

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
Ökoloogia ja maateaduste instituut  
Geograafia osakond

Rauno Lust  
**ELEKTRIPINGE MÕJU DENITRIFIKATSIOONI  
PROTSESSILE MIKROBIOLOOGILISES  
ELEKTROSÜNTEESISIRAKUS**

Magistritöö (30EAP)

Juhendajad: Prof. Ülo Mander  
PhD Kuno Kasak

Kaitsmisele lubatud .....

Juhendaja .....

Osakonna juhataja .....

*allkiri, kuupäev*

Tartu 2017

Elektripinge mõju denitrifikatsiooni protsessile mikrobioloogilises elektrosünteesirakus

Mikrobioloogilise elektrosünteesiraku puhul kasutatakse mikroorganisme soovitud reaktsioonide katalüüsiks. Töö eesmärgiks oli teha kindlaks kuidas mikrobioloogilises elektrosünteesirakus rakendatav elektripinge mõjutab mikroorganismide poolt läbiviidavaid protsesse. Selleks sooritati kaks katset, milles madala orgaanilise süsinikuga keskkonnas viidi läbi denitrifikatsiooni protsess, eemaldamaks reoveest nitraate. Saadud tulemustele tuginedes saab väita, et denitrifikatsiooni protsess on mõjutatav rakendatava elektripinge kaudu, kuid protsessi efektiivsemaks muutmiseks on vaja teostada täiendavaid uuringuid.

*Denitrifikatsioon, mikrobioloogiline elektrosüntees, elektripinge, nitraatide eemaldamine, põhjavee reostus*

T270 – Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

Electric current effect on denitrification process in microbial electrosynthesis cell

In microbial electrosynthesis cell (MEC), microorganisms are used as catalysts to conduct wanted reactions. Main objective of this work is to make sure how electric current can effect microbial processes in microbial electrosynthesis cell. For that, two experiments were conducted in MEC reactor, where microorganisms were used to treat nitrate polluted wastewater via denitrification process in absence of organic carbon. Based on the results, it can be said that different electric currents can be used to manipulate microbial processes and the technology itself can be used to treat polluted water from nitrates. But to reach higher process efficiency further research is needed.

*Denitrification, microbial electrosynthesis, electric current, nitrates removal, groundwater pollution*

T270 – Environmental technology, pollution control

## SISUKORD

SISSEJUHATUS .....	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
1.1. Bioelektrokeemiline süsteem .....	7
1.2. Bioelektrokeemiliste süsteemide rakenduskohad .....	8
1.3. Elektronide ülekanne elektrodilt mikroorganismidele.....	9
1.4. Denitrifikatsioon .....	11
1.4. Denitrifikatsioon mikrobioloogilises elektrosünteesirakus .....	13
2. MATERJAL JA METOODIKA .....	15
2.1. Esimese katse ülesehitus .....	16
2.2. Esimese katse opereerimine .....	18
2.3. Teise katse ülesehitus.....	19
2.2. Teise katse opereerimine ja mõõdetavad parameetrid .....	20
3. TULEMUSED JA JÄRELDUSED .....	22
3.1. Lämmastikühendite tulemused ja järeldused – katse 1 .....	22
3.2. Lämmastikühendite kontsentratsioonide muutus ajas – katse 2 .....	24
3.2. Hapniku kontsentratsiooni muutus ajas – katse 2 .....	30
3.3. Süsiniku kontsentratsioonide muutus ajas – katse 2 .....	31
3.3. pH muutus ajas – katse 2 .....	33
3.4. Järeldused.....	34
KOKKUVÕTE .....	37
TÄNUAVALDUS .....	39
KASUTATUD KIRJANDUS .....	40
Electric current effect on denitrification process in microbial electrosynthesis cell, Summary.....	44

## SISSEJUHATUS

Inimpopulatsiooni pideva suurenemisega tarbitakse üha enam toitu ja energiat, avaldades seeläbi märkimisväärset mõju loodusele. Üheks inimesega seotud keskkonnaprobleemide põhjuseks võib nimetada lämmastikühendite kontsentratsiooni tõusu veekogudes. Peamisteks lämmastikühendite allikateks on tööstus, põllumajandus ja asulad, kus tekkiv nõrg- või reovesi kandub või suunatakse edasi loodusesse [1, 2]. Olukorras, kus lämmastikühendite emissioon keskkonda ületab sealse ökosüsteemi isepuhastusvõime, avalduvad probleemid nagu veekogude eutrofeerumine ehk kinnikasvamine ja joogivee saastumine.

Lämmastikühendite puhul pööratakse antud töös suuremat tähelepanu denitrifikatsioonis esinevatele lämmastikoksiididele, milleks on nitraat ( $\text{NO}_3^-$ ); nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ); lämmastikoksiid (NO) ja naerugaas ehk dilämmastikoksiid ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Nitraadi ja nitriti puhul on tegemist toksiliste ühenditega, mis põhjustavad terviseprobleeme nagu methemoglobineemia ehk sinitõbi ja maovähk [2]. Seetõttu on Eestis ja ka teistes riikides kehtestatud joogiveele nitraadi ja nitriti piirnormid vastavalt 50mg/l ja 0,50mg/l [3]. Naerugaasi puhul on aga tegemist kasvuhoonegaasiga (KHG), mille suurenev kontsentratsioon atmosfääris põhjustab globaalset soojenemist [4].

Nitraadi eemaldamiseks on mitmeid erinevaid füüsikalisi ja keemilisi lahendusi näiteks ionvahetus, pöördosmoos, adsorptsioon, elektrodialüüs ning mikrobioloogilisi lahendusi, mis põhinevad peamiselt denitrifikatsioonil [5, 6].

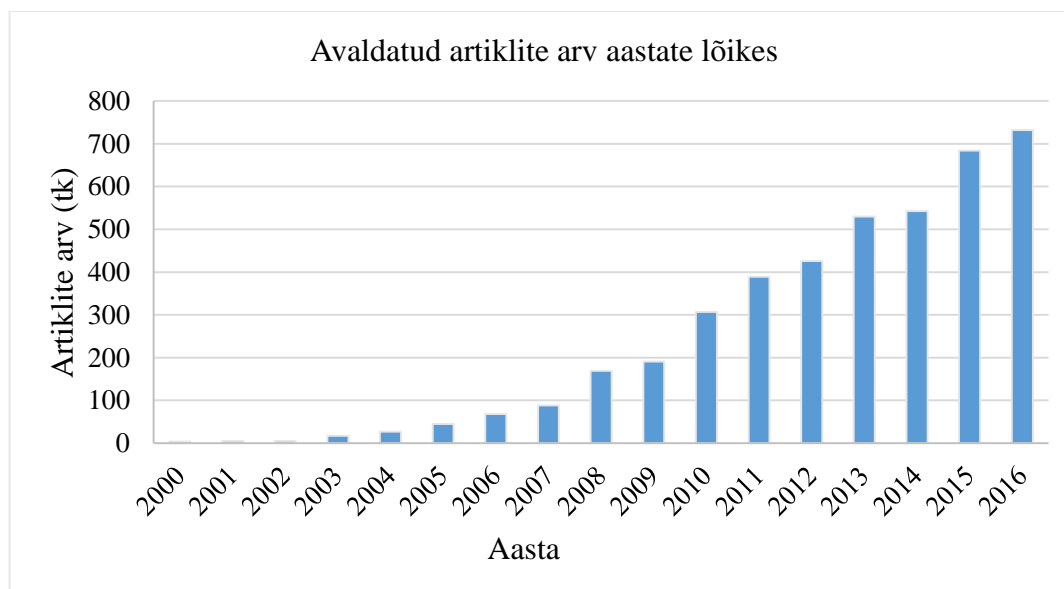
Denitrifikatsiooni korral muudetakse nitraat mikroorganismide poolt naerugaasiks ja molekulaarseks lämmastikuks, mis eralduvad atmosfääri [7]. Täieliku denitrifikatsiooni läbiviimiseks on vajalik elektrondonorite olemasolu. Selleks sobivad hästi orgaanilised süsinikühendid, kuid paljudel juhtudel jääb antud ühendite kontsentratsioon keskkonnas liiga madalaks, mistõttu on denitrifikatsiooni protsess pärsitud. Reoveepuhastusjaamades

kasutatakse antud probleemi lahendamiseks orgaanika lisamist, selline lähenemine suurendab reoveepuhasti jooksvaid kulusid ning igas olukorras pole orgaanika lisamine võimalik [8]. Näiteks joogivee puhastamisel võivad lisatud orgaanilised ained põhjustada sekundaarset reostust, mistõttu on vajalik teistsuguste lahenduste kasutamine.

Antud töö laiem eesmärk on uurida bioelektrokeemiliste süsteemide (BES) kasutusvõimalusi nitraatidest tuleneva veereostuse eemaldamiseks. Täpsemalt vaadatakse kuidas mõjutab mikrobioloogilises elektrosünteesirakus (MES) kasutatav pinge denitrifikatsiooni protsessi ning millised probleemid võivad antud tehnoloogia rakendamisel esineda.

## 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Reaalteadustes, sealhulgas keskkonnatehnoloogias on viimastel aastatel hakatud üha rohkem uurima bioelektrokeemilisi süsteeme. Kui aastal 2000 avaldati Web of Science andmetel 4 BES-i puudutavat artiklit, siis aastal 2016 avaldati neid juba 732 (joonis 1) [9]. Suurenenud huvi bioelektrokeemiliste süsteemide vastu on tingitud mitmest tegurist. Üheks põhjuseks on inimeste teadlikkuse suurenemine globaalse soojenemise suhtes, mistõttu otsitakse alternatiivseid ja keskkonnasäästlikumaid tehnoloogiaid energia tootmiseks [10]. Teiseks põhjuseks on laialdane üleminek taastuvenergiALE, mõjutades positiivselt elektrosünteesi jätkusuutliku tehnoloogia suunas [11]. Kolmanda põhjusena võib välja tuua teaduslikku arengut bioelektrokeemiliste süsteemide valdkonnas, nimelt on suudetud kasutada mikroorganisme katalüsaatoritena, mistõttu on võimalik kasutada odavamaid materjale elektrodidena ja seeläbi on antud tehnoloogia maksumus oluliselt vähenenud [11].

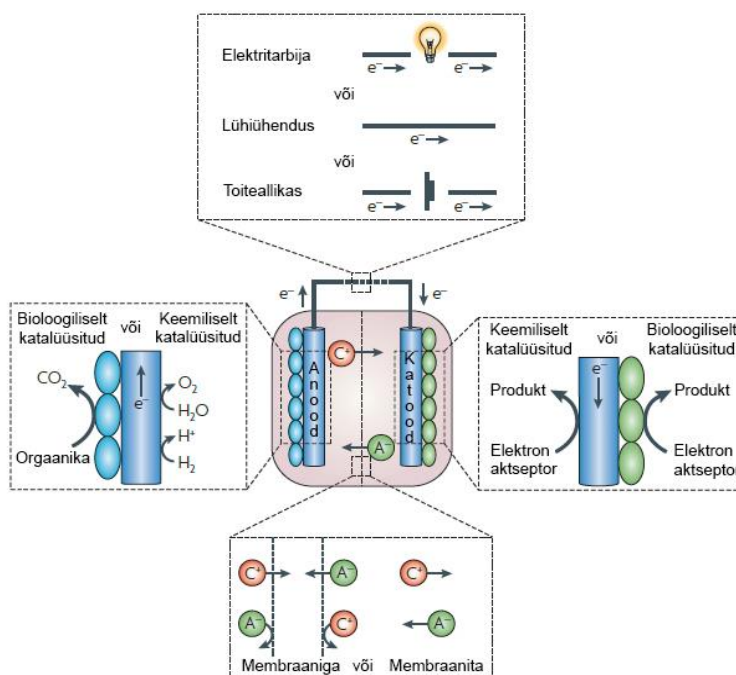


**Joonis 1.** Avaldatud artiklite arv aastate lõikes. Andmed pärinevad Web of Science andmebaasist, kasutades päringut „(microbial AND (electrosynthesis OR "fuel cell" OR MFC))“ [9]

## 1.1. Bioelektrokeemiline süsteem

Bioelektrokeemilise süsteemi puhul on tegemist vooluringiga, kus on omavahel seotud elektrokeemia ja mikrobioloogia – eesmärgiga toota energiat või viia läbi soovitud keemilisi reaktsioone. BES-i tööpõhimõtet on kirjeldatud joonise 2 abil, kus on näha peamised komponendid: elektrolüüt, elektroodid ja mikroorganismid.

Elektrolüüdi (joonisel 2 kujutatud roosa värviga) puhul on tegemist elektrit juhtiva lahusega, milles reaktsioonid toimuvad. Seetõttu on oluline, et sealsed ainete kontsentratsioonid ning keskkonda iseloomustavad parameetrid (elektrijuhtivus, temperatuur, pH) oleksid kätitava protsessi läbiviimiseks sobilikud. [11, 12]



**Joonis 2.** Bioelektrokeemiline süsteem (BES) ja selle peamised komponendid ning protsessid [2]

Elektroodid liigituvad nendel läbiviivate redoksreaktsioonide alusel anoodiks ja katoodiks. Anoodil toimub ühendite oksüdeerumine, mille käigus vabanevad elektronid suunatakse edasi katoodile, kus need loovutatakse elektronaktseptorile ja toimub ühendi redutseerumine [12]. Lähtuvalt BES-i eesmärgist kasutatakse erinevatest materjalidest elektroode, mida on omakorda võimalik mikroorganismidega rikastada [13].

Bioelektrokeemilist süsteemi saab kasutada elektritootmiseks, sellisel juhul on tegemist mikrobioloogilise kütuseelemendiga (MKE) [14]. BES-i saab kasutada ka mikrobioloogilise elektrosünteesirakuna, et mõjutada reaktsiooni kineetikat või viia läbi termodünaamiliselt ebasoodsaid reaktsioone [6, 15, 16].

Bioelektrokeemilist süsteemi saab ehitada kasutades erinevaid tõkkeid. Tõkete kasutamiseks on mitmeid erinevaid põhjuseid, näiteks erinevate polaarsustega elektrodide lahus hoidmine, et vältida lühiühendust. Kuid peamiselt mõeldakse tõkete puhul membraane, mille ülesandeks on ära hoida anoolüüdi ja katoolüüdi segunemist ning vältida ionide ülekannet ühest elektrolüüdist teise. [12]

## **1.2. Bioelektrokeemiliste süsteemide rakenduskohad**

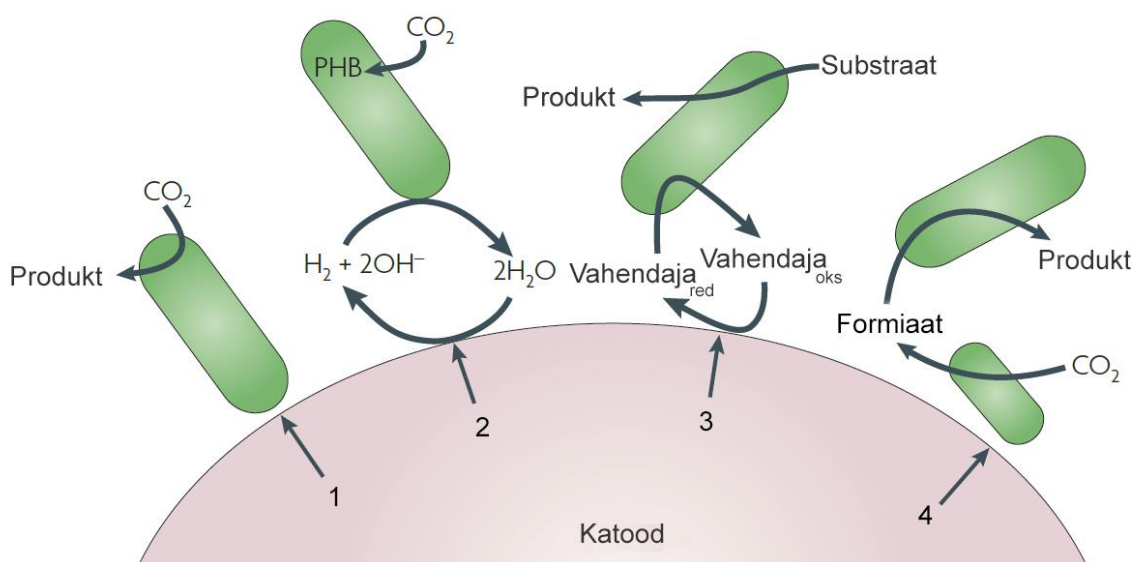
Bioelektrokeemilisi süsteeme on võimalik kasutada väga erinevatel eesmärkidel. Tuntuim rakendusviis on mikrobioloogiliste kütuseelementide kasutamine reoveepuhastuses, kus anoodil toimub orgaaniliste ühendite oksüdeerimine ja katoodil hapniku või teiste sobivate ühendite redutseerimine. Üldiselt jääb MKE-de elektritootlikus väikseks, mistõttu pole antud tehnoloogia ainult energia tootmise eesmärgil laialdast kasutust leidnud. [17–19]

Teiseks rakendusviisiks on erinevad biosensordid, näiteks on võimalik ehitada sensoreid bioloogilise hapnikutarbe määramiseks. Varasemad tööd on näidanud, et nende standardhälve jääb vahemikku  $\pm 3\%$  kuni  $\pm 12\%$ . Lisaks on antud sensorite puhul ühe eelisena välja toodud pikk eluiga, ulatudes kuni viie aastani. [20]

Üha rohkem on hakatud uurima aga mikrobioloogiliste elektrosünteesirakkude kasutusvõimalusi. Reoveepuhastites on võimalik kasutada MES-e denitrifikatsiooni toetamiseks, kus biokatoodid käituvad elektrondonoritena, vähendades seeläbi orgaanilise süsinikühendite vajadust [5, 13, 15, 21–23]. MES-e on võimalik veel kasutada saastunud pinnase korral bioremediatsiooni toetamiseks. Paigaldades pinnasesse elektrodid luuakse madalamates kihtides sobivad tingimused näiteks polüaromaatsete süsivesinike (PAH) lagundamiseks [24].

### 1.3. Elektronide ülekanne elektrodilt mikroorganismidele

Elektronide ülekanne elektrodilt mikroorganismidele on uuritud viimastel aegadel üha enam ning välja on käidud mitmeid erinevaid võimalikke toimimismehhanisme. Laias laastus jagunevad elektroniülekande mehhanismid neljaks, liikudes joonisel 3 vasakult paremale: otsene elektronide ülekanne elektrodilt mikroorganismile, elektronide ülekanne läbi katoodil moodustuva vesiniku, elektronide ülekanne läbi vahendaja (näiteks *methyl viologen*) ja elektronide ülekanne läbi metaanaadi produtseerimise. [10, 11, 25, 26]



**Joonis 3.** Elektronide ülekande mehhanismid elektrodilt mikroorganismidele. 1 – otsene elektronide ülekanne; 2 – elektronide ülekanne läbi katoodil tekkiva vesinikus; 3 – elektronide ülekanne läbi vahendava ühendi; 4 – elektronide ülekanne läbi ensüümide, kes toodavad vajalikku lähteainet järgmistele mikroorganismidele. PHB – *poly-β-hydroxybutyrate* [11]

Esimene ja eelistatuim elektronide ülekande viis on otsene ülekanne elektrodilt mikroorganismile. Antud lähenemisel puuduvad vahendajatega kaasnevad probleemid nagu toksilisus või lahustuvus ja difusioon [11]. 2004 aastal tegi Kelvin B. Gregory koos meeskonnaga uurimuse, mille käigus viidi läbi katse bioelektrosünteesi rakus, et uurida kas grafiidist elektroodi on võimalik kasutada elektronide allikana mikroorganismide puhul. Selleks kasvatati elektrodidele *Geobacteraceae metallireducens* kultuur, kes on võimelised

redutseerima nitraati, kasutades atsetaati elektron-doonorina. Valitud bakterikultuur oli sobilik antud katse jaoks, sest nad ei ole võimelised kasutama vesinikku elektron doonorina. Katse käigus toimus nitriti akumulatsioon, moodustades 90% kasutatud nitraadist ja kulutatud elektrienergia väärtused olid kooskõlas nitraadi redutseerimisega. Seega võib väita, et elektronide otsene ülekande elektroodilt mikroorganismidele on võimalik [27].

Teine elektronide ülekande võimalus on vesiniku vahendusel. Vesinikul on küll halb lahustuvus, kuid sellest olenemata peetakse vesinikku parimaks elektronide allikaks, sest tegemist on mitte-toksilise ühendiga ning selle tootmisel ei teki teisi kõrvalprodukte peale vee [28, 29]. Silmas tuleb aga pidada seda, et protsessi läbiviivad mikroorganismid peavad suutma kasutada vesinikku lähteainena. Näiteks on võimalik sellist lähenemist kasutada autotroofse denitrifikatsiooni läbiviimiseks. Liu ja teiste tehtud katses võrreldi omavahel abiootilist katoodi, biokatoodi ja vesinikku tootvate bakteritega rikastatud biokatoodi ning saavutatud puhastusefektiivsus oli algkontsentratsiooni 130mg-NO<sub>3</sub>/l puhul vastavalt 13%, 59% ja 95% [28]. Sellele toetudes võib väita, et vesinikku tootvate ja denitrifikatsiooni läbiviivate mikroorganismide koostööl on võimalik muuta oluliselt efektiivsemaks denitrifikatsiooni protsessi.

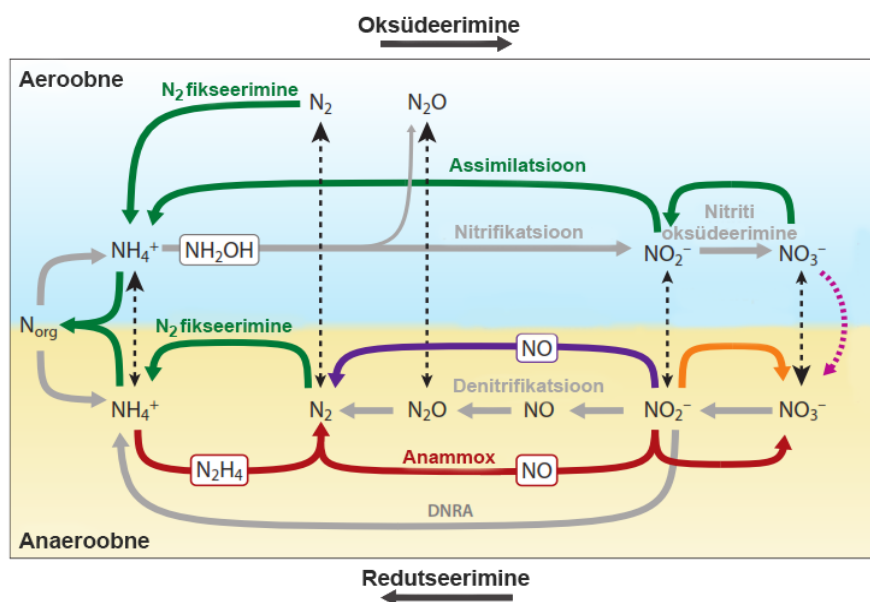
Kolmas elektronide ülekande viis toimub vahendajate abil. Vahendajaid võib olla mitmeid erinevaid, näiteks *thionin* (0,06V vs standard vesinikelektrood (SHE)), *neutral red* (-0,33V vs SHE) ja *methyl viologen* (-0,46V vs SHE). Vesinikuga võrreldes on nende eeliseks parem lahustuvus ning sõltuvalt protsessist on võimalik valida erineva redokspotentsiaaliga ühendeid. Vahendajate miinusteks on aga nende võimalik toksilisus mikroorganismidele, ühendite stabiilsus ning väljavooluga kaasnevad kaod [11]. 1999. aastal tegid D. H. Park ja teised katse, mille käigus uuriti kas *neutral red*-i on võimalik kasutada elektron doonorina. Selleks ehitati bioelektrokeemiline süsteem, mille katoodil toodeti *succinate* kasutades lähteainena metaanaati. Katses selgus, et olukorras kus puudus vesinik ja ei viidud läbi *neutral red*-i redutseerimist, ei olnud mikroorganismid võimelised kasvama ega toimetama. Mikroorganismid viisid protsessi läbi ka ainuüksi vesiniku juuresolekul, kuid kasutades *neutral red*-i redutseerimist elektron doonorina saavutati suurem *succinate* tootlikkus. Metaanaadi algkontsentratsioonil 8,0g/l korral saavutati

succinate kontsentratsioon 5,4g/l *neutral red* vahendajana kasutamisel ja 2,0g/l vesiniku juuresolekul [30].

Viimase elektronide ülekande mehhanismina võib välja tuua biokatalüütilise vaheühendite tootmise. Varasemalt on näiteks kasutatud katoodile seotud volframit sisaldavaid metaanaadi dehüdrogenaasi ensüüme, et toota süsihappegaasist metaanaati, mida on võimalik kasutada järgmiste mikroorganismide poolt lähteainena. [11, 31]

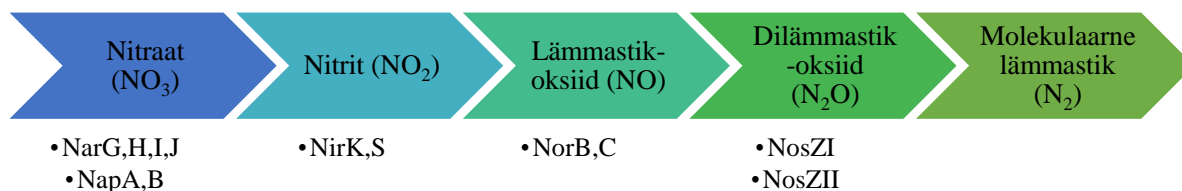
### 1.4. Denitrifikatsioon

Denitrifikatsioon on osa lämmastiku aineringest (joonis 4), mille käigus mikroorganismid kasutavad nitraati ja teisi vaheühendeid elektronide akseptorina, redutseerides nitraati järkjärgult molekulaarseks lämmastikuks ( $N_2$ ). Üldiselt toimub denitrifikatsiooni läbiviivate proteiinide tootmine anaeroobsetes tingimustes, mistõttu mõjub hapnik antud protsessile inhibeerivalt. Peamiseks põhjuseks on see, et denitrifitseerijatele on hapniku kasutamine elektroni akseptorina energeetiliselt tulusam kui nitraadi kasutamine [32]. Lisaks on täheldatud, et hapnik piirab nitraadi liikumist läbi rakukesta, pärssides seeläbi membraanile kinnitunud nitraadi reduktaasi aktiivsust [33].



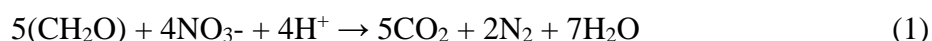
Joonis 4. Lämmastikuringe, sealhulgas denitrifikatsioon [7]

Tegemist on mitmejärgulise protsessiga, milles igat etappi viib läbi vastav ensüüm. Alustades nitraadist ja liikudes mööda metabolismirada molekulaarse lämmastiku suunas (joonis 5) võtavad osa järgnevad ensüümid: nitraadi reduktaas (NarG,H,I,J ja NapA,B), nitriti reduktaas (NirK,S), lämmastikoksiidi reduktaas (NorB,C) ja dilämmastikoksiidi reduktaas (NosZI ja NosZII). [7, 34–36]



**Joonis 5.** Denitrifikatsiooni vaheühendid ja neid redutseerivad ensüümid [7, 36]

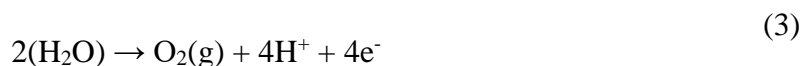
Denitrifikatsioon jaotatakse sõltuvalt kasutatava süsinikuallika poolt kaheks: heterotroofne- ja autotroofne denitrifikatsioon. Heterotroofse denitrifikatsiooni (1) korral kasutavad mikroorganismid elektrondoonorina orgaanilist süsinikku ja on veepuhastuse praktikas enam kasutust leidnud protsess. Autotroofse denitrifikatsiooni (2) puhul kasutavad mikroorganismid anorgaanilist süsinikku, näiteks süsihappegaasi (CO<sub>2</sub>) või bikarbonaati (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) süsinikuallikana ning vesinikku (H<sub>2</sub>) elektrondoonorina. [1, 5, 21, 37]



Denitrifikatsiooni protsess toimub optimaalselt kui hapniku kontsentratsioon jääb alla 0,3-0,5mgO<sub>2</sub>/l, kuid kirjandusest on ka leida näiteid, kus denitrifikatsioon toimub ka hapniku kontsentratsioonidel 4mgO<sub>2</sub>/l [38–40]. Optimaalne pH vahemik denitrifikatsiooni protsessi läbiviimiseks jääb vahemikku 6-8 [38]. Temperatuuri suhtes on denitrifikatsioon mõjutatav vahemikus 5-20°C, temperatuuri vahemikus 20-25°C saavutab denitrifikatsiooni protsess maksimaalse efektiivsuse [38]. Kolmas oluline parameeter denitrifikatsiooni puhul on süsiniku ja lämmastiku suhe (C:N suhe), mille optimaalset suhet on keeruline välja tuua, kuna erinevates keskkondades on täheldatud vastandlikke tulemusi [38].

#### 1.4. Denitrifikatsioon mikrobioloogilises elektrosünteesirakus

Sõltuvalt anoodil ja katoodil toimuvate protsesside olemusest on mõnikord vaja bioelektrokeemilises süsteemis kasutada välist energiaallikat, et luua sobivad tingimused reaktsioonide läbi viimiseks. Antud töös on peamisteks reaktsioonideks anoodil toimuv vee oksüdeerumine hapnikuks (3), mille käigus vabanevad elektronid suunatakse edasi katoodile. Katoodil kasutatakse saadud elektronid ära vesiniku tootmiseks, mida mikroorganismid kasutavad autotroofse denitrifikatsiooni läbiviimiseks (2) või toimub otsene elektronide ülekanne mikroorganismidele, kes kasutavad saadud elektrone denitrifikatsiooni läbiviimiseks. [11]



Anoodil toimub vee oksüdeerumine hapnikuks standard potentsiaali 0,82V juures ( $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2$ ;  $E^{\circ} = 0,82\text{V vs SHE}$ ) ning katoodil toimub prootoni ( $\text{H}^+$ ) redutseerimine molekulaarseks vesinikuks ( $\text{H}^+/\text{H}_2$ ;  $E^{\circ} = -0,41\text{V vs SHE}$ ;  $\text{pH} = 7$ ) juures. Lahutades katoodi potentsiaalilt anoodi potentsiaali (4), saab tulemuseks  $\Delta G = -1,23\text{V}$  mis tähendab, et Gibbsi vabaenergia suureneb ning protsessi läbiviimiseks on vaja rakendada täiendavat energiat [11, 12]. Kuna võimalik on ka otsene elektronide ülekanne mikroorganismidele ja elektrokeemiline nitraadi redutseerimine, siis on tabelis 1 välja toodud erinevate vaheühendite ja kogu autotroofset denitrifikatsiooni iseloomustavad standard-potentsiaalid. Sarnaselt olukorrale kus redutseeritakse vesinikku on vaja ka autotroofse denitrifikatsiooni läbiviimiseks kasutada täiendavat energiaallikat(5). Kuna tabelis 1 väljatoodud standard-potentsiaalid on arvatud hõbe/hõbekloriid elektroodi suhtes, siis on vaja teisendada antud väärtused standard-vesinikelektroodile ümber ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ;  $E^{\circ} = 0,22\text{V vs SHE}$ ) [41].

$$-0,41\text{V} (\text{H}^+/\text{H}_2) - 0,82\text{V} (\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2) = -1,23\text{V} \quad (4)$$

$$0,77\text{V} (\text{NO}_3^-/\text{N}_2 \text{ vs SHE}) - 0,82\text{V} (\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2) = -0,05\text{V} \quad (5)$$

**Tabel 1.** Denitrifikatsiooni ja selle vaheühendite redutseerimis-reaktsioonide standard elektroodi potentsiaalid [15]

<b>Protsess</b>	<b>Katoodil toimuv redutseerimis-reaktsioon</b>	<b>E<sup>0</sup> (V vs Ag/AgCl)</b>
Nitraadi redutseerimine	$\text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	+0,233
Nitriti redutseerimine	$\text{NO}_2^- + \text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$	+0,150
Lämmastikoksiidi redutseerimine	$\text{NO} + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow 0,5\text{N}_2\text{O} + 0,5\text{H}_2\text{O}$	+0,975
Dilämmastikoksiidi redutseerimine	$0,5\text{N}_2\text{O} + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow 0,5\text{N}_2 + 0,5\text{H}_2\text{O}$	+1,155
Autotroofne denitrifikatsioon	$\text{NO}_3^- + 6\text{H}^+ + 5\text{e}^- \rightarrow 0,5\text{N}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$	+0,549

## 2. MATERJAL JA METOODIKA

Tulenevalt töö eesmärgist, uurida, kuidas mikrobioloogilises elektrosünteesirakus kasutatav elektripinge mõjutab denitrifikatsiooni, viidi läbi kaks erinevat katset. Esimese katse puhul valmistati 12 läbivoolset mikrobioloogilist elektrosünteesi reaktorit (joonis 6), mis olid jagatud nelja gruppi – igas grupis kolm paralleeli ning iga grupp erines teisest ainult rakendatava elektripinge poolest, milleks olid 0,6V; 1,4V; 1,6V ja kontroll, mille puhul elektrivoolu ei rakendatud. Antud katses mõõdeti lisaks veeproovidele (TN, NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, TOC, TC) ka diämmastikoksiidi (N<sub>2</sub>O) voogusid.



**Joonis 6.** Katse 1 konfiguratsioon, joonisel on näha 12 MES-reaktorit (väiksemad anumad lauapeal) ning suuremad toitelahuse mahutid (laua all). Aknalaua all on lisaks näha kolme toiteploki ning kahte peristaatilist pumpa. Anaeroobse keskkonna tekkeks – kaeti anumad vastavate kaantega.

Esimese katse puhul oli probleeme tehnoloogiliste lahendustega (ebahühtlane pealevoolu jaotus ja elektroodide ühendused), mistõttu saadud tulemused olid väga kõikumad ning isegi kui denitrifikatsiooni protsess toimus, siis oli see põhjapanevate järelduste

tegemiseks liiga madala intensiivsusega. Teise katse jaoks valmistati 4 identset mikrobioloogilist elektrosünteesirakku (joonis 7), mis erinesid üksteisest ainult rakendavate elektripingete poolest (0,4V; 1,0V, 1,6V ja kontroll – elektripinget ei rakendatud). Valmistatud reaktorid olid ehituselt oluliselt lihtsamad ning väiksemad, mistõttu gaasivoogusid antud katse käigus ei mõõdetud ja piirduti ainult veeproovide analüüsimisega (TN, NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>, TOC).



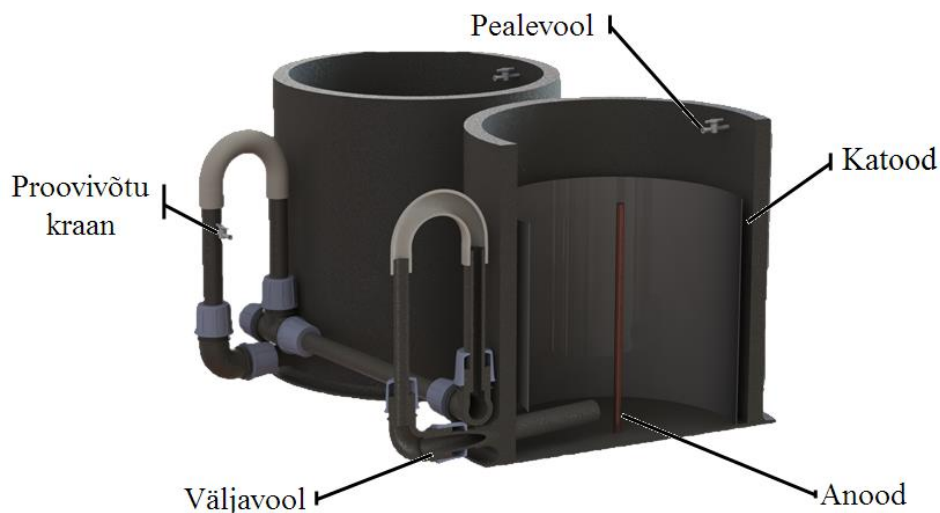
**Joonis 7.** Teise katse konfiguratsioon, ees on näha nelja MES-reaktorit ning kolme elektripingega manipuleerimiseks kasutatud toiteplokki.

## 2.1. Esimese katse ülesehitus

Esimese katse jaoks valmistati 12 identset MES-reaktorit, mille ülesehitus on väljatoodud joonisel 8. Reaktorid valmistati 35cm läbimõõduga torust, kõrgusega 40cm. Reaktor täideti põhjast 35cm kõrguseni, ehk protsessi toimimise keskkonna ruumala oli antud katses 33,6 liitrit.

Pealevoolu tagamiseks kasutati kahte kolme kanaliga pumpa, ehk ühe kanali kaudu pumbati toitelahust kahte reaktorisse. Parema jaotuse tagamiseks varustati iga pealevool

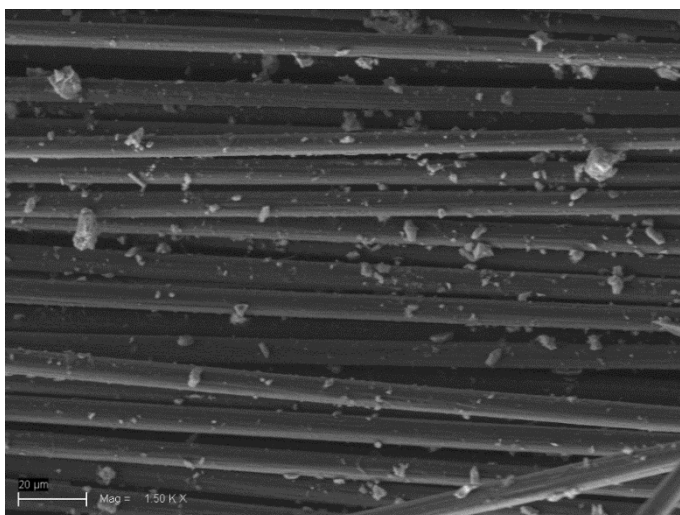
kraaniga, kuid madala vooluhulga tõttu jäi jaotus siiski ebahütlaseks. Kõik reaktorid võtsid pealevoolus kasutatava lahuse ühest ja samast 400 liitrisest mahutavusega paagist.



**Joonis 8.** Esimese katse ülesehitus, millel on väljatoodud pealevool, väljavool, proovivõtukraan, anood ja katood

Väljavool valmistati PE-torust (polüetüleen) ning tagasipööre tehti selliselt, et säiliks ühtlane veetase, milleks on 35cm põhjast. Väljavoolule on lisatud veeproovide võtmiseks vastavad kraanid ning ummistuste ja substraadi ärakande vältimiseks on väljavoolu ette paigutatud geotekstiil.

Biokatoodid valmistati süsinikkiust-kangast (joonis 9) suurusega 100x30cm, liimitud otstest kokku, tekitades 31,5cm läbimõõduga toru. Anoodina kasutati 1cm-se läbimõõduga vasktoru, pikkusega 30cm. Elektroodid on süsteemis ühendatud laboratoorse toiteploki, kasutades 1mm<sup>2</sup> ristlõikega vaskjuhtmeid.



**Joonis 9.** Elektroodi valmistamiseks kasutatud süsinikkiust-kangas, pildistatud skanneeriva elektronmikroskoobi (SEM) abil (Foto: Päärn Paiste).

Vooluallikana kasutati muudetava pingega (0-15V) laboratoorse toiteploki, voolutugevusega 2A (Powerlab, PS1502D). Toiteploki pulsatsioon jääb vahemikku 2mV, mis ei mõjuta antud katsete täpsust.

Reaktori täitmiseks kasutati 31 liitrit kergkruusa, mis segati kokku Nõo tehismärgala horisontaalfiltrist võetud kergkruusast (fraktsioon 2...4mm) ja värskest kergkruusast (2...4mm) suhtel 1:1-le. Horisontaalvoolulisest pinnasfiltrist võeti kergkruus eesmärgiga – tagada reaktorites sobivate mikroobikoosluste olemasolu, sest tehismärgalades toimub denitrifikatsiooni protsess peamiselt horisontaalvoolulises filtris.

## **2.2. Esimese katse opereerimine**

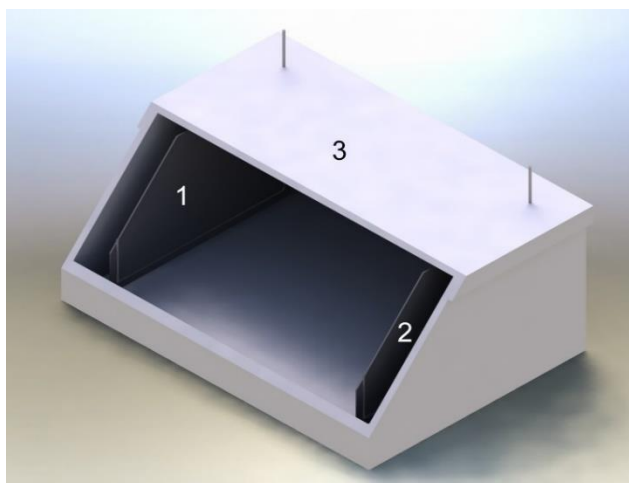
Esimest katset viidi läbi ajavahemikus 22. juuli 2016 kuni 14. november 2016. Reaktorites rakendati pingeid gruppide kaupa 0,6V, 1,4V ja 1,6V ja kontroll ehk reaktorid mida elektrivooluga ei mõjutatud. Kuna katse alguses ei saavutatud piisavalt madalat hapniku kontsentratsiooni, siis alates 23. septembrist 2016 suleti anumad kaanega.

Toitelahus valmistati kraaniveest, kuhu varasemate tööde eeskujul lisati vajalike toitainete tagamiseks 1g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2g/l  $\text{NaHCO}_3$ ; 81,53mg/l  $\text{KNO}_3$  [13]. Valminud toitelahuse pH oli 7,12, üldlämmastiku kontsentratsioon 19mgN/l, nitraadi kontsentratsioon 16mgN- $\text{NO}_3$ /l, üldorgaanilise süsiniku kontsentratsioon 2,8mgC/l ja üldsüsiniku kontsentratsioon oli 67mgC/l. Kõik reaktorid täideti lahusega katse alguses käsitsi, et teha kindlaks reaktorite veemahutavus, milleks on  $23,7 \pm 0,7$ liitrit. Iga reaktorit koormatati valmistatud reoveega koormusega 50mm/m<sup>2</sup> päevas, mis teeb viibeajaks 5päeva.

Katse käigus võeti proove seitsmel korral, vastavalt tulemustele kas üks või kaks korda kuus. Veeproovidest määrati üldlämmastiku-, nitraadi-, nitriti-, üldorgaanilise süsiniku ja üldsüsiniku kontsentratsioonid. Lisaks veeproovidele võeti ka gaasiproovid, et hinnata naerugaasi ( $\text{N}_2\text{O}$ ) gaasivoogusid. Kohapeal mõõdeti ka keskkonda iseloomustavad parameetrid: pH, hapniku kontsentratsioon, elektrijuhtivus ja temperatuur. Täpsemad meetodikad on väljatoodud allpool tabelis 2.

### 2.3. Teise katse ülesehitus

Ühe-kambriline membraanita MES-rakk valmistati 1500ml (10cm x 15cm x 10cm) mahutavusega polüpropüleen (PP) karbist (joonis 10). Anaeroobsete tingimuste loomiseks suleti anumad pealt kaanega ning vetikate kasvu vältimiseks kaeti karbid valgust läbilaskmatu kattega, pärssides seeläbi fotosünteesi.



**Joonis 10.** MES-raku ülesehitus. 1, 2 – elektroodid, vastavalt ühendusele kas anood või katood; 3 – rakukest

Mõlemasse anuma äärde paigaldati 13cm x 8cm (108cm<sup>2</sup>) suurused süsinikkiudkangast (joonis 9) valmistatud elektroodid, üks anoodi ja teine katoodi jaoks. Elektroodide ühendused ja karbiläbiviik olid valmistatud 1mm<sup>2</sup> ristlõikega roostevabast terasest traadist, et vältida esimese katse käigus tekkinud olukorda, kus ühenduskohad läbi oksüdeerusid (joonis 25).

Vooluallikana kasutati muudetava pingega (0-15V) laboratoorset toiteplokki, voolutugevusega 2A (Powerlab, PS1502D). Toiteploki pulsatsioon jääb vahemikku 2mV, mis ei mõjuta antud katsete täpsust.

Elektrolüüt, mis on ühtlasi ka mikroorganismide substraat, valmistati kraaniveest, kuhu lisati vajalike toitainete tagamiseks 1g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2g/l NaHCO<sub>3</sub>; 0,25g/l KNO<sub>3</sub> [13]. Võrreldes esimese katsega tõsteti KNO<sub>3</sub> kontsentratsiooni lahuses 3 korda, et suurendada nitraatide kättesaadavust ja intensiivistada seeläbi denitriifitseerijate elutegevust. Reaktoris vajalike mikroorganismide tagamiseks lisati 1000ml lahuse kohta 110ml inokulumi. Kasutatud inokulum võeti Nõo reoveepuhastist, millest eemaldati suuremad osakesed tsentrifuugides materjali 1 minut pööretel 3000p/min. Suuremate osakeste eraldamine oli antud juhul vajalik, et vähendada orgaanika sisaldust lahuses. Valminud lahuse elektrijuhtivus oli 3,69mS/cm; pH 7,05 ja hapniku kontsentratsioon 6,95mgO<sub>2</sub>/l.

## 2.2. Teise katse opereerimine ja mõõdetavad parameetrid

Kõik reaktorid täideti 1200ml elektrolüüdiga ning hoiti töös toa temperatuuril 23° C. Igale reaktorile rakendati erinev elektripinge: 0,4V; 1,0V; 1,6V ja kontroll mille puhul polnud elektrodid omavahel kuidagi ühendatud.

Katse kestis kokku 16 päeva ning selle jooksul mõõdeti 2 korda nädalas füüsikalised- ja keemilised parameetrid: pH, temperatuur, elektrijuhtivus ja hapniku kontsentratsioon ning võeti veeproovid, millest määrati erinevad süsiniku- ja lämmastikühendite kontsentratsioonid (tabel 2). Katse lõpus mõõdeti kõikides reaktorites elektrolüüdi kogus, et hinnata aurustumisest põhjustatud kadusid.

**Tabel 2.** Töö käigus mõõdetud parameetrid, meetoodika ja seadmed

Mõõdetav parameeter	Metoodika ja seadmed
Elektrijuhtivus	Elektrijuhtivust mõõdeti seadmega <i>WTW Multi 3420</i> , millele oli ühendatud külge elektrijuhtivuseks mõeldud andur <i>WTW TetraCon 925</i> .
Temperatuur	Temperatuuri mõõtmiseks kasutati hapnikukontsentratsiooni andurisse <i>WTW FDO 925</i> ehitatud termomeetrit, mis oli ühendatud seadmega <i>WTW Multi 3420</i> .
pH	pH mõõtmiseks kasutati seadet <i>WTW Multi 3420</i> ja andurit <i>WTW pH-Electrode SenTix 940-3</i> .
Hapniku kontsentratsioon	Hapniku kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati seadet <i>WTW Multi 3420</i> , millele oli ühendatud vastav andur <i>WTW FDO 925</i> .
Üldsüsinik (TC)	Üldsüsiniku ja üldorgaanilise süsiniku kontsentratsioonid määrati standardi: EVS-EN 1484 alusel, kasutades aparatuuri: <i>Vario TOC, TNb detektoriga; 850° C, Elementar GmbH, Germany</i> .
Üldorgaaniline süsinik (TOC)	
Üldanorgaaniline süsinik (TIC)	Üldanorgaanilise süsiniku kontsentratsioon on saadud arvutuslikult, lahutades üldsüsiniku kontsentratsioonist üldorgaanilise süsiniku kontsentratsioon.

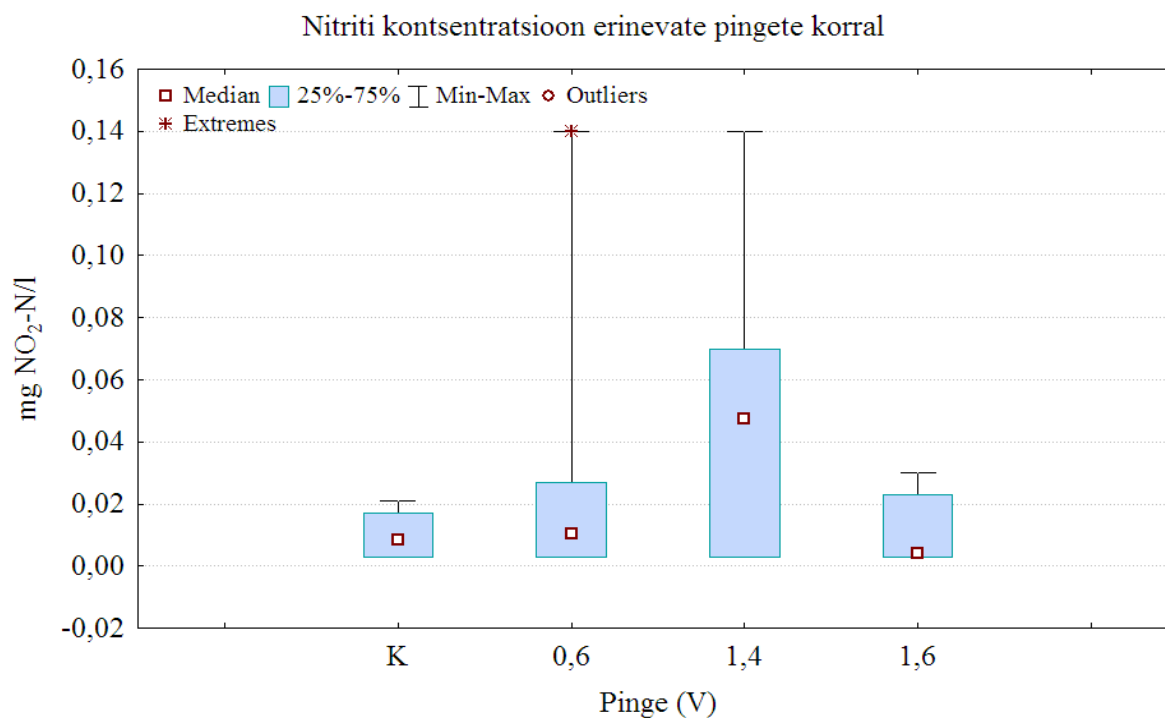
Üldlämmastik (TN)	Üldlämmastiku kontsentratsioon, määrati proovist vastavalt standardile EVS-EN 12260. Mõõtmistel kasutati aparatuuri: <i>Vario TOC, TNb detektoriga; 850° C, Elementar GmbH, Germany.</i>
Nitraat (NO <sub>3</sub> )	Nitraadi kontsentratsioon määrati ionkromatograafia abil, lähtudes standardist SFS 5752.
Nitrit (NO <sub>2</sub> )	Nitriti kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriliselt, kasutades asovärvainega meetodit SFS 3029.
Ammoonium (NH <sub>4</sub> )	Ammooniumi kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriliselt, kasutades Hach Lange Nessleri meetodit.
Gaasiproovid (N <sub>2</sub> O)	Gaasivoogusid mõõdeti staatilise suletud kambri meetodil läbipaistmatute PVC kambritega (maht 11,4l). Kambrid saavutasid õhutiheduse reaktoris oleva veekihi abil, mistõttu spetsiaalsete rõngaste kasutamine polnud vajalik. Kambritest koguti 5 proovi ajahetkedel 0, 10, 20, 40 ja 60 minutil, kasutades selleks eelvakumeeritud (0,3 mbar) 100ml klaaspudeleid. Kogutud gaasiproovid analüüsiti hiljem Tartu Ülikooli geograafia osakonna laboris <i>Shimadzu GC-2014</i> gaaskromatograafia.

### 3. TULEMUSED JA JÄRELDUSED

#### 3.1. Lämmastikühendite tulemused ja järeldused – katse 1

Esimese katse käigus oli peamiseks probleemiks ühtlase pealevoolu tagamine ning sellest tulenevalt vähenes ka andmete võrreldavus. Lisaks ei õnnestunud katse käigus denitrifikatsiooni protsessi tõhusalt käivitada, mistõttu otsustati katse lõpetada ja uurida kogu protsessi väiksemal skaalal (katse 2). Esimese katse lõpuperioodil 17. oktoober 2016 kuni 14. november 2016 esinesid aga siiski mõningad märgatavad erinevused proovide tulemustes.

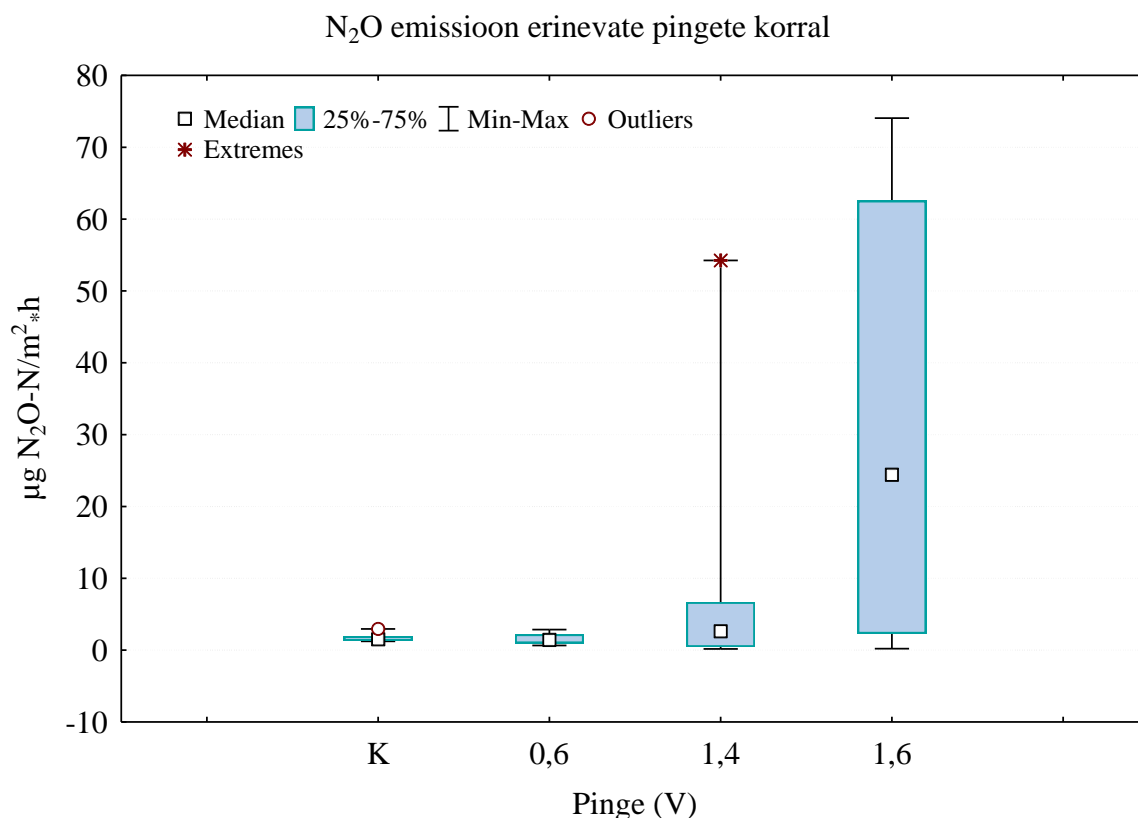
Joonisel 11 on väljatoodud nitriti kontsentratsioonid erinevate pingete korral. Kõrgema pinge puhul on märgata suuremat nitriti kontsentratsiooni, mis võiks viidata denitrifikatsiooni esimese etapi toimumisele, mille käigus nitraat redutseeritakse nitritiks.



**Joonis 11.** Nitriti kontsentratsioonide erinevus erinevate pingete korral

Samal ajavahemikul olid põhilised denitrifikatsiooni mõjutavad parameetrid kõikide reaktorite lõikes praktiliselt samad: hapniku kontsentratsioon  $0,67 \pm 0,28 \text{ mgO}_2/\text{l}$ , pH  $7,48 \pm 0,06$  ja üldorgaanilise süsiniku kontsentratsioon  $1,4 \pm 0,15 \text{ mgC/l}$ . Seega võiks eeldada, et antud erinevus on tingitud reaktorites rakendatavast pingest, kusjuures suurim nitriti kontsentratsioon esines pinge 1,4V korral.

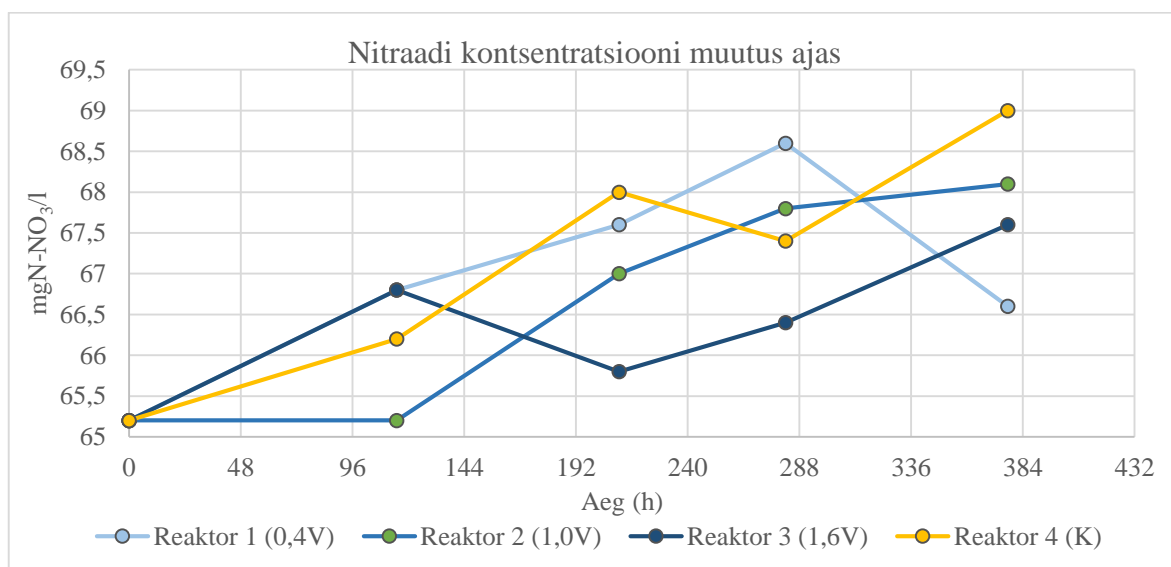
Denitrifikatsiooni toimumist toetab ka joonis 12, kus on märgata naerugaasi emissioonide suurenemist kõrgemate pingete korral. Naerugaasi teke on eelviimane etapp denitrifikatsiooni protsessis, mille käigus lämmastikmonooksiid redutseeritakse  $\text{N}_2\text{O}$ -ks. Antud tulemused langevad kokku ka nitriti kontsentratsioonidega ja võiks seletada seda, miks pinge 1,6V korral oli nitriti kontsentratsioon madalam, võrreldes teiste gruppidega.



**Joonis 12.** Dilämmastikoksiidi voogude erinevus reaktorites, erinevate pingete kaupa

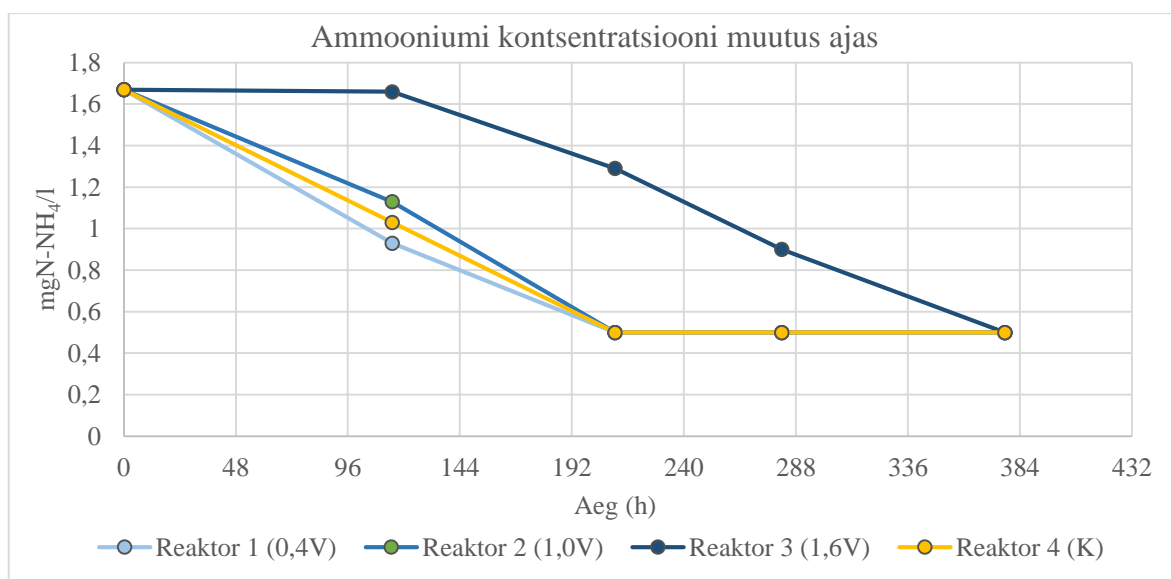
Reaktorite puhul, millel rakendati pinget 1,6V oli emitteeritav  $\text{N}_2\text{O}$  kogus võrreldav näiteks tehismärgalade vertikaalvoolulise pinnasfiltriga, kus naerugaasi keskmine emissioon jääb vahemikku  $35\text{-}44 \mu\text{gN-N}_2\text{O}/\text{m}^2 \cdot \text{h}$  [42].

### 3.2. Lämmastikühendite kontsentratsioonide muutus ajas – katse 2



**Joonis 13.** Nitraadi kontsentratsiooni muutus ajas

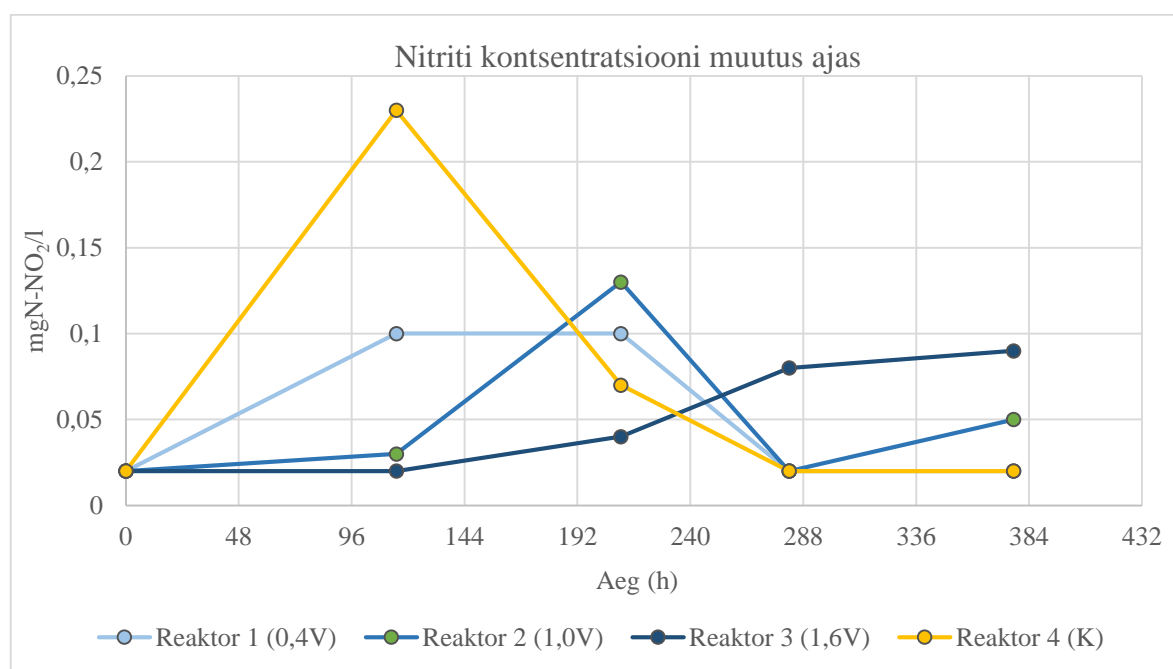
Vastupidiselt eeldatavale, nitraadi kontsentratsiooni langemisele, toimus hoopis selle suurenemine (joonis 13). Esialgne nitraadi kontsentratsiooni tõus võis olla põhjustatud nitrifikatsioonist, kuna reoveepuhastusjaamast võetud inookulum sisaldas endas ammooniumi 1,67mgN-NH<sub>4</sub>/l (joonis 14), mis muudetakse mikrobioloogiliste protsesside käigus nitritiks ja seejärel nitraadiks [7].



**Joonis 14.** Ammooniumi kontsentratsiooni muutus ajas

Jooniselt 14 on näha, et kõikides reaktorites toimus nitrifikatsioon, mille käigus tarbiti ära lahuses olev ammoonium. Reaktoris 3 (1,6V) korral toimus nitrifikatsioon aeglasemalt ning esines ka märgatav viivitus võrreldes teiste reaktoritega. Kuna nitrifikatsiooni protsessi toimub aeroobsetes tingimustes, siis võib antud erinevust seletada läbi hapniku kontsentratsiooni, mis oli antud reaktori puhul kõige madalam (joonis 21) [38]. Reaktorid (1; 2 ja 4) saavutasid madalaima määratava ammooniumi kontsentratsiooni ( $<0,5\text{mgN-NH}_4/\text{l}$ ) 210 tundi pärast katse algust ning reaktor 3 jõudis samasse seisundisse 377 tunnil.

Kuna kontsentratsioonid on antud ioonides esineva lämmastiku alusel, siis maksimaalne teoreetiline kogus nitritit või nitraati, mis võis ammooniumi tarbimisel tekkida, on võrdne määratud ammooniumi kontsentratsiooniga ( $1,67\text{mgN-NO}_3/\text{l}$ ). Liites selle esialgsele nitraadi kogusele  $65,2\text{mgN-NO}_3/\text{l}$  saame kontsentratsiooniks  $66,87\text{mgN-NO}_3/\text{l}$ , mis ei ole endiselt piisavalt suur, et põhjendada nitraadi kontsentratsiooni tõusu. Küll aga seletab see esialgset nitriti kontsentratsiooni tõusu (joonis 15), eeldusel et nitraadi redutseerimist läbi denitrifikatsiooni ei toimunud, mis on ka allpool väljatoodud joonist 21 vaadates täitsa võimalik, sest hapniku kontsentratsioonid on kõrged, inhibeerides seeläbi denitrifikatsiooni protsessi [38].



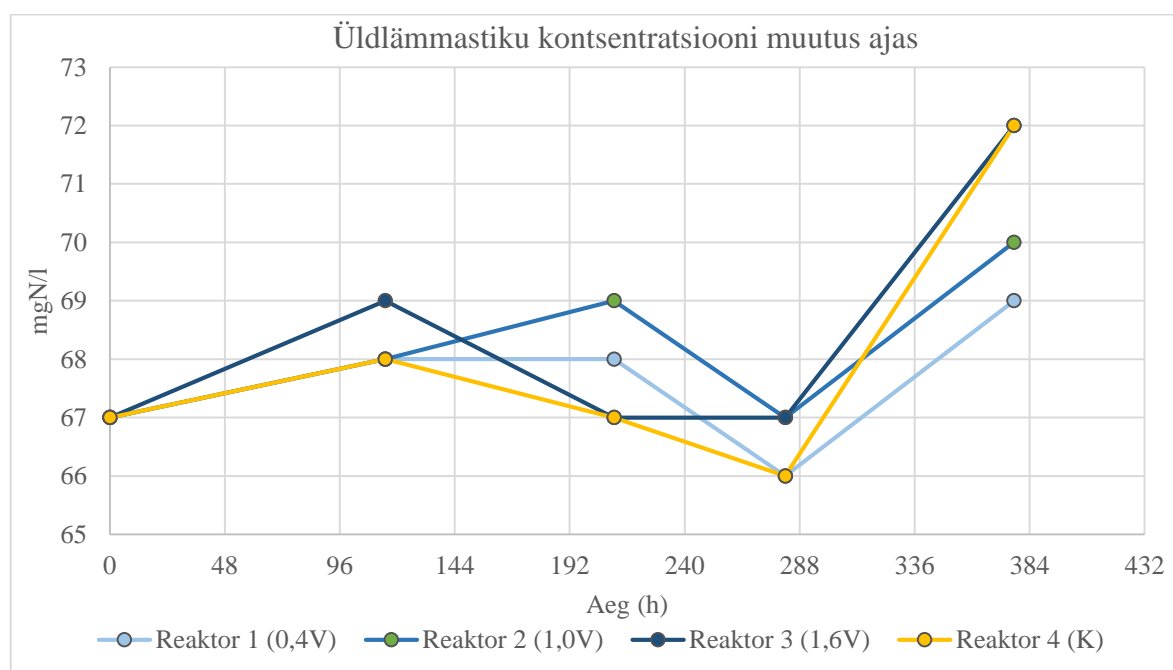
**Joonis 15.** Nitriti kontsentratsiooni muutus ajas

Ajahetkel 115h on kontroll-reaktori puhul märgata oluliselt kõrgemat nitriti kontsentratsiooni võrreldes teiste reaktoritega. Kuna reaktorite (1; 2 ja 4) korral toimus ammooniumi kontsentratsiooni vähenemine praktiliselt samal määral, ajahetkel 115 tund, siis võib oletada, et reaktorite 1 ja 2 korral madalam nitriti kontsentratsioon, võrreldes reaktoriga 4 on põhjustatud denitrifikatsioonist, mille käigus nitrit redutseeriti kas N<sub>2</sub>O-ks või N<sub>2</sub>-ks [37].

Vaadates aga üldlämmastiku kontsentratsiooni muutust ajas (joonis 16), on märgata et antud kontsentratsioonid ajas suurenesid. Kuna täiendavaid lämmastikühendeid ei lisatud ja lämmastiku sidumine läbi mikroorganismide on vähetõenäoline, siis otsustati katse lõpus mõõta kõikides reaktorites olev veekogus, et teha kindlaks kas kontsentratsioonide tõus võib olla põhjendatud aurustunud veehulga kaudu. Reaktorite 1, 3 ja 4 puhul oli lõplik lahuse maht 825ml ning reaktori 2 puhul 810ml. Katse käigus võetud veeproovide tõttu vähenes lahuse kogus 250ml, seega aurumisest põhjustatud veekadu jäi reaktorites 1, 3 ja 4 puhul 125ml (6) ning reaktori 2 puhul 140ml lähedale (7)

$$V_{\text{algus}} 1200\text{ml} - V_{\text{proovid}} 250\text{ml} - V_{\text{lõplik}} 825\text{ml} = 125\text{ml} \quad (6)$$

$$V_{\text{algus}} 1200\text{ml} - V_{\text{proovid}} 250\text{ml} - V_{\text{lõplik}} 810\text{ml} = 140\text{ml} \quad (7)$$



**Joonis 16.** Üldlämmastiku kontsentratsiooni muutus ajas

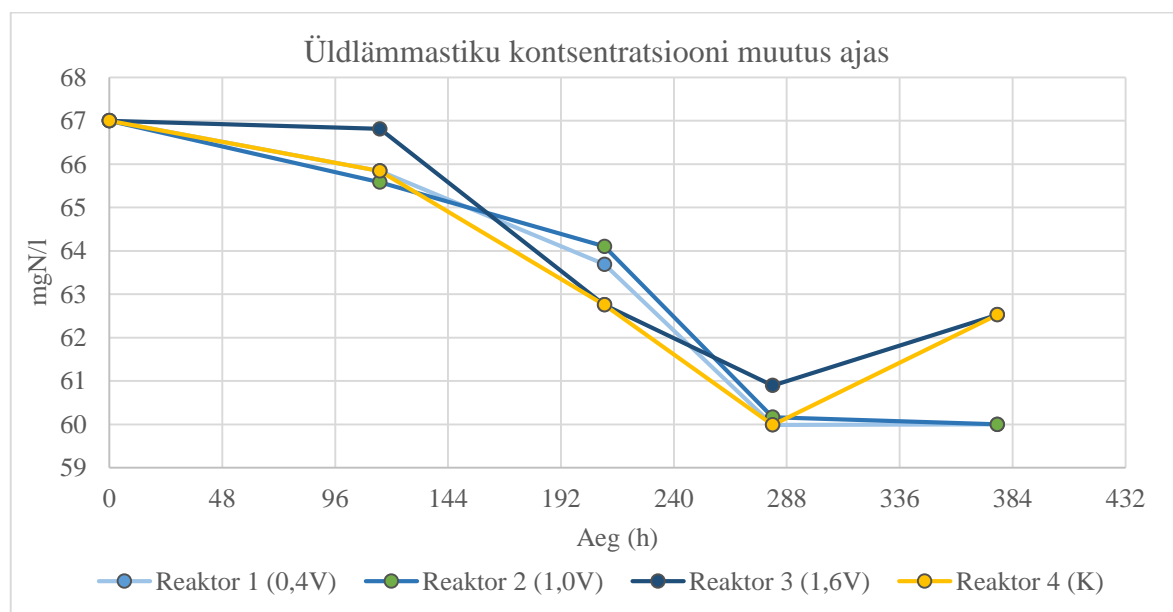
Veekadudest põhjustatud üldlämmastiku kontsentratsiooni tõusu hindamiseks arutati lõplikus vees oleva üldlämmastiku mass (8) ning selle alusel arutati teoreetilise vee ruumala abil uus kontsentratsioon (9). Parandatud TN kontsentratsioon (9) reaktor 1 puhul on loogiline, sest see on madalam esialgsest kontsentratsioonist ja võib väita, et kontsentratsiooni tõus oli põhjustatud lahuse aurustumisest.

$$m_{(TN)} = 69\text{mgN/l} * 0,8251 = 56,925\text{mg} \quad (8)$$

$$C_{(TN-uus)} = 56,925\text{mg} / 0,951 = 59,9\text{mg/l} \approx 60\text{mg/l} \quad (9)$$

Sellest tulenevalt on järgnevate graafikute puhul sisse viidud parandused veekao alusel, eeldades, et aurustumine on ajas konstantne (reaktorite 1, 3 ja 4 korral 0,33ml/h ja reaktori 2 korral 0,37ml/h). Sellest võib olla põhjustatud väike ebatäpsus vahepealsete mõõtmiskordade puhul, kuid lõplikud kontsentratsioonid vastavad sellegi poolest tegelikkusele.

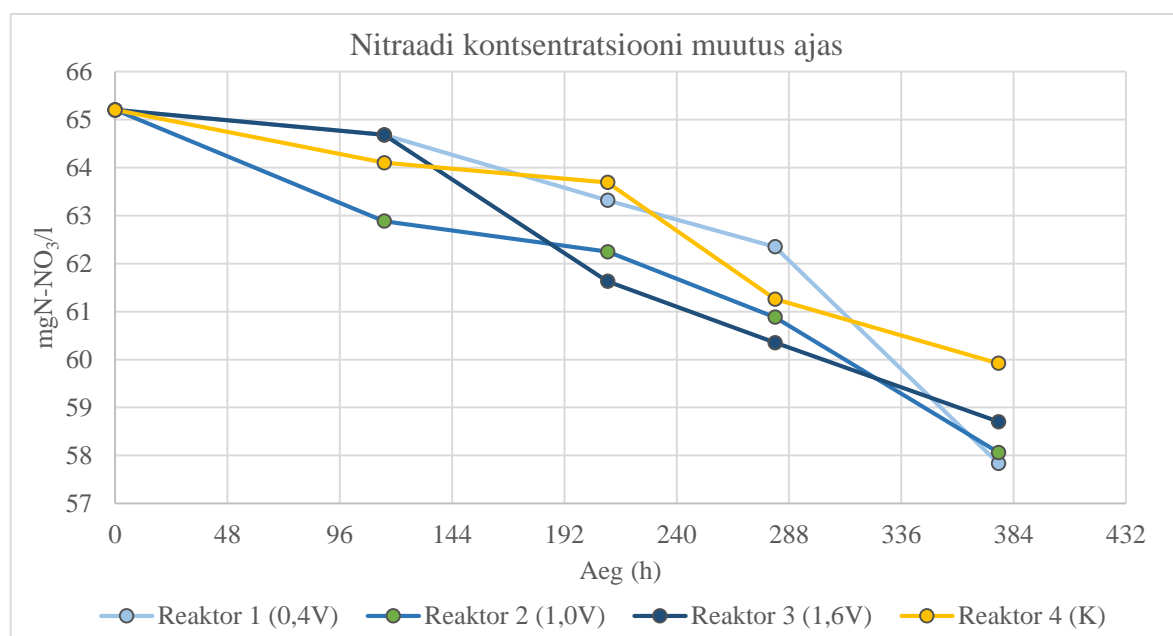
Joonisel 17 on väljatoodud üldlämmastiku kontsentratsioonide muutus ajas, millelt on maha arvatud aurumisest tulenev mõju. Kõige madalam kontsentratsioon saavutati reaktorite 1 ja 2 puhul.



Joonis 17. Üldlämmastiku kontsentratsioonide muutus ajas, millelt on aurumise mõju maha arvatud.

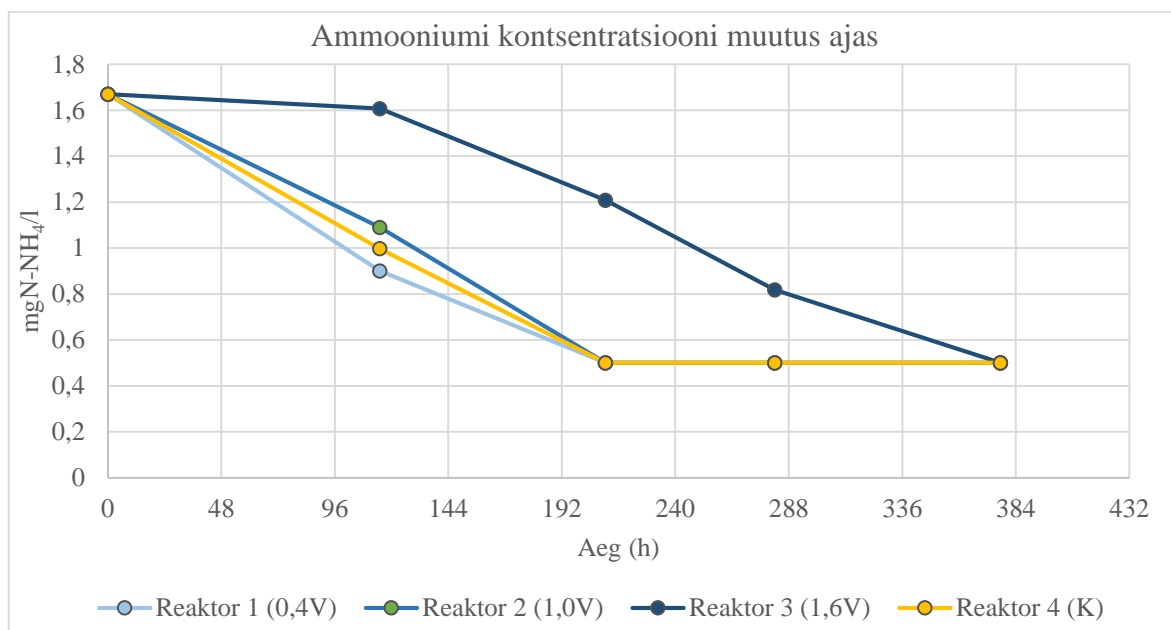
Joonisel 17 on reaktorite 3 ja 4 puhul katse lõpus märgata TN tõusu, mis võib olla põhjustatud analüüsi täpsusest, sest summeerides mõõdetud lämmastikühendite ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$  ja  $\text{NH}_4$ ) kontsentratsioonid, jäävad tulemused  $60 \pm 0,7 \text{ mgN/l}$  juurde.

Peamiseks lämmastiku allikaks reaktorites on nitraat, mis on denitrifikatsiooni lähteaineks. Joonisel 18 on näha, et reaktorite 1 ja 2 korral on saavutatud kõige madalam nitraatide kontsentratsioon vastavalt 57,8 ja 58,1 mgN- $\text{NO}_3/\text{l}$ . Kõige suuremat efektiivsust oleks eeldanud reaktorilt 3, millel on rakendatud kõrgeim elektripinge, et toimuks intensiivsem hüdroolüüs ja seeläbi suureneks katodi elektridoonorluse võime.



**Joonis 18.** Nitraadi kontsentratsiooni muutus ajas, millelt on aurustumisest tulenev mõju maha arvestatud.

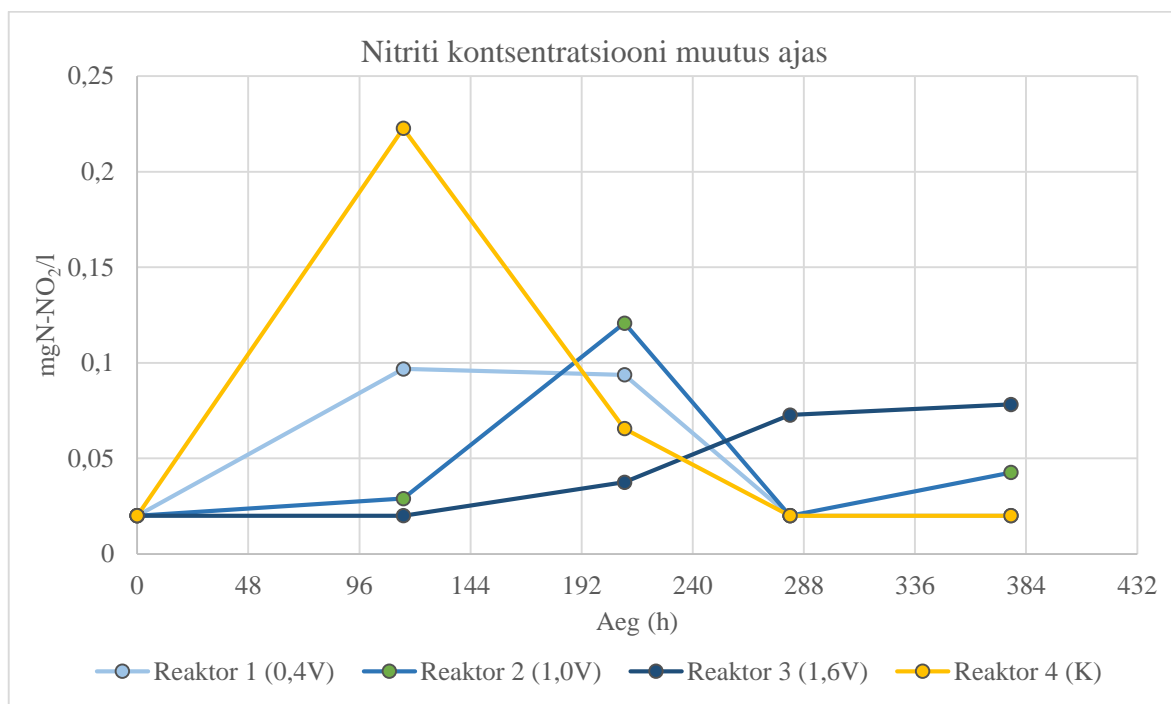
Vaadates joonist 19, on näha ammooniumi kontsentratsiooni muutust ajas, kus sarnaselt joonisele 8 toimub kontsentratsioonide vähenemine ajas. Kõrvutades omavahel nitraadi ja ammooniumi kontsentratsioonide muutused on näha, et ajahetkest 210h 30min, mil ammoonium on nitrifitseerijate poolt ära tarvitatud hakkab nitraadi kontsentratsioon kiiremas tempos langema. Sellest võib järeldada, et denitrifikatsioon toimub, kusjuures kõrgem efektiivsus saavutatakse reaktorites 1, 2 ja 3, mida sooviti ka antud katses näha.



**Joonis 19.** Ammooniumi kontsentratsiooni muutus ajas, millelt on maha arvestatud aurumisest tulenev mõju.

Vaadates nitriti kontsentratsioonide muutust ajas (joonis 20) on reaktori 2 korral lõpus märgata lisaks esimesele lainele, mis on arvatavasti põhjustatud ammooniumi nitrifitseerimisest (ammooniumi vähenemine samal ajavahemikul joonis 19), uut nitriti kontsentratsiooni tõusu. Kuna samal ajavahemikul on kiirenenud ka nitraadi tarbimine (joonis 18) võiks oletada et see võiks olla põhjustatud denitrifikatsiooni esimese etapi poolest, mille käigus nitraat redutseeritakse nitritiks. Nitriti kontsentratsiooni suurenemist elektripingel tõstmisel on täheldatud ka varasemalt tehtud töödes [13].

Reaktori 3 korral on näha (joonis 20) lõpus ühtlast nitriti kontsentratsiooni tõusu, kuna üldlämmastiku kontsentratsioon antud ajahetkel oluliselt ei vähene, siis võib oletada, et denitrifikatsiooni protsessi teine etapp on inhibeeritud ning toimub nitriti akumulatsioon. Esimene etapp denitrifikatsioonist võiks toimida sellegi poolest, sest vaadates joonist 18 on näha nitraadi kontsentratsiooni stabiilset langust.



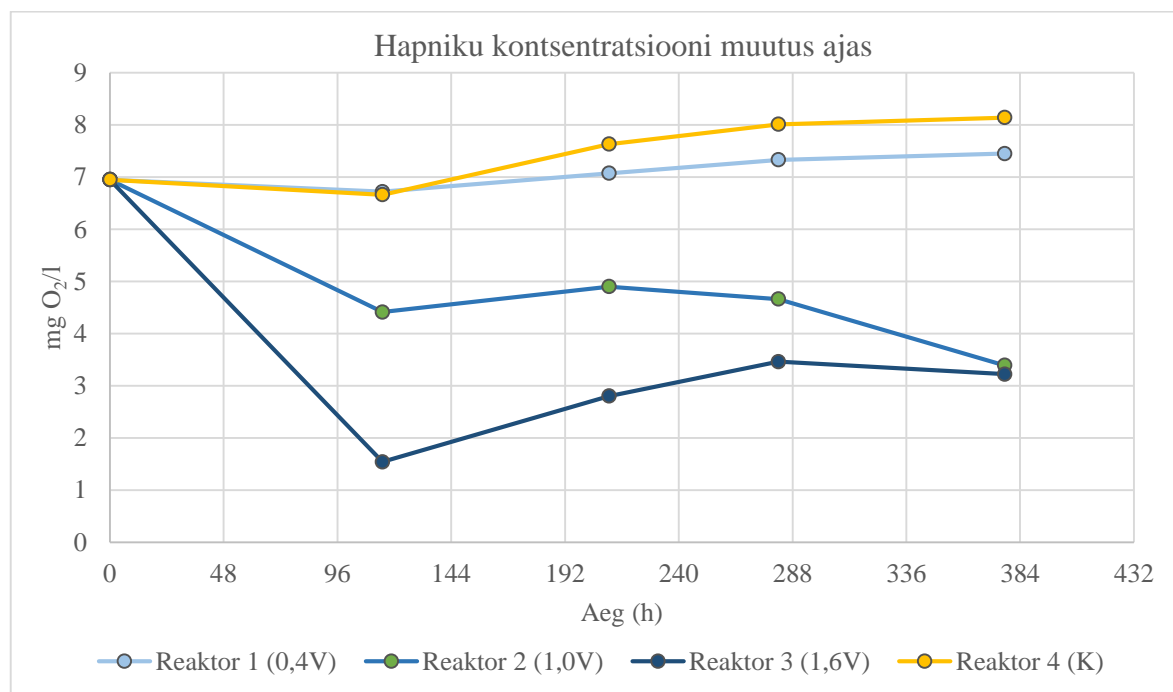
**Joonis 20.** Nitriti kontsentratsioonide muutus ajas, millelt on aurumise mõju maha arvestatud

### 3.2. Hapniku kontsentratsiooni muutus ajas – katse 2

Katse käigus mõõdetud hapniku kontsentratsioonid erinevad oluliselt erinevate pingete korral (joonis 21). Kõige madalam hapniku kontsentratsioon saavutati reaktoris 3 ning sellele järgnesid reaktorid 2, 1 ja 4. Kõrgema pinge korral esinev madalam hapniku kontsentratsioon võib olla põhjustatud katoodil toimuva hapniku redutseerimises. Kui prootonite kontsentratsioon keskkonnas on piisavalt kõrge siis tekib hapniku redutseerimisel vesi või vesinikperoksiid, vastupidises olukorras tekib rohkem aga hüdroksiidione [43]. Hapniku redutseerimine katoodil on hea, sest seeläbi muutub reaktsioonitsenter anaeroobsemaks, mõjutades denitrifikatsiooni protsessi efektiivsust positiivselt.

Katse alguses toimunud järsk hapniku kontsentratsiooni langus võib olla põhjustatud lisaks katoodil redutseerimisele ka orgaanilise süsiniku tarbimisest mikroorganismide poolt, mille käigus tarbitakse orgaanikat ja hapnikku ning vabaneb CO<sub>2</sub> ja H<sub>2</sub>O [38]. Seda toetab ka joonis 23, millelt on näha üldorgaanilise süsiniku kontsentratsiooni langust katse alguses.

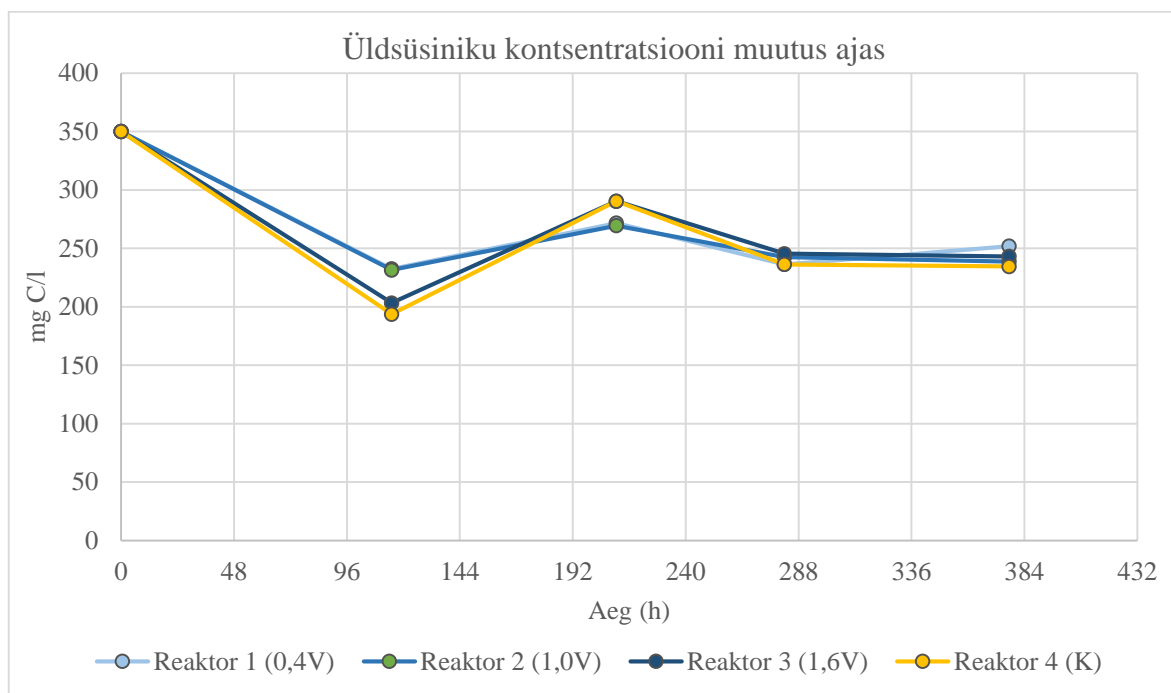
Teine protsess, mis mõjutab hapniku kontsentratsiooni langust võib olla põhjustatud nitrifikatsioonist, mille käigus tarvitatakse ammoniumi oksüdeerimiseks hapniku [38].



**Joonis 21.** Hapniku kontsentratsiooni muutus ajas reaktorite kaupa

### 3.3. Süsiniku kontsentratsioonide muutus ajas – katse 2

Katse käigus mõõdeti jooksvalt üldsüsiniku (joonis 22) ja üldorgaanilise (joonis 23) süsiniku kontsentratsioone. Üldorgaanilise süsiniku kontsentratsiooni muutust kasutati, et anda hinnang kas toimub heterotroofne või autotroofne denitrifikatsioon. Kuna eesmärk oli teha kindlaks kas mikrobioloogilist elektrosünteesirakku on võimalik kasutada autotroofse denitrifikatsiooni protsessi toetamiseks, siis reovette orgaanilist süsinikku ei lisatud. Esialgne kõrge kontsentratsioon on tingitud inokulumi lisamisega kaasa tulnud reoveest. Kõrge üldsüsiniku kontsentratsioon on põhjustatud peamiselt anorgaanilisest süsinikust, mis lisati lahusesse naatriumvesinikkarbonaadi kujul ( $\text{NaHCO}_3$ ), et tagada autotroofsetele denitrifitseerijatele vajalik anorgaanilise süsiniku allikas [13].

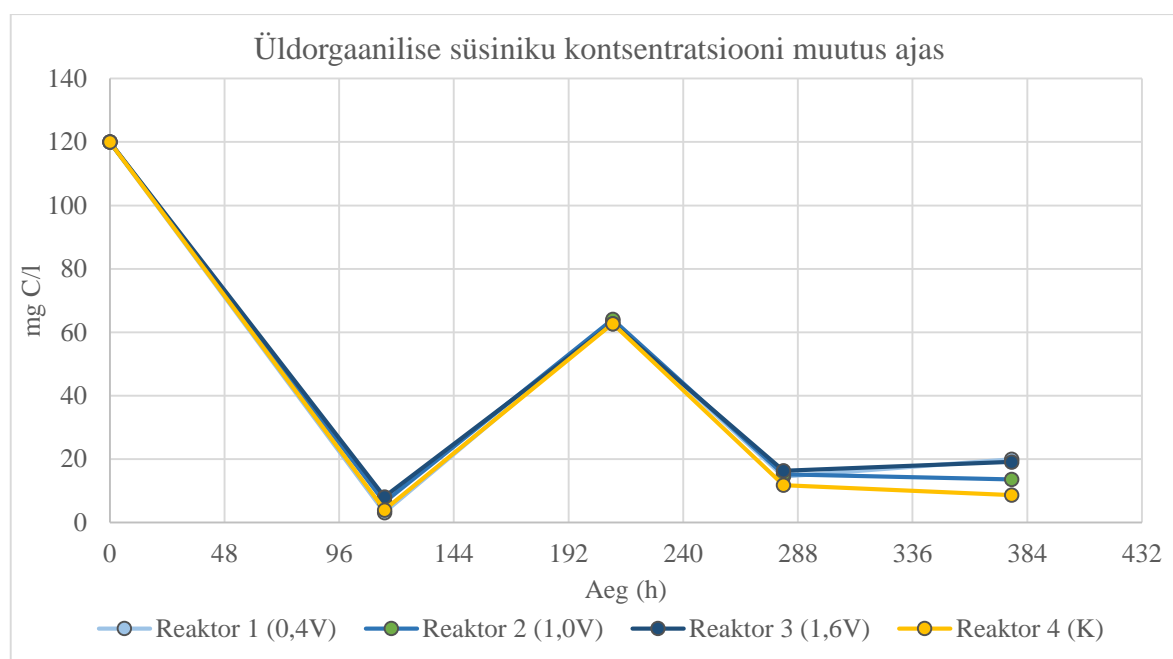


**Joonis 22.** Üldsüsiniku kontsentratsioonide muutus ajas, millelt on aurumise mõju maha arvestatud

Kõikide reaktorite korral toimus süsiniku kontsentratsioonide muutus samas rütmis. Oleks eeldanud üldorgaanilise süsiniku madalamat tarbimist reaktorite 1-3 korral võrreldes reaktor 4-ga, mis oleks viidanud sellele, et mikroorganismid omastavad denitrifikatsiooni protsessi läbiviimiseks vajalike elektrone otse katoodilt. Kuna denitrifikatsiooni efektiivsus oli antud katses väga madal siis ei tulnud välja ka eristumist üldsüsiniku puhul, mille tarbimine oleks võinud katse lõpus suurenedada.

Töö käigus määrati veeproovidest lisaks üldsüsinikule ka üldorgaanilise süsiniku kontsentratsioon. Katse käigus on näha üldorgaanilise süsiniku kontsentratsiooni langust, mis on osaliselt põhjustatud heterotroofsete denitrifitseerijate poolt, kes kasutavad orgaanilist süsinikku denitrifikatsiooni protsessi läbiviimiseks [37]. Ajahetkel 115h esinevad madalad üldsüsiniku ja üldorgaanilise süsiniku kontsentratsioonid (joonised 22 ja 23) on arvatavasti põhjustatud analüüsi ebatäpsusest, sest ajahetkeks 210h on üldsüsiniku kontsentratsioon, koos üldorgaanilise süsiniku kontsentratsiooniga taas tõusnud. Lisaks toimub mõlema näitaja puhul kontsentratsioonide muutus samal määral.

Ajahetkeks 282h on enamus üldorgaanilisest süsinikust tarvitatud ning seetõttu võiks heterotroofse denitrifikatsiooni protsessi osakaal väheneda (kõikide reaktorite  $C_{\text{üldorg}}:N$  suhe on 0,3). Seda on näha ka joonisel 18, kus reaktori 4 korral nitraadi kontsentratsiooni vähenemine aeglustub. Reaktorites, kus kasutati protsessi mõjutamiseks elektrivoolu, sarnast muutust ei täheldatud, mis võib viidata autotroofse denitrifikatsiooni toimumisele, kes kasutavad nitraadi redutseerimiseks orgaanilist süsiniku asemel katoodil tekkivat vesinikku.

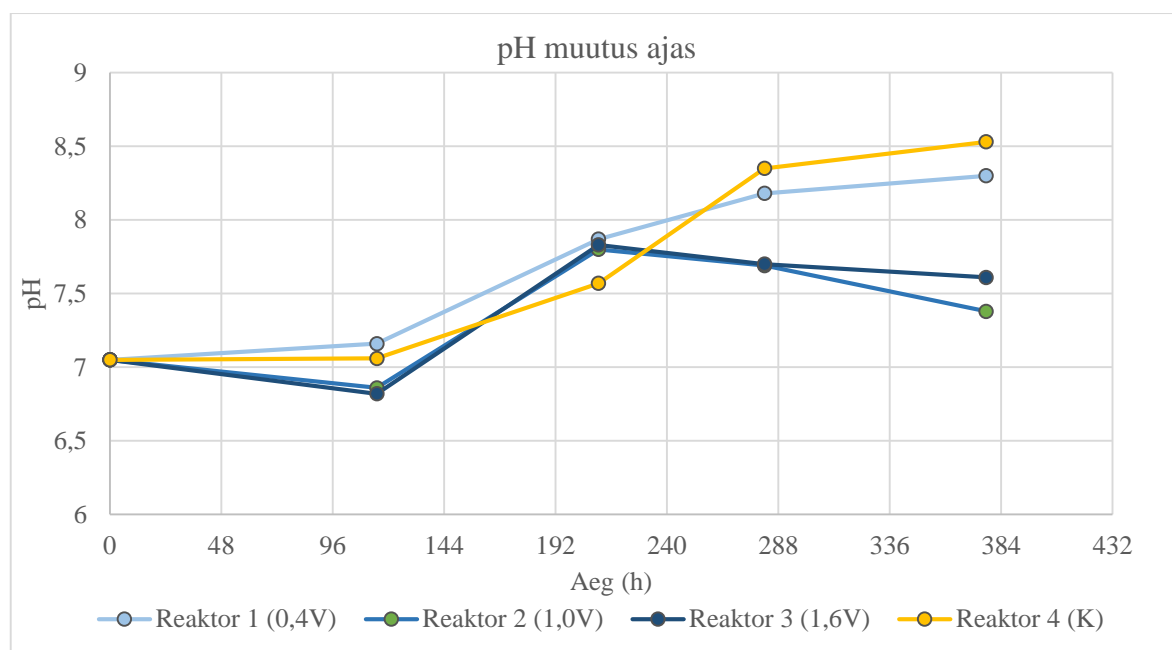


**Joonis 23.** Üldorgaanilise süsiniku kontsentratsioonide muutus ajas, millelt on aurumise mõju maha arvestatud

### 3.3. pH muutus ajas – katse 2

Vaadates joonist 18, kus on näidatud pH muutust ajas on märgata reaktorite 1 ja 4 korral oluliselt kõrgemat pH-d, mis on eeldatavasti põhjustatud denitrifikatsioonist, mille käigus tarvitatakse prootoneid, muutes keskkonda aluselisemaks [37]. Reaktorite 2 ja 3 korral on näha, et pH on madalam, kusjuures keskkonna happelisus on korrellatsioonis reaktorites rakendatava pingega. Selle põhjuseks ei saa olla denitrifikatsioon, sest vaadates joonisel 18 välja toodud nitraatide kontsentratsioonide muutust ajas, on näha, et reaktorites 1 ja 3 oli denitrifikatsiooni määr võrreldes reaktoriga 4 suurem ja seega võiks olla ka pH

kõrgem. Kuna reaktorites 2 ja 3 oli ka madalam hapniku kontsentratsioon (joonis 21), mis võiks olla põhjustatud hapniku redutseerimisest katoodil, siis võiks eeldada et nende puhul on pH veelgi kõrgem, sest hapniku redutseerimise käigus tarvitatakse prootoneid [43]. Seega võib eeldada, et pH langus pinge tõstmisel on peamiselt põhjustatud anoodil tekkivate vesinikioonide tõttu [44].



**Joonis 24.** pH muutus ajas

### 3.4. Järeldused

Teise katse ülesehitus oli võrreldes esimese katsega oluliselt lihtsam, kusjuures esines mitmeid muudatusi, mis mõjutasid protsessi efektiivsust. Üheks suuremaks muutuseks oli protsessi keskkond: võrreldes esimese katsega ei täidetud teises katses reaktorit kergkruusaga. Seeläbi paranes oluliselt ainete difusioon, mis on lisaks keemiliste reaktsioonide kiiremaks toimumiseks ka mikrobioloogiliste protsesside puhul oluline. Lisaks paranes ka elektrijuhtivus, mis esimese katse puhul oli keskmiselt 2,82mS/cm ja teise katse puhul 3,46mS/cm.

Teine oluline muudatus tehti katse opereerimises: kui esimese katse puhul oli tegemist läbivoolse reaktoriga, siis teist katse puhul on tegemist *batch*-reaktoriga. Selle tulemusel on katsereaktorid paremini võrreldavad ning ühtlasi on ka mugavam jälgida erinevate ainete kontsentratsioonide muutuseid.

Kolmas muudatus oli reaktori ruumala, mis esimese katse puhul oli 33,7 liitrit ja teise katse puhul 1,2 liitrit. Sellel on aga omad plussid ja miinused. Väiksema ruumala puhul tulevad ainete kontsentratsioonide muutused kiiremini esile, kuid anoodil tekkiva hapniku mõju on samuti suurem, mistõttu katse 2 puhul oli oluliselt kõrgem keskmine hapniku kontsentratsioon ( $5,76 \pm 4,22 \text{ mgO}_2/\text{l}$ ) võrreldes esimese katsega ( $0,76 \pm 0,45 \text{ mgO}_2/\text{l}$ ). Seetõttu oli ka teises katses anaeroobsete tingimuste tagamine oluliselt raskem ja denitrifikatsiooni protsess inhibeeritud.

Võrreldes esimese katsega oli üheks erinevuseks ka anoodi materjali muutus. Esimese katse puhul kasutati anoodina vasktoru, mis oli katse lõpus kaetud paksu vaskoksiidi kihiga (joonis 25). Teises katses sama olukorra vältimiseks kasutati ka anoodi materjalina süsinik-kiust kangast. Lisaks tehti teise katse korral reaktoris olevad ühendused roostevabaterasest traadi abil, et vältida juhtmete läbioksüdeerumist, mida oli näha esimest katset lahti võttes.



**Joonis 25.** Esimese katse käigus anoodile tekkinud vaskoksiidi kiht.

Kõige enam on mõjutatavad keskkonna-tingimused teise katse korral olid pH ja hapniku kontsentratsioon, mis on lisaks temperatuurile ja opereerimisstrateegiale ühed olulisemad parameetrid mikrobioloogiliste protsesside puhul [38]. Esimese katse puhul ei täheldatud keskkonna parameetrites olulisi erinevusi kummagi parameetri suhtes, kuid erinevusi oli täheldada teise katse puhul.

Kirjanduses on välja toodud, et denitrifikatsiooni jaoks optimaalne pH on vahemikus 6-8 ning kõige suurem efektiivsus tagatakse vahemikus 7-7,5 [5, 38]. Katses 2 täheldati kõrgema pinge korral (reaktorites 2 ja 3) madalamat pH-d (keskmine pH = 7,38) võrreldes reaktoritega 1 ja 4 (keskmine pH = 7,71). Lisaks oli reaktorites 2 ja 3 pH kõikumine ümber keskmise väiksem võrreldes reaktorite 1 ja 4-ga, millel pH tõusis lõpus üle 8,3. Esimese katse puhul pH suhtes erinevate gruppide lõikes ei esinenud.

Kõige enam mõjutas teist katset anoodil tekkiva ja katoodil redutseeritava hapniku vahekord, mille tulemusel ei saavutatud katses 2 ühegi reaktori puhul denitrifikatsiooni efektiivseks läbiviimiseks optimaalset hapniku kontsentratsiooni. Selle väärtus denitrifikatsiooni toimimiseks peab jääma alla 0,3-0,5mgO<sub>2</sub>/l [38]. Katses 2 jäid hapniku kontsentratsioonid vahemikku 1,54-8,14mgO<sub>2</sub>/l, mistõttu denitrifikatsioon oli hapniku tõttu inhibeeritud, kuid paremad tingimused saavutati kõrgemate pingete korral. Esimese katse korral anoodil tekkiv hapnik mõju ei avaldanud ja erinevate pingete lõikes samuti erinevusi ei täheldatud. Esimese katse korral jäi hapniku kontsentratsioon vahemikku 0,32-1,21mgO<sub>2</sub>/l, mistõttu saavutati soodsamad tingimused denitrifikatsiooni protsessi toimimiseks.

Kõrgemate pingete korral saavutati suurem denitrifikatsiooni efektiivsus mõlema katse puhul, mis väljendus esimese katse korral suurenenud nitriti kontsentratsiooni kaudu. Ja lisaks suurenes esimeses katses kõrgemate pingete korral ka N<sub>2</sub>O emissioon, mis viitab denitrifikatsiooni toimumisele. Teise katse puhul olid erinevate pingete korral erinevused suuremad ning oli märgata ka üldlämmastiku kontsentratsiooni suuremat vähenemist reaktorites, kus rakendati elektripinget. Kuna mõlemas katses oli heterotroofne denitrifikatsioon pärsitud madala orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni poolt, siis võib oletada, et kõrgemate pingete korral hakkas toimuma autotroofne denitrifikatsioon, mille käigus mikroorganismid kasutavad orgaanilise süsiniku asemel anorgaanilