT suhte tulemused erinevatel meetodikatel .....	26
<b>Kokkuvõte.....</b>	<b>28</b>
<b>Summary.....</b>	<b>30</b>
<b>Tänuavaldused .....</b>	<b>32</b>
<b>Kasutatud kirjandus.....</b>	<b>33</b>
<b>LISAD .....</b>	<b>35</b>
<b>Lisa 1 .....</b>	<b>35</b>
<b>Lihtlitsents .....</b>	<b>37</b>

## Sissejuhatus

Fosfor on hädavajalik keemiline element. Ta omab tähtsust struktuurse elemendina DNA ja RNA ehituses. Majanduslikult tähtis on fosforist tehtavad väetised. Elementaarfosforit kasutatakse farmaatsia-, toiduainete- ja keemiatööstuses. Fosfor on samuti muutunud oluliseks probleemiks veereostuses. Inimtekkeliste jäätmete ja põllumajandusliku äravoolu tulemusena jõuab fosforirikas vesi veekogudesse ning põhjustab eutrofeerumist. Eutrofikatsioon on põhjustatud vetikate produktsiooni suurenemisest, millega kaasneb vegetatsiooniperioodi lõpus biomassi lagunemine, mistõttu tekib sageli hapnikupuudus ja veekogude veekvaliteet halveneb. Lisaks võivad kindlad vetikate liigid eritada inimestele ja loomadele mürgiseid toksine. (Vu *et al.* 2023)

Läänemere eutrofikatsiooni probleemi on nähtud mitmeid aastakümneid. 1950ndatest aastatest on täheldatud ja mõõdetud hapnikuvaegust ning vee läbipaistvuse vähenemist. Selle probleemi ägestumist saab tugevalt viidata inimtekkeliste toitainete koormuse suurenemise peale. Toitainete sissevool Läänemerre oli kõrgeim 80ndatel ning praegusel hetkel on koormuse hulk vähenenud efektiivsemate reoveepuhastussüsteemide tõttu. Seevastu on viimastel aastakümnetel nähtud sagedasi sinivetikate õitsenguid ning suuri hapnikuvaeguse alasid Läänemeres, põhjuseks on toitainete pikaajaline akumulatsioon meres. (Andersen *et al.* 2017)

Selleks, et tagada veekogude ökosüsteemide jõukust ning veekvaliteedi parandamist peab efektiivselt eemaldama fosforit veest. Fosfori eemaldamiseks on mitmeid protsesse – keemilised (näiteks sadestamine), füüsikalised (näiteks adsorptsioon), bioloogilised (näiteks tehismürgalad). Fosfori eemaldamine, kasutades fosforit akumulereivaid organisme kuulub bioloogilise protsessi hulka. (Vu *et al.* 2023)

Fosforit akumulereivate organismide ehk PAO-de abil on võimalik eemaldada fosforit, kasutades lenduvaid rasvhappeid ehk VFA-sid kui protsessi energiaallikaks. Fosfor akumulereub organismide siserakus polüfosfaatidena ning PAO-sid saab eemaldada koos aktiivmudaga reoveepuhastis. Lenduvad rasvhapped tekivad hapnikuvaeses keskkonnas toimuva lagunemise produktina.

Käesoleva töö eesmärgiks on määrata lenduvaid rasvhappeid olmereovee sissevoolust mõõtmiste samapäeva proovidest ning kaks päeva anaeroobsetes tingimustest hoitud proovidest, kasutades selleks kolme meetodikat. Töö üheks hüpoteesiks on, et kaks päeva

seisnud proovide lenduvate rasvhapete sisaldus on kõrgem võrreldes sissevooluga ning erinevad analüüsimeetodid annavad erineva tulemuse. Bakalaureusetöö tulemusena antakse esmane hinnang erinevate analüüsimeetodite omadustele ja sobivusele lenduvate rasvhapete määramiseks heterogeensete omadustega sissevoolus. Töö tulemusi saab kasutada bioloogilise fosforiärastuse tehnoloogiliste detailide täpsustamiseks, et parandada selle tavapäraselt keeruka protsessi opereerimisjuhendeid reoveepuhastis.

# 1. Teoreetiline taust

## 1.1. Lenduvad rasvhapped

Lenduvate rasvhapete (VFA-de) all loetakse madala molekulmassiga ning lühikese ahelaga rasvhappeid, enamasti on ahelad 1–6 süsinikuga (Tabel 1). Nad kuuluvad alifaatsete monokarboksüülhapete alla ning nad on kõrge polaarsusega ja tugevalt hüdrofiilsed (Raposo *et al.* 2015). Tabelis 1 toodud dissotsiatsioonikonstandid näitavad orgaanilise nõrga happe dissotsieerumise määra ja seeläbi mõju segu pH väärtusele. Etaanhappel on kõige kõrgem  $K_a$  väärtus põhjustades madalaimat pH väärtust proovides.

**Tabel 1.** Lenduvad rasvhapped – nende süstemaatiline ja igapäevaselt kasutatav lihtnimetus (Euroopa Ühenduste Komisjon 2002), süsinike arv molekulis, molekulvalem ja vastav dissotsiatsioonikonstant ( $K_a$ ) (Dippy 1938; Wasewar ja Shende 2011).

Süstemaatiline nimetus	C arv	Lihtnimetus	Molekulvalem	$K_a$
Etaanhape	2	Äädikhape	$C_2H_4O_2$	$1,75 \times 10^{-5}$
Propaanhape	3	Propioonhape	$C_3H_6O_2$	$1,33 \times 10^{-5}$
2-metüülpropaanhape	4	Isovõihape	$C_4H_8O_2$	$1,38 \times 10^{-5}$
N-butaanhape	4	N-võihape	$C_4H_8O_2$	$1,50 \times 10^{-5}$
3-metüülvõihape	5	Isopentaanhape	$C_5H_{10}O_2$	$1,67 \times 10^{-5}$
N-pentaanhape	5	N-palderjanhape	$C_5H_{10}O_2$	$1,38 \times 10^{-5}$
Heksaanhape	6	Kapronhape	$C_6H_{12}O_2$	$1,57 \times 10^{-5}$

Lenduvad rasvhapped tekivad anaeroobse käärimise teel. Anaeroobse käärituse teel hapniku vabas keskkonnas bakterid lagundavad orgaanilist ainet, nagu toidujäätmeid ja sõnnikut (US EPA 2019).

Anaeroobsel töötlusel läbib töödeldav aine kolme peamist protsessi – hüdrolüüsi, atsidogeneesi ja metanogeneesi. Esimese puhul lagundatakse keerulised komponendid lihtsamateks ühenditeks, näiteks monosahhariidideks. Teise etapi tulemusel tekivad lenduvad rasvhapped (VFA-d), alkohol ja süsinikdioksiid. Metanogeneesis lagundatakse teise faasi produktid metaaniks, süsinikdioksiidiks ja vesinikuks. (Lim *et al.* 2020)

Kuna VFA-d tekivad orgaanilise aine anaeroobse biolagunemise tõttu võib neid leiduda aktiivmudas, prügilate nõrgvees ja reovees. Neid on tähtis mõõta, kuna nad osalevad bioloogilise fosfori eemaldamise protsessis. Samuti võivad VFA-d mõjutada jäätmete

põletamisel tekkivate jääkide stabiilsuse säilitamist, vähendades jääkide pH-d ning muutes ja suurendades raskmetallide ning radioaktiivsete isotoopide mobiilsust. Lisaks kuuluvad VFA-d kemikaaliklassi, mis vastutab reovees tekkiva ebameeldiva lõhna eest, koos amiinide ja väävliühenditega. (Siedlecka *et al.* 2008)

## 1.2. VFA-de määramismeetodid

Lenduvaid rasvhappeid saab määrata erinevatel viisidel. Ühed levinumatest on gaaskromatograafia (GC) ja kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC). (Raposo *et al.* 2015) Gaaskromatograafiat loetakse kõige usaldusväärsemaks, saab VFA-sid määrata siiski ka tiitrimise teel. Tiitrimise teel tehtud mõõtmised võivad olla aeganõudvad, aga enamasti on nad käepärasemad ning odavamad võrreldes gaaskromatograafiaga, mistõttu ka eelistatumad igapäevastel VFA-de määramistel. (Jobling Purser *et al.* 2014)

Gaaskromatograafias aurustatakse proovi ja liikuv gaasifaas läbib kolonni. Sealt suudame eraldada üksikkomponente segust nende üksikainete suhtelise aururõhu ja afiinsuse alusel statsionaarse faasi suhtes. Meetodi eeliseks on võime eraldada ning mõõta üksikute VFA-de kontsentratsioone ehk on sellel meetodil hea eraldusvõime. Samuti pakub gaaskromatograafia madalaid määramispiire ning laia dünaamilist ulatust. Seevastu on meetodis vajaminevate proovide ettevalmistamine töömahukas ning vajab kallist aparatuuri. (Fernández *et al.* 2016)

Tiitrimise puhul kasutatakse sagedamini happe-aluse tiitrimist. Mille puhul tiitritakse tugeva happega, nagu HCl või H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH = 5, kus 95% vesinikkarbonaatidest on ära tiitritud ning vahemikus pH = 5 ja pH = 4 jäävad alles peamiselt lenduvad rasvhapped ning tiitrides selles vahemikus, suudetakse määrata nende kogust lahuses. Probleemiks on ebatäpsus kuna tiitrimisel pH = 5/6 osa VFA-dest tiitritakse ära ning osa vesinikkarbonaadist jääb alles tiitrimisel pH = 5 kuni pH = 4. (Liu *et al.* 2021)

Peale eelmainitud meetodite, kasutatakse ka spektrofotomeetrilist lähenemist VFA-de määramisel. Aramrueang *et al.* (2022) artiklis on toodud välja, et spektrofotomeetrilise meetodi kasutus on kiire, annab suurema täpsusega tulemusi ning on vähemtundlik proovis olevate teiste komponentide mõõtmise häiriva toime vastu (Aramrueang *et al.* 2022).

## 1.3. VFA-de olulisus reoveepuhastuses

Tavalise aktiivmudapuhastiga on võimalik kätte saada 10–30% reoveega sisenenud fosforist, mis ei sobi Eestis kuna siin lastakse heitvesi pinnaveekogudesse ehk tekib eutrofikatsiooni

probleem. Üheks fosfori ärastamise tehnoloogiaks on bioloogiline fosfori ärastus (Bio-P). Selle kohaselt kasutatakse mikroorganisme ning vahelduvaid aeroobseid ning anaeroobseid tingimusi, et saada võimalikult tõhusat fosfori ärastamist. Organisme, mis suudavad siduda rohkem fosforit, kui neil on elutegevuseks vajalik nimetatakse PAO-deks ehk polüfosfaate akumulereivateks organismideks. (Kuusik *et al.* 2023)

PAO-d kasutavad VFA-sid energiaallikana ning nad on võimelised neid adsorbeerima anaeroobses faasis PHA-dena (polühüdrosühapetena), mida hiljem need organismid tarbivad ära aeroobselt või anoksiliselt, et saavutada fosfori eemaldust (Carvalho *et al.* 2014). Siit on võimalik järeldada, et tekitades reoveepuhastites soodsaid tingimusi lenduvate rasvhape tekkeks, suudaksime tõhusamalt kasutada PAO-sid, et eemaldada suurema hulga fosforit reoveest.

### **1.3.1. Polüfosfaate akumulereivad organismid**

Polüfosfaate akumulereivatel organismidel on oluliselt suurem rakusisene fosforisisaldus, mistõttu nende eemaldamine omab tähtsat rolli fosforiärastuse tõhususes. PAO-sid on erinevaid ning enamasti jaotatakse nende metaboolsete eripärade järgi kolmeks – klassikalised, fermenteerivad ja denitriteerivad. (Kuusik *et al.* 2023)

Klassikalised PAO-d kasutavad energiaallikaks just VFA-sid ning säilitavad neid rakusiseste varupolümeeridena. Selliste PAO-de teket soodustavad suured VFA-de kontsentratsioonid ja käärivate substraatide vähene esinemine keskkonnas. Fermenteerivad PAO-d kasutavad energiavajaduse täitmiseks anaeroobsetes tingimustes polüfosfaadi lagundamisel ja ortofosfaadi vabanemisel aeroobsetes tingimustes salvestatud energiat. Fermenteerivad PAO-d domineerivad süsteemides, kus esineb palju orgaanilisi aineid, näiteks tööstuslikus reovees. Denitriteerivad PAO-d suudavad paljuneda anoksilistes tingimustes. Neid leidub nii klassikaliste kui ka fermenteerivate PAO-de hulgas. (Kuusik *et al.* 2023)

### **1.3.2. VFA-de ja leelisuse (TAC) suhe**

Lenduvate rasvhapete ja leelisuse ehk TAC suhe on tähtis indikaator reoveepuhastite anaeroobsete protsesside tõhususest. VFA-de ja leelisuse tasakaalus hoid on tähtis, et vältida reaktorite hapestumist. Metanogeenid ehk metaanibakterid kasutavad substraadina lenduvaid rasvhappeid, et toota metaani. Juhul, kui neid baktereid pole piisavalt või nende elutegevus on pärsitud, ei kasutata ära tekkivaid VFA-sid piisava kiirusega, mis viib hapestumiseni. Seetõttu on tähtis jälgida VFA ja TAC suhet anaeroobses reaktoris, kus nende kõrge suhe viitab

süsteemi tasakaaluta olekule ehk madalale süsteemi puhverdusvõimele ning tõenäolisele hapestumisele. VFA ja TAC suhe võiks püsida vahemikus 0,15–0,3. (Kuusik *et al.* 2023)

### **1.3.3. Sissevoolu roll fosfori ärastusel**

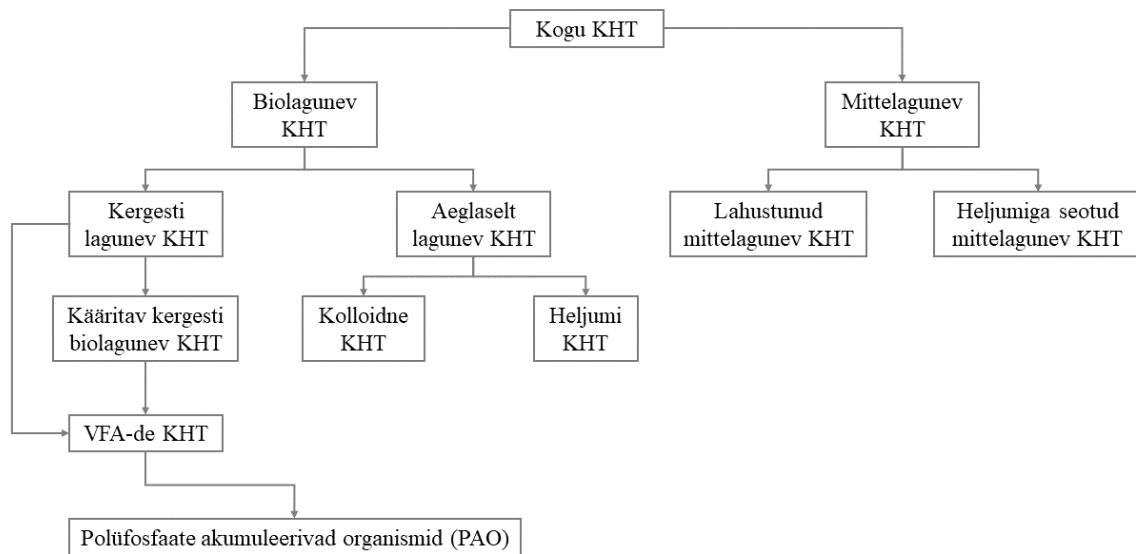
Lenduvaid rasvhappeid on tähtis määrata sissevoolust, et paremini algatada bioloogilise fosfori ärastust. Lisaks bioloogilisele fosforiärastusele tuntakse ja kasutatakse ka keemilist ärastust, mille puhul lisatakse metallisoolasid, mis reageerivad lahustunud fosfaadiga ning reaktsiooni tulemusel tekivad rasklahustuvad ühendid, mis settivad ja mida eemaldatakse mudaga. Kasutatavateks sooladeks on – raud(III)kloriid, raud(III)sulfaat, raud(II)sulfaat ja naatriumaluminaat. (Graziani 2006)

Võrreldes bioloogilise fosforiärastusega on keemiline ärastus pikaajalises perspektiivis kulukas pidevalt vajaminevate kemikaalide ning tekkiva muda käitlemise kulude tõttu (Graziani 2006). Samuti keemilisel ärastusel, pulbrilise aktiivsöega, eemaldatakse fosforit reoveesetega, mis suurendab settes ohtlike ühendite, nagu raskmetallide, osakaalu (Lember *et al.* 2019). Seetõttu ei ole võimalik sellist reoveesetet taaskasutada fosfori kättesaamiseks (Lember *et al.* 2019).

## **1.4. Keemiline hapnikutarve**

Keemiline hapnikutarve ehk KHT näitab, kui palju hapniku kulub proovis olevate orgaaniliste ühendite täielikuks oksüdeerimiseks, kasutades tugevat oksüdeerijat, ehk saab antud testiga arvutada orgaanilise aine sisaldust. Oksüdandiks kasutatakse dikromaati ning väävelhappe lahuse segu. (Kuusik *et al.* 2023)

Joonisel 1 on esitatud KHT erinevad fraktsioonid, mille järgi saab ennustada reoveepuhasti orgaaniliste ja anorgaaniliste ainete käitumist. KHT jaguneb kaheks fraktsiooniks – biolagunevaks ja mittelagunevaks. Reovees oleva aine fraktsioonide tundmine on oluline, näiteks, tehes kindlaks kergesti laguneva KHT, on võimalik saada informatsiooni sellest, kas on võimalik soovitud mahus korraldada tõhustatud bioloogilist ärastamist. (Kuusik *et al.* 2023) Joonise 1 järgi on samuti näha seost KHT, VFA-de ja PAO-de vahel.



**Joonis 1.** KHT olulisemad fraktsioonid ning VFA-de seos PAO-dega (Wilderer 2010; Kuusik *et al.* 2023).

## 2. Materjalid ja meetodika

Töös kasutati kolme meetodikat VFA-de määramiseks olemereovee sissevoolust. Nendeks meetodikateks on Nordmanni FOS/TAC meetodika, HACH kolorimeetriline meetodika küvettidega ning DiLallo ja Albertsoni tagasitiitrimismetoodika. Samuti mõõdeti proovides sisalduvat hõljumit ja KHT väärtust.

VFA-de kontsentratsioone mõõdeti eripäevadel võetud sissevoolu proovidest – mõõtmise päeval võetud proovidest ja kaks päeva enne mõõtmisi võetud ning anaeroobsetes tingimustes säilitatud proovidest. Eripäevadel võetud proovide mõõtmine ning nendest saadud tulemuste võrdlemine on vajalik, et näha kui palju VFA-sid tekib, kui lasta proovil seista anaeroobsetes tingimustes kindel arv päevi.

Lenduvate rasvhapete analüüsimise tulemusel ei mõõdetud eraldi happeid vaid nende summaarset kogust proovis. Analüüsil saadi tulemused milliekvivalentidena ja etaanhappele vastavaid milligramme liitri kohta. Milliekvivalentid viidi üle etaanhappele vastavale milligramm liitri kohta korrutades milliekvivalentides saadud väärtused etaanhappe ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) molaarmassiga ehk 60 g/mol. VFA-de määramise meetodikatel ja KHT mõõtmisel kasutati otse või peale tsentrifuugimist läbi 5–8  $\mu\text{m}$  poori suurusega filtri filtreeritud sissevoolu proove.

### 2.1. Nordmanni FOS/TAC meetodika

Meetodika põhineb Nordmanni FOS/TAC meetodil, mille puhul FOS tähistab lenduvaid rasvhappeid ja TAC leelisust ehk proovi puhvermahtuvust. Lenduvate rasvhapete määramiseks kasutati 0,01N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , mitte 0,1N nagu seda on kirjeldatud Liu *et al.* (2021) artiklis, kuna 0,1N happe tiitrimisel kulus hapet liiga vähe ning selleks, et saada täpsemaid tulemusi lahjendati hapet 10 korda (Liu *et al.* 2021). Määramisel on veel vaja büretti, pH-meetrit, magnetsegajat ja magnetsegaja pulka.

Arvutustes kasutatud valemid, et leida VFA-de ja leelisuse (TAC) kontsentratsioone (1 ja 2):

$$\text{FOS} = ((B/10 \times 4 \times 1,66) - 0,15) \times 500, \quad (1)$$

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

Kus: FOS tähistab empiirilist VFA-de kontsentratsiooni (mg CH<sub>3</sub>COOH/l); A titrandi maht, tiitrides pH-ni 5,0 (ml); C on happe (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kontsentratsioon (0,01N); SA on proovi maht (ml); B titrandi maht tiitrimisel pH 5,0-st kuni 4,4-ni (ml).

### **2.1.1. Katse käik**

Proovi filtreeriti ning VFA-de määramiseks võeti 5 ml proovi ja 50 ml destilleeritud vett 150 ml keeduklaasi. Klaasi lisati magnetsegaja pulga ja lahusesse asetati eelnevalt ära kalibreeritud pH-elektrood. Pandi kirja büretis oleva 0,01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> happe hulga ja tiitriti pH-ni 5,0 ning märgistati kulunud happe koguse. Järgnevalt tiitriti sama proovi pH-ni 4,4 ning pandi kirja kulunud happe koguse. Tiitrimisel pH-ni 5,0, kulunud happe koguse järgi, arvutati leelisust. Kulunud happe, tiitrimisel pH vahemikus 5-st kuni 4,4, järgi arvutati lenduvate rasvhapete koguse.

## **2.2. HACH küvett kolorimeetriline meetodika**

Suhteliselt lihtsa protseduuri, lühikese analüüsiaja ja kättesaadavate reaktiividega, HACH küvett kolorimeetriline meetodika, küvettestiga spektrofotomeetrilise protseduuriga, põhineb Montgomery meetodil (Siedlecka *et al.* 2008).

Mõõtmisel kasutati automaatpipetti, Hach Lange LT200 termostaati ja spektrofotomeetrit Hach Lange DR 2800. Spektrofotomeeter mõõdab skaneerides küvetil olevat triipkoodi ning valib vastava lainepikkuse, mis on antud töös 497 nm. Meetodika määramispiir langeb vahemikku: 50–2500 mg CH<sub>3</sub>COOH/l ning 75–3600 mg C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>COOH (Hach Company 2020).

Analüüsis kasutati neli reagenti, mis on märgistatud vastavalt – A, B, C, D. Kaasatunud küvetid sisaldavad etüleenglükooli ((CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>); reagent A – 19,5 N väävelhapest (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); B – 10% hüdroksüülamiin vesinikkloriidi (NH<sub>2</sub>OH × HCl); C – 4,5 N naatriumhüdroksiidi (NaOH); ja D – raud (III)kloriidi (FeCl<sub>3</sub>) (Siedlecka *et al.* 2008).

### **2.2.1. Katse käik**

Etüleenglükooli sisaldavatesse küvettidesse pipeteeriti 0,4 ml reagenti A ja 0,4 ml filtreeritud proovi ning küvett suleti ning pöörati täielikuks segunemiseks mitu korda ümber. Peale seda, sisestati küvett 10-ks minutiks, eelnevalt 100 °C-ni soojendatud, termostaati. Peale kuumutamist, peab küvett jahtuma ning jõudma toatemperatuurini. Jahtumisele järgneb 0,4 ml reagent B lisamine, peale mida lisati 0,4 ml reagenti C ja 2 ml reagenti D; peale iga reagenti lisamist peab küveti sulgema ning pöörama mitu korda ümber. Peale viimase reagenti lisamist

lasti küvetil seista 3 minutit ja mõõdeti neeldumist kolorimeetriliselt skaneerides küvettidel paiknevaid triipkoode.

### 2.3. DiLallo ja Albertsoni tagasitiitrimise meetodika

Antud tagasitiitrimise meetodika oli välja töötatud 1961. aastal DiLallo ja Albertsoni poolt, kes soovisid tekitada täpsemat VFA-de mõõtmismeetodit, mis ei oleks liiga kulukas. (Lahav ja Morgan 2004)

Meetodi kohaselt peaks tiitrima happega (0,1M HCl-ga) pH-ni 3,3–3,5, et saada võimalikult täpset leelisuse näitu. Seejärel peab proovi keetma 3 minutit, et eemaldada CO<sub>2</sub>-te proovist. Peale proovi jahtumist toatemperatuurini, et vältida lenduvate rasvhapete ära lendumist, tiitritakse proovi alusega (0,1M NaOH-ga) pH-ni 7, et arvutada VFA-de kontsentratsiooni. (Lahav ja Morgan 2004)

Käesolevas töös kasutati nii DiLallo ja Albertsoni poolt pakutud pH vahemikku tiitrimisel kui ka anaeroobse tehnoloogia tarnija poolt modifitseeritud pH vahemikku – happega tiitriti pH-ni 3,0 ning alusega pH-ni 6,5. Lisaks on juhendis mainitud, et täpse tulemuse saamiseks ei tohi proovis olla VFA-sid rohkem kui 180 mg/l (Paques 2021). Mõõtmise teostamiseks kasutati bürette, magnetsegajat koos magnetpulgaga, pH-meetrit, keeduklaasi, pliiti, kuumuskindlat kolbi, Friedrich'i püstjahutit.

Metoodikal põhinevad VFA ja leelisuse arvutamise valemid (3 ja 4):

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

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

Kus: VFA tähistab lenduvaid rasvhappeid (meq/l); Z on tiitritud 0,1M HCl lahuse maht (ml); B on tiitritud 0,1M NaOH maht; V on proovi ruumala (ml); ja leelisus näitab üldleelisuse kontsentratsiooni (meq/L)

Selleks, et saada tulemused milligramm liitri kohta, tuleb korrutada VFA tulemust CH<sub>3</sub>COOH molaarmassiga ehk 60 g/mol ja leelisust CaCO<sub>3</sub> molaarmassiga ehk 100 g/mol.

### **2.3.1. Katse käik**

Määramisel pipeteeriti 10 ml filtreeritud proovi 250 ml keeduklaasi ja lisati 90 ml destilleeritud vett ning magnetsegaja pulga. Lahusesse panti pH-elektrood ning tiitriti proovi pH-ni 3,0; peale mida kirjutati üles kulunud 0,1M HCl lahuse kogust. Sellele järgnevalt kallati proov ümarapõhjalisse kuumuskindlasse kolbi. Keeduklaas loputati destilleeritud veega, mida samuti lisati kolbi, et saada kogu proovi kätte ning kolb ühendati jahutiga. Lahus soojendati ja keedeti 3 minutit, peale kuumuselt äravõtmist lasti jahutiga ühendatult proovil veel 2 minutit jahtuda. Peale jahuti eemaldamist kohe suleti kolb korgiga, et vältida hapete ära lendumist, ning lasti jahtuda toatemperatuurini. Proov valati tagasi keeduklaasi ning loputati destilleeritud veega, mida ka lisati keeduklaasi. Proovi tiitriti 0,1M NaOH-ga pH-ni 6,5 ja märgistati üles tiitrimisel kulunud aluse mahtu.

### **2.4. KHT määramine**

Käesolevas töös kasutati KHT määramiseks M704:07.06.2023 metoodikat. Metoodika põhineb EVS-EN 872:2005 standardil. Metoodikas kasutati Hach Lange küvett-teste KHT kontsentratsiooni määramiseks vahemikus LCK 514 (100–2000 mgO<sub>2</sub>/l). Küvettide kuumutamiseks kasutati Hach Lange LT200 termostaati. Neelduvuse mõõtmiseks kasutati spektrofotomeetrit Hach Lange DR 2800 lainepikkusel 605 nm.

Määramiseks filtreeriti proov läbi filterpaberi. Reagente sisaldavatesse küvettidesse pidi automaatpipetiga pipeteerima 2 ml proovi või proovilahjendust. Küvetid suleti ning paar korda loksutati, et hoolikalt segada reagentid ja proov läbi. Seejärel asetati küvetid termostaati ning kuumutati neid 148 °C juures kaks tundi. Peale kuumutamist panti küvetid jahtuma, kuni nad jõudsid toatemperatuurini. Jahutatud küvetid mõõdeti spektrofotomeetriga ning saadi tulemused mg O<sub>2</sub>/l kohta.

### **2.5. Heljumi määramine**

Heljumi (HA) määrati M706:07.06.2023 metoodikaga, mis põhineb EVS-EN 872:2005 standardil. M706 peamine erinevus standardist on 0,45 µm polüamiidmembraanfiltrite kasutamine klaasfiltrite asemel. Polüamiidmembraanfiltrite kaalumiseks kasutati analüütilist kaalu Scaltec Instruments SBC31. Määramiseks kasutati ka vaakumi tekitamiseks vaakumseadet, proovide filtreerimiseks filtreerimisseadet, kuivatuskappi SNOL 67/350, mille temperatuur oli seatud 105 ± 2 °C juurde, automaatpipetti, Petri tassi ning eksikaatorit.

Heljumi määramiseks algselt kaaluti analüütiliste kaaludega membraanfiltrite kaalu. Seejärel seadistati üles vaakumiga ühendatud filtreerimisseade. Membraanfilter asetati filtreerimisseadmesse ning lisati destilleeritud vett, et kinnitada filtri vaakumiga seadme külge. Seejärel lisati automaatpipetiga kindla proovi koguse (5, 10, 15 ml) ning tekitati vaakum. Eemaldades liigset niiskust vaakumiga, asetati filtrid Petri tassile ning panti kuivatuskappi. Kuivatuskapis peavad filtrid kuivama vähemalt tund aega ning jahutamiseks asetati filtrid koos Petri tassiga eksikaatorisse. Toatemperatuurini jahtunud filtrid kaaluti analüütilise kaaluga ning arvutati heljumi sisaldust proovis.

Heljumi arvutamiseks kasutatakse järgnevat valemit (5):

$$HA = \frac{(A-B) \times 1000}{V} \times 1000, \quad (5)$$

Kus HA tähistab heljumi kontsentratsiooni (mg/l); A on filtri ning kuivanud jäägi summaarne ehk lõppkaal (g); B on filtri ehk tühikaal (g); ja V on proovi ruumala (ml).

## 3. Tulemused ja arutelu

### 3.1. Metoodikate tulemuste võrdlus

Käesolevas töös määratakse VFA-de kontsentratsiooni olmereovee sissevoolust. Lenduvate rasvhapete määramiseks kasutati mõõtmistega samal päeval võetud proove (SV0P) ja kaks päeva enne mõõtmisi võetud ja anaeroobsetes tingimustes hoitud proovidest (SV2P). VFA-sid mõõdeti, kasutades kolme metoodikat.

#### 3.1.1. HACH küvett kolorimeetrilise metoodika tulemused

HACH küvett kolorimeetrilise metoodika tulemused loeme kõige õigemateks, kuna rasvhapete mõõtmine toimub kõige otsemal viisil. Proovi ei ole vaja lahjendada ehk on vähem samme, mis vähendab võimalikku mõõtemääramatust. Chatterjee *et al.* (2018) ja Aramrueang *et al.* (2022) artiklis samuti leiti, et modifitseeritud spektrofotomeetiline meetod näitas tulemusi suure täpsusega (Chatterjee *et al.* 2018; Aramrueang *et al.* 2022).

#### 3.1.2. Nordmanni FOS/TAC metoodika tulemused

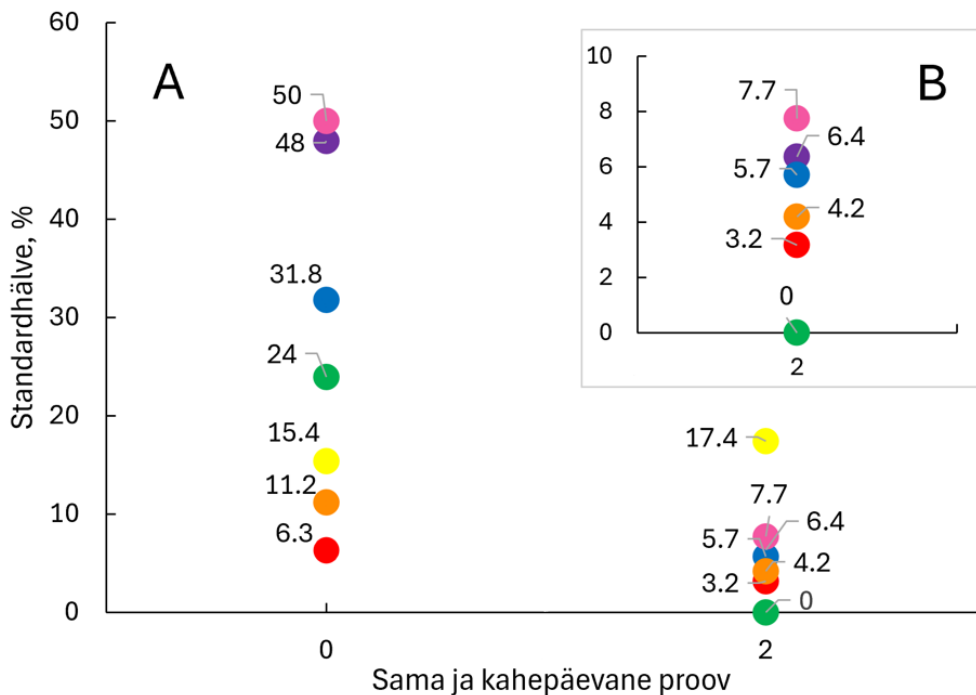
Tabelis 2 on toodud kaks näidet standardhälbe väärtustest kahel mõõtmispäeval, mille arvutamiseks kasutati valemit (6). Vaadeldes standardhälbe protsentuaalset suhet on näha, et kõrgema lenduvate rasvhapete kontsentratsiooniga lahustest tuleb väiksem mõõtemääramatus. Seda järeldust on näha ka joonisel 2, mille andmed on näha lisas 1, kus samapäeva proovide ehk madalamate VFA-de kontsentratsioonidega lahustes standardhälve kõigub suuremates vahemikes (6,3–50%) võrreldes kahepäevaste proovidega (0–7,7%). Eksperimentaalse töö tulemused näitasid, et madalate VFA-de sisalduste puhul on tiitrimise happe kulu väike, mis võib vähendada tiitrimismeetodi mõõtetäpsus.

**Tabel 2.** Näide kahe mõõtmispäeval teostatud kolme kordusmõõtmisega saadud VFA kontsentratsioonid, kasutades Nordmanni FOS/TAC meetodikat. Leitud on kontsentratsioonide keskmised, standardhälve ( $s$ ) ja selle protsentuaalne väärtus. SV0P tähistab mõõtmisega sama päeva sissevoolu proovi ning SV2P tähistab kaks päeva enne mõõtmisi võetud proovi.

Mõõtmiss - päev	Proov	Katse nr	VFA, mgCH <sub>3</sub> COOH/l	Keskmine, mgCH <sub>3</sub> COOH/l	$s$ mgCH <sub>3</sub> CO OH/l	%
1	SV0P	1	91	85,5	9,58	11,2
		2	74,4			
		3	91			
	SV2P	1	240,4	229,3	9,58	4,2
		2	223,8			
		3	223,8			
2	SV0P	1	140,8	151,9	9,58	6,3
		2	157,4			
		3	157,4			
	SV2P	1	263,6	264,7	8,36	3,2
		2	273,6			
		3	257			

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N}}, \quad (6)$$

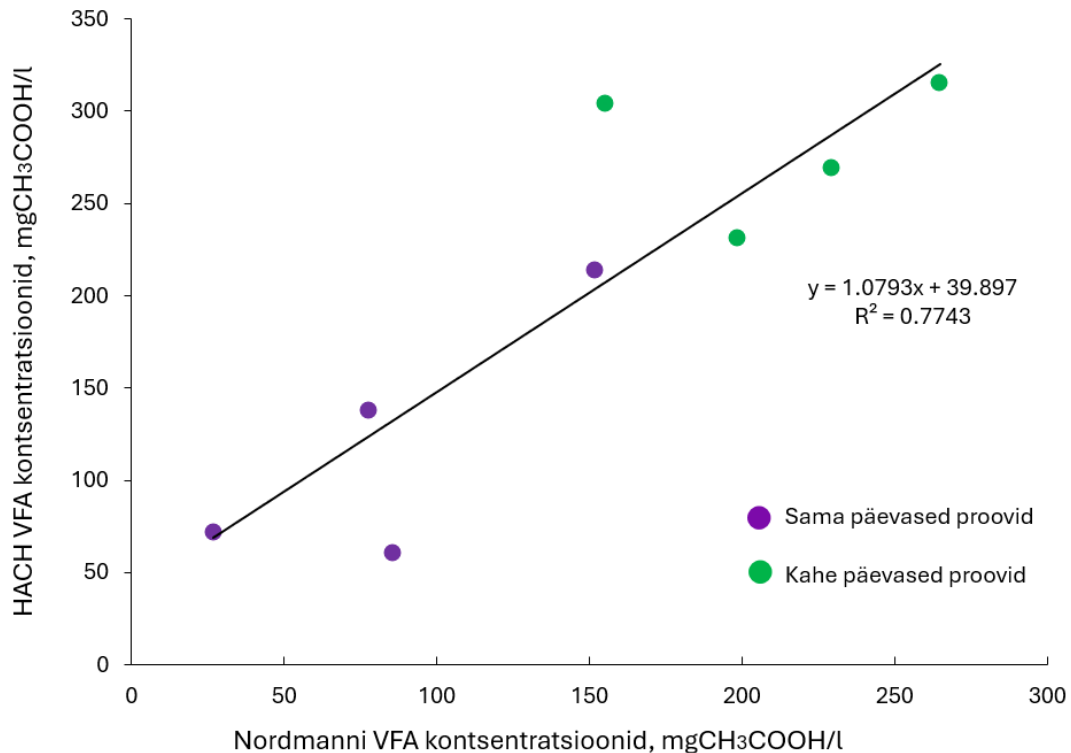
Kus  $s$  tähistab standardhälvet (mgCH<sub>3</sub>COOH/l);  $x_i$  tähistab kindla katse VFA-de väärtust (mgCH<sub>3</sub>COOH/l);  $\bar{x}$  kindla katse kordusmõõtmiste keskmist väärtust (mgCH<sub>3</sub>COOH/l);  $N$  kindla proovi katsete arvu (kõikide puhul väärtus 3)



**Joonis 2.** A osa väljendab Nordmanni FOS/TAC meetodikaga arvatud standardhälbed mõõtmistega samapäevaste proovide tulemustest ja kaks päeva enne mõõtmisi võetud ja anaeroobsetes tingimustes hoitud proovidest. B osa väljendab kahepäevaste proovide tulemuste suurendatud vaadet, kus on kõik tulemused v.a 17,4 % oma. Erinevad värvid väljendavad kindla mõõtmispäeva sama- ja kahepäevase proovi standardhälbe tulemusi.

### 3.1.3. Nordmanni FOS/TAC ja HACH küvett kolorimeetrilise meetodika tulemuste võrdlus

Joonisel 3 on näha Nordmanni FOS/TAC meetodikaga saadud VFA-de kontsentratsioonide võrdlus HACH kolorimeetrilise küvett meetodikaga. Keskmiselt erinesid meetodikate tulemused mõõtmistega samal päeval võetud proovidest umbes 68 mgCH<sub>3</sub>COOH/l ning kahepäevastest enne mõõtmisi võetud ja anaeroobsetes tingimustes hoitud proovides keskmiselt 36 mgCH<sub>3</sub>COOH/l ehk kahekordselt vähenes erinevus. Siit on võimalik järeldada, et keskmiselt kõrgemate lenduvate rasvhapete kontsentratsioonidega proovides väheneb ka meetodikate vaheline mõõtmiserinevus. Praktikas on Nordmanni meetodi läbiviimine automaattitraatoriga mõistliku kemikaalide ja ajakuluga ning seetõttu eelistatud meetod. Joonis 3 toodud sõltuvuse alusel saab leida tiitrimise meetodile vastava HACHi meetodi tulemuse, mida loetakse täpsemaks VFA-de analüüsitulemused tõesuse mõistes (Aramrueang *et al.* 2022).



**Joonis 3.** Nordmanni FOS/TAC ja HACH meetodikate lenduvate rasvhapete kontsentratsioonide võrdlus.

### 3.1.4. DiLallo ja Albertsoni tagasitiitrimise meetodika tulemused

DiLallo ja Albertsoni tagasitiitrimise meetodika näitas kõige ebatäpsemaid tulemusi. Katsete läbiviimisel oli proovitud tiitrida nii DiLallo ja Albertsoni poolt pakutud pH vahemikuga kui ka anaeroobse tehnoloogia tarnija poolt modifitseeritud pH vahemikuga. Tiitrides happega kuni pH-ni 3,3–3,5 ning peale keetmist alusega pH-ni 7 kulus alust liiga vähe ning lenduvate rasvhapete määramiseks kasutatud valemi (3) tulemused tulid negatiivsete väärtustega.

DiLallo ja Albertsoni lenduvate rasvhapete määramisel kasutati 0,1M HCl ja NaOH lahuseid, olmereovee sissevoolu punktproovides on VFA-de kontsentratsioon suhteliselt madal, mistõttu kulub alust samuti vähe, et jõuda pH-ni 7,0. Hapet ja alust ei olnud võimalik modifitseerida ehk lahjendada, kuna arvutusvalem on koostatud kindla molaarsuse – 0,1M – happe ja lahuse jaoks, mistõttu on tulemused samuti ebamäärased ning ebatäpsed. Chatterjee *et al.* (2018) artiklis on samuti leitud DiLallo ja Albertsoni meetodil suurt mõõtemääramatust – lenduvaid rasvhappeid sai määrata umbes 75% täpsusega (Chatterjee *et al.* 2018).

Samuti peab arvestama, et meetodika vajab nii hapet kui alust tiitrimiseks ning proovi keetmist. Seega selline meetod, ei oleks mõistlik rakendada reoveepuhastites, kuhu sobivad meetodid lühikese proovi ettevalmistusajaga ning ressursside poolest kokkuhoidlikumad.

## 3.2. Lisamismeetodi uurimine

### 3.2.1. Lisamismeetodi rakendamise andmed

Sissevoolu proovide heterogeenselt tulenevalt võib esineda maatriksiefekt, mis muudab lenduvate rasvhapete analüüsimise mõõtemääramatust. Tundmatu koostisega proovide puhul soovitatakse maatriksiefekti arvestamiseks kasutada lisamismeetodit. Selleks lisatakse uuritud proovile kindel kogus etaanhappe standardlahust ning võrreldakse arvutatud ning mõõdetud tulemusi (joonis 4). Proovide analüüsimiseks lisamismeetodiga leiti vajaminevad lisatavad standardlahuse kogused (tabel 3) ning võrreldi Nordmanni meetodiga saadud tulemusi (tabel 4)

**Tabel 3.** Lisamismeetodis vajaminevate arvutuste näidis standardse 100 mgCH<sub>3</sub>COOH/l VFA-de kontsentratsiooniga umbes 1%-lises äädikhappe lahuses arvutatud vajamineva äädikhappe koguse, kui on soov suurendada VFA-de kogust proovis 50% võrreldes algselt analüüsitud tulemusega. Võrdluseks on toodud tegeliku proovi mõõdetud VFA kontsentratsiooni ning kui palju on vaja umbes 0,1% etaanhapet, et lisada 50% äädikhapet proovile juurde.

	Näidislahus	Mõõdetud	Ühik
Äädikhappe lahuse konts.	0,998	0,0998	%
Algne mõõdetud konts.	<b>100</b>	<b>151,87</b>	mg CH <sub>3</sub> COOH/l
Lisame juurde	50	50	%
Teoreetiline uus konts.	<b>150</b>	<b>227,81</b>	mg/l
Proovi kogus	5	5	ml
Proov sisaldab	0,5	0,5	mg CH <sub>3</sub> COOH
Lisame juurde	0,25	0,25	mg CH <sub>3</sub> COOH
Hapet tuleb mõõta	0,024	0,379	ml
Ehk	<b>24</b>	<b>379</b>	µm

**Tabel 4.** Mõõdetud lenduvate rasvhapete kontsentratsioon, millele on arvutatud erinevate etaanhapete koguse lisamisel uute lahuste kontsentratsioone. Rakendades Nordmanni FOS/TAC meetodikat on leitud peale lisamismeetodi rakendamist mõõdetud uued

konsentratsioonid. Lisaks on arvatud teoreetiliste ja empiiriliste tulemuste erinevust ehk mõõtemääramatust.

<b>Mõõdetud tulemus</b>	<b>151.87 mgCH<sub>3</sub>COOH/l</b>					
CH <sub>3</sub> COOH konts., %	0,0998					0,998
Lisame %	5	25	50	100	200	500
µl	38,0	189,8	379,7	759,3	1518,7	380,4
Arvatud, mg CH <sub>3</sub> COOH/l	159,5	189,8	227,8	303,73	455,6	911,2
Uus konts., mg CH <sub>3</sub> COOH/l	174,0	190,6	207,2	323,4	472,8	821,4
Erinevus, %	<b>9,12</b>	<b>0,40</b>	<b>-9,04</b>	<b>6,47</b>	<b>3,78</b>	<b>-9,86</b>

Eksperimentaalsed tulemused näitavad, et lisatava analüüdi proportsiooni tõstmisel (5–500%) ei suurene mõõdetud ja arvatud sisalduste erinevus jäädes vahemikku 3–10% (tabel 4).

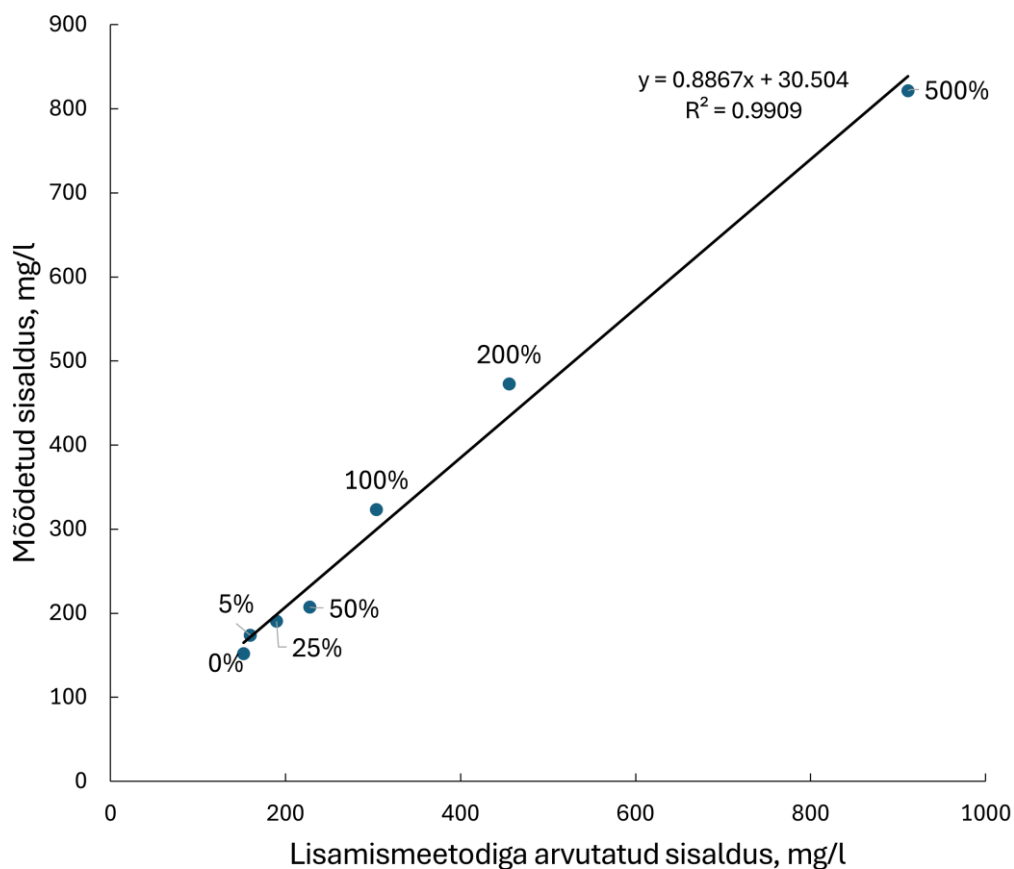
Tabelis 5 mõõtmisega samal päeval võetud proovidele lisati 5% ja 100% 0,0998% etaanhappe lahust ning kahepäevastele proovidele 5% ja 50%. Antud mõõtmispäeva SV0P proovi keskmine lenduvate rasvhapete kogus oli 85,5 mgCH<sub>3</sub>COOH/l, kõikide mõõtmispäevade keskmine oli 77,9 mgCH<sub>3</sub>COOH/l ning maksimaalne mõõdetud kogus 151,9 mgCH<sub>3</sub>COOH/l, vastavalt sellele otsustati lisada 5%, mis vastaks keskmisele väärtusele ning 100 %, mis vastaks maksimaalsele tulemusele. Sarnaselt tehti SV2P prooviga, mille antud päeva keskmine oli 229,3 mgCH<sub>3</sub>COOH/l, kõikide mõõtmiste keskmine ja maksimaalne tulemus olid vastavalt 220,6 ning 301,3 mgCH<sub>3</sub>COOH/l ehk see vastab umbes 5%-le ja 50%-le.

**Tabel 5.** Ühel mõõtmispäeval kolme kordusmõõtmisega teostatud lisamismeetodi rakendamiseiga leitud standardhälve (*s*) ja selle protsentuaalne väärtus. SV0P tähistab mõõtmisega sama päeva sissevoolu proovi ning SV2P tähistab kaks päeva enne mõõtmisi võetud proovi.

Proov	Katse nr	Lisati juurde		VFA, mgCH <sub>3</sub> COOH/ l	Keskmine, mgCH <sub>3</sub> COOH/l	<i>s</i> , mgCH <sub>3</sub> CO OH/l	%
		%	µl				
SV0P	1	5	21,3	91	78,83	10,67	<b>13,5</b>
	2			71,08			
	3			74,4			
	1	100	427,3	140,8	151,87	9,58	<b>6,3</b>
	2			157,4			
	3			157,4			
SV2P	1	5	57,3	190,6	207,20	16,60	<b>8,0</b>
	2			207,2			
	3			223,8			
	1	50	573,3	336,68	324,51	15,69	<b>4,8</b>
	2			330,04			
	3			306,8			

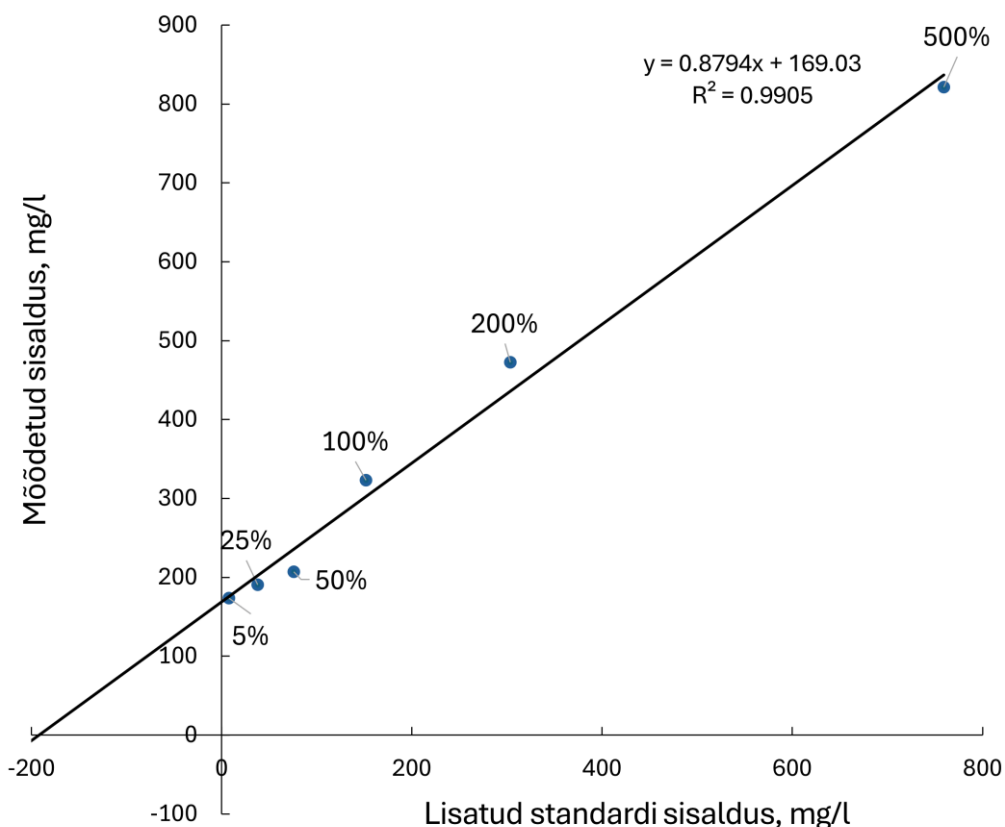
Tabeli 5 standardhälbe protsentuaalsete väärtuste järgi on näha, et mida vähem lisame happekogust proovile juurde, seda suurem on standardhälve. See viitab sellele, et lisades väiksema happekoguse korral mõjutavad maatriksi ehk lahuses olevad muud komponendid mõõtmistäpsust, mis väheneb suuremate VFA-de kontsentratsioonide juures. Samuti mõjutab ka inimfaktor, mille puhul madala happekoguse lisamise ajal väiksemgi ebatäpsus võib põhjustada mõõtmistulemuste suuremat variatsiooni, mis ole niivõrd nähtav suurema happekoguse lisamisel lahusesse.

### 3.2.2. Lisamismeetodi tulemused



**Joonis 4.** Sama päeva sissevoolu lenduvate rasvhapete sisaldus proovides, kuhu lisati 5%, 25%, 50%, 100%, 200% ja 500% etaanhapet arvestades proovi esialgset (0%) VFA-de sisaldust arvatuna etaanhappe milligrammideks.

Uuritava proovi arvutusliku algsisalduse leidmiseks kasutati mõõtmisväljundi sõltuvust lisatud standardi sisaldusest. Joonisel 3 on toodud eelnevalt kirjeldatud eksperimentaalsed andmed, mille lineaarse sõltuvuse sirget ekstrapoleeriti abtsissteljeni. Abtsissi absoluutväärtus näitab proovi arvutuslikku algsisaldust, milleks on 169 mg/l, mis erineb Nordmanni tiitrimismeetodiga saadud tulemusest 12%.



**Joonis 3.** Uuritava proovi arvutusliku algsisalduse leidmiseks saadud sirgevõrrand, mida saadi ekstrapoleerides sirget abtsissteljeni.

Mõõtmispäeva sissevoolu punktproovide VFA-de sisaldused varieerusid vahemikus 26–90 mgCH<sub>3</sub>COOH/l ning kahepäevaste proovide sisaldus oli keskmiselt ligikaudu 180% suurem. Praktikas automaattitraatoriga kõige lihtsamalt rakendatava Nordmanni tiitrimismeetodi uurimiseks enamikele proovidele vastavas sisalduste vahemikus uuriti lisamismeetodi tulemusi sama päeva prooviga.

### 3.3. Heljumi määramise tulemused

Heljumi tulemused varieerusid vahemikus 63–2743 mg/l (tabel 6). Suurt tulemuste kõikumist võib selgitada punktproovide heterogeensuse tõttu, mistõttu mõnedes proovides on väga kõrged heljumi kontsentratsioonid ja mõnedes väga madalad. Kolmanda mõõtmispäeva heljumi madalat kontsentratsiooni on võimalik selgitada lume sulaveest tingitud lahjema proovi tõttu. Keskmiselt on heljumi sisaldus kahepäevastes anaeroobsetes tingimustest hoitud proovides madalam võrreldes mõõtmistega samapäeva proovides, mis on eeldatav kuna anaeroobse käärimise tulemusel toimub orgaanilise aine lagunemine.

**Tabel 6.** Kuuel mõõtmispäeval saadud proovide heljumi sisaldused mg/l kohta. SV0P tähistab mõõtmisega sama päeva sissevoolu proovi ning SV2P tähistab kaks päeva enne mõõtmisi võetud proovi.

Mõõtepäev	1	2	3	4	5	6
SV0P, mg/l	506	63	803	420	920	440
SV2P, mg/l	2743	110	127	140	327	146

Kuigi heljumi määramisel filtreeriti proovi 0,45 µm polüamiidmembraanfiltriga, siis KHT ja VFA-de määramisel olid punktproovid filtreeritud läbi 5–8 µm poori suurusega filtriga, mis tehniliselt tähendab, et filtreerimise tulemusel oli eemaldatud osakesed, mis olid suuremad kui 5–8 µm ning filtreeritud proovi jäi alles osakesed, mis olid poorisuurusest väiksemad.

Kuna proovi jäi osa mittelahustunud osakesi ehk heljumit võisid KHT tulemused näidata nii proovis lahustunud ainete kui ka osaliselt mittelahustunud ainete KHT-d. Nagu joonisel 1 on näha VFA-d kuuluvad lahustunud KHT ossa, seega meid huvitab just lahustunud osa KHT väärtus, mitte tervikliku oma.

### 3.4. VFA/KHT suhe

Lenduvate rasvhapete ja keemilise hapnikutarve suhte järgi on võimalik ennustada PAO-de võimalikku teket. Jing *et al.* (2023) artiklis on näidatud, kuidas VFA/KHT suhe mõjutab fosfori eemaldamise tõhusust sünteetilises reovees (Jing *et al.* 2023). Kui VFA/KHT suhe on 15% siis 44% fosfaati oli võimalik eemaldada, aga olukorras, kus suhe oli 100% siis peaaegu 99% fosfaati oli võimalik eemaldada. Siit on võimalik järeldada, et mida kõrgem on VFA/KHT suhe seda tõhusamini on võimalik eemaldada fosforit. Kuigi peab arvestama, et sünteetilise reovee maatriks võib oluliselt erineda tegeliku reovee omast. (Jing *et al.* 2023)

#### 3.4.1 VFA/KHT suhte tulemused erinevatel meetodikatel

Tabelis 7 on näha, et kolme meetodika VFA/KHT suhted varieeruvad, kus kõige väiksem väärtus on 0,07 ning suurim 0,47. DiLallo ja Albertsoni üks negatiivne tulemus on tulnud VFA arvutatud negatiivse tulemuse tõttu, kuna kulus liiga vähe alust tiitrimisel, mistõttu on suhe ka negatiivne. Tabelis 5 tulemuste järgi on näha, et HACH küvett kolorimeetrilise meetodikaga tulid kõige kõrgemad VFA/KHT väärtus – maksimaalne peaaegu 50%.

**Tabel 7.** Samale proovile kolme meetodika leitud protsentuaalsed VFA/KHT suhted kahel mõõtmispäeval. SV0P tähistab mõõtmisega sama päeva sissevoolu proovi ning SV2P tähistab kaks päeva enne mõõtmisi võetud proovi. Nii VFA-de kui KHT puhul on ühik mgO<sub>2</sub>/l.

Meetodid	Mõõtepäev 1		Mõõtepäev 2	
	SV0P	SV2P	SV0P	SV2P
	<b>VFA/KHT, %</b>			
<b>Nordmann</b>	16	24	7	32
<b>HACH</b>	28	47	20	37
<b>DiLallo</b>	-38*	25	19	17

\* negatiivse väärtuse selgitus peatükis 3.1.4.

## Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli määrata lenduvaid rasvhappeid olmereovee sissevoolust, kasutades selleks kolme meetodikat – HACH küvett kolorimeetrilist meetodikat, Nordmanni FOS/TAC meetodikat ning DiLallo ja Albertsoni tagasitiitrimise meetodikat. Töö alguses püstitati hüpotees, et kaks päeva seisnud proovide lenduvate rasvhapete sisaldus on kõrgem võrreldes sissevooluga ning tulemused erinevad erinevate analüüsimeetodite puhul.

Lenduvaid rasvhappeid määrati sissevoolu samapäeva proovidest ja kaks päeva enne mõõtmisi võetud ja anaeroobsetes tingimustes hoitud proovidest. Meetodikate võrdlemisel selgus, et DiLallo ja Albertsoni meetodika osutus ebamääraseks ning sellega saadud lenduvate rasvhapete tulemused osutusid negatiivseteks või puuduva korrelatsiooniga samapäeva ja kahepäevaste proovide vahel. Nordmanni FOS/TAC meetodika puhul tehti igale proovile kokku kolm mõõtmist ning selle põhjal leiti proovide standardhälbed, mille põhjal oli näha, et samapäeva proovides olid väärtused suured ning suurema variatsiooniga (6,3–50%), aga kahepäevastes proovides olid väiksemad väärtused ning väiksem kõikumise vahemik (0–7,7%). HACH küvett kolorimeetrilise meetodika järgi saadud VFA-de kontsentratsioonid loeti kõige õigemateks, kuna lenduvate rasvhapete mõõtmine, just selle meetodikaga, toimub kõige otsemal viisil.

Võrreldes HACH ja Nordmanni meetodika tulemusi selgus, et mõõtmistega samapäeva proovides esines suurem keskmine vahe meetodikate VFA-de kontsentratsioonide väärtuste vahel – 68 mgCH<sub>3</sub>COOH/l. Kahepäevastes proovides, kus on suuremad VFA-de kontsentratsioonid, oli meetodikate vahelised keskmised väärtused umbes kaks korda väiksemad – 36 mgCH<sub>3</sub>COOH/l. Arvestades seda on võimalik järeldada, et lenduvate rasvhapete määramine kõrgematel kontsentratsioonidel annab usaldusväärsemaid tulemusi.

Lisamismeetodi rakendamisel uuriti, kuidas etaanhappe standardlahuse lisamine mõjutab lenduvate rasvhapete määramist olmereovee proovides. Eksperimentaalsed tulemused näitasid, et lisatava analüüdi proportsiooni tõstmisel (5–500%) ei suurene mõõdetud ja arvutatud sisalduste erinevus oluliselt, jäädes vahemikku 3–10%. Samuti lisati ühe mõõtmispäeva samapäeva proovidele 5% ja 100% ning kahepäevastele proovidele 5% ja 50% umbes 0,1% etaanhappe lahust. Selgus, et mida vähem happekogust proovile lisati, seda suurem oli standardhälve, viidates maatriksiefektile ja inimfaktori mõjule väiksemate happekoguste puhul.

Heljumi tulemused varieerusid vahemikus 63–2743 mg/l, mis tuleneb punktproovide heterogeensest koostisest. Mõned proovid sisaldasid väga kõrgeid heljumi kontsentratsioone, samas kui teised olid märgatavalt madalamad, mida mõjutas ka väliskeskkond, näiteks lume sulavee lahjendav mõju. Keskmiselt oli heljumi sisaldus kahepäevastes anaeroobsetes tingimustes hoitud proovides madalam võrreldes samapäeva proovidega, mis on ootuspärane, kuna anaeroobse käärimise tulemusel toimub orgaanilise aine lagunemine.

VFA/KHT tulemused näitasid suurt varieeruvust, ulatudes väärtustest 0,07 kuni 0,47. Kolmest kasutatud meetodist andis HACH küvett kolorimeetiline meetod kõige kõrgemad suhte väärtused, maksimaalselt peaaegu 50%. Eelnevate uuringute kohta on kõrgema VFA/KHT suhte korral fosfori eemaldamise efektiivsus suurem, toetades ideed, et VFA/KHT suhte jälgimine võib olla kasulik bioloogilise fosforiärastuse efektiivsuse hindamisel.

Algselt püstitatud hüpotees pidas paika, kuna kaks päeva seisnud proovide lenduvate rasvhapete sisaldus oli kõrgem ning nende määramisel erinevate analüüsimeetoditega saadi varieeruvad tulemused. Bakalaureusetöö tulemusi saab kasutada Nordmanni tiitrimismeetodiga ja HACH kolorimeetrilise meetodiga saadud tulemuste oma vaheliseks võrdlemiseks VFA-de analüüsimisel reoveepuhasti sissevoolust.

# Determination of volatile fatty acids in wastewater treatment plant influent

Sandra Koplus

## Summary

The aim of this study was to determine volatile fatty acids from municipal wastewater inflow using three methods: the HACH cuvette colorimetric method, the Nordmann FOS/TAC method, and the DiLallo and Albertson back-titration method. The hypothesis was that the content of volatile fatty acids in samples that had been kept in anaerobic conditions for two days would be higher compared to the influent, and that the results would differ between the different analytical methods.

VFAs were measured from same-day inflow samples and samples which were taken two days prior and kept under anaerobic conditions. Comparison of the methods revealed that the DiLallo and Albertson method was unreliable, producing negative results or inconsistent correlations between same-day and two-day samples. The Nordmann FOS/TAC method was performed by doing three repeated measurements per sample, with standard deviations indicating large values with big variation for same-day samples (6.3–50%), but smaller and more consistent values for two-day samples (0–7.7%). VFA concentrations obtained using the HACH cuvette colorimetric method were considered the most accurate due to the direct measurement process.

Comparing results from the HACH and Nordmann methods, it was found that the average difference in VFA concentrations was larger for same-day samples, at 68 mgCH<sub>3</sub>COOH/l, while for two-day samples, where VFA concentrations were higher, the average difference between methods was about half, at 36 mgCH<sub>3</sub>COOH/l. This suggests that VFA determination at higher concentrations yields more reliable results.

When applying the standard addition method, the influence of adding acetic acid standard solution on VFA determination in municipal wastewater samples was investigated. Experimental results showed that increasing the proportion of the added analyte (5–500%) did not significantly increase the difference between measured and calculated contents, remaining within the range of 3–10%. Additionally, 5% and 100% of approximately 0.1% acetic acid solution was added to same-day samples, and 5% and 50% to two-day samples. It was found

that lower added acid amounts resulted in higher standard deviations, indicating a matrix effect and the influence of human error on smaller acid additions.

Suspended solids results ranged from 63 to 2743 mg/l, due to the heterogeneous composition of point samples. Some samples had very high suspended solids concentrations, while others were significantly lower, influenced by external factors such as dilution from melting snow. On average, suspended solids content in two-day anaerobic samples was lower compared to same-day samples, which is expected due to the degradation of organic matter during anaerobic fermentation.

VFA/COD ratio results showed a wide range of values from 0.07 to 0.47. Of the three methods used, the HACH cuvette colorimetric method provided the highest ratio values, with a maximum of nearly 50%. The results confirm that a higher VFA/COD ratio corresponds to greater phosphorus removal efficiency, supporting the hypothesis that monitoring the VFA/COD ratio can be useful in assessing the effectiveness of biological phosphorus removal.

## **Tänuavaldused**

Soovin tänada oma juhendajaid, Siiri Vellingut ja Taavo Tennot, nende nõuannete, pideva toe ja kannatlikkuse eest kogu lõputöö kirjutamise protsessi jooksul.

Samuti avaldan sügavat tänu laborandile Anne Paaver, kes aitas lahuste valmistamisel ning andis nõu töötegemise ajal ja keskkonnaanalüüsi laborijuhatajat Christina Mürki, kes pidevalt tegi lahuste lahjendusi, hankis analüüsidel vajaminevat varustus ja aitas KHT ning heljumi määramisel.

## Kasutatud kirjandus

- Andersen, J. H., Carstensen, J., Conley, D. J., Dromph, K., Fleming-Lehtinen, V., Gustafsson, B. G., et al. 2017. Long-term temporal and spatial trends in eutrophication status of the Baltic Sea. *Biological Reviews*, **92**(1), 135–149. <https://doi.org/10.1111/brv.12221>
- Aramrueang, N., Lomwongsopon, P., Boonsong, S. and Kingklao, P. 2022. Improved Spectrophotometric Method for Determination of High-Range Volatile Fatty Acids in Mixed Acid Fermentation of Organic Residues. *Fermentation*, **8**(5), 202. <https://doi.org/10.3390/fermentation8050202>
- Carvalho, M., Oehmen, A., Carvalho, G. and Reis, M. A. M. 2014. The effect of substrate competition on the metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs). *Water Research*, **64**, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.004>
- Chatterjee, B., Radhakrishnan, L. and Mazumder, D. 2018. New Approach for Determination of Volatile Fatty Acid in Anaerobic Digester Sample. *Environmental Engineering Science*, **35**(4), 333–351. <https://doi.org/10.1089/ees.2017.0190>
- Dippy, J. F. J. 1938. Chemical constitution and the dissociation constants of monocarboxylic acids. *Journal of the Chemical Society*, 1222–1227.
- Euroopa Ühenduste Komisjon. 2002. Komisjoni otsus, millega muudetakse komisjoni otsust 1999/217/EÜ toiduainetes või nende pinnal kasutatavate lõhna- ja maitseühendite registri osas.
- Fernández, R., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J. and 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. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1073493>
- Graziani, M. 2006. Phosphorus Treatment and Removal Technologies.
- Hach Company. 2020. LCK365 Organic acid (fatty acid)/Butanoic acid.
- Jing, L., Liu, C., Zhang, W. and Yin, Z. 2023. Phosphorus release and uptake behavior and microbial metabolic activity in reversed A2O process: Importance of influent VFAs/COD and anaerobic duration. *Biochemical Engineering Journal*, **200**, 109098. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109098>
- Jobling Purser, B. J., Thai, S.-M., Fritz, T., Esteves, S. R., Dinsdale, R. M. and Guwy, A. J. 2014. An improved titration model reducing over estimation of total volatile fatty acids in anaerobic digestion of energy crop, animal slurry and food waste. *Water Research*, **61**, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.020>
- Kuusik, A., Kivirüüt, A., Noorvee, A., Maastik, A., Villers, A., Menert, A., et al. 2023. *Reoveepuhastuse käsiraamat*. LIFE IP CleanEST, Tallinn. <http://hdl.handle.net/10492/8620>

- Lahav, O. and 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>
- Lember, E., Pachel, K. and Loigu, E. 2019. Removal of heavy metals and total organic carbon from wastewater using powdered activated carbon. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, **68**(1), 100–110. <https://doi.org/10.3176/proc.2019.1.10>
- Lim, J. X., Zhou, Y. and Vadivelu, M. V. 2020. Enhanced volatile fatty acid production and microbial population analysis in anaerobic treatment of high strength wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, **33**, 101058. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.101058>
- Liu, X., André, L., Mercier-Huat, M., Grosmaître, J.-M., Pauss, A. and 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>
- Paques. 2021. Volatile fatty acid (VFA) concentration and Alkalinity.
- Raposo, F., Borja, R., Cacho, J. A., Mumme, J., Mohedano, Á. F., Battimelli, A., et al. 2015. Harmonization of the quantitative determination of volatile fatty acids profile in aqueous matrix samples by direct injection using gas chromatography and high-performance liquid chromatography techniques: Multi-laboratory validation study. *Journal of Chromatography A*, **1413**, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.008>
- Siedlecka, E. M., Kumirska, J., Ossowski, T., Glamowski, P., Gołębiowski, M., Gajdus, J., et al. 2008. Determination of Volatile Fatty Acids in Environmental Aqueous Samples.
- US EPA, O. 2019. How Does Anaerobic Digestion Work? <https://www.epa.gov/agstar/how-does-anaerobic-digestion-work> (vaadatud 2023-11-05)
- Vu, M. T., Duong, H. C., Wang, Q., Ansari, A., Cai, Z., Hoang, N. B., et al. 2023. Recent technological developments and challenges for phosphorus removal and recovery toward a circular economy. *Environmental Technology & Innovation*, **30**, 103114. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103114>
- Wasewar, K. L. and Shende, D. Z. 2011. Reactive Extraction of Caproic Acid Using Tri-n-butyl Phosphate in Hexanol, Octanol, and Decanol. *Journal of Chemical & Engineering Data*, **56**(2), 288–297. <https://doi.org/10.1021/je100974f>
- Wilderer, P. A. 2010. *Treatise on Water Science*. Newnes.

## LISAD

**Lisa 1.** Seitsme mõõtmispäeval teostatud kolme kordusmõõtmisega saadud VFA-de kontsentratsioonid, kasutades Nordmanni FOS/TAC meetodikat. Leitud on kontsentratsioonide keskmised, standardhälve *s* ja selle protsentuaalne väärtus.

Mõõtmis-päev	Proov	Katse nr	VFA, mgCH <sub>3</sub> COOH/l	Keskmine, mgCH <sub>3</sub> COOH/l	<i>s</i> mgCH <sub>3</sub> COOH/l	%
1	SV0P	1	57,8	79,9	38,34	<b>48,0</b>
		2	57,8			
		3	124,2			
	SV2P	1	323,4	301,3	19,17	<b>6,4</b>
		2	290,2			
		3	290,2			
2	SV0P	1	91,0	79,9	19,17	<b>24,0</b>
		2	57,8			
		3	91,0			
	SV2P	1	257,0	257,0	0,00	<b>0,0</b>
		2	257,0			
		3	257,0			
3	SV0P	1	41,2	30,1	9,58	<b>31,8</b>
		2	24,6			
		3	24,6			
	SV2P	1	174,0	168,5	9,58	<b>5,7</b>
		2	174,0			
		3	157,4			
4	SV0P	1	67,8	77,7	11,97	<b>15,4</b>
		2	91,0			
		3	74,4			
	SV2P	1	167,4	155,2	27,04	<b>17,4</b>
		2	174,0			
		3	124,2			
5	SV0P	1	41,2	26,8	13,42	<b>50,0</b>
		2	24,6			
		3	14,6			
	SV2P	1	180,6	198,3	15,33	<b>7,7</b>
		2	207,2			
		3	207,2			
6	SV0P	1	140,8	151,9	9,58	<b>6,3</b>
		2	157,4			
		3	157,4			
	SV2P	1	263,6	264,7	8,36	<b>3,2</b>
		2	273,6			
		3	257,0			
7	SV0P	1	91,0	85,5	9,58	<b>11,2</b>
		2	74,4			
		3	91,0			

	SV2P	1	240,4			
		2	223,8	229,3	9,58	<b>4,2</b>
		3	223,8			

# **Lihtlitsents**

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Sandra Koplus,

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

### **Lenduvate rasvhapete määramine reoveepuhasti sissevoolust,**

mille juhendajad on Siiri Velling ja Taavo Tenno,

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.

*Sandra Koplus*

**26.05.2024**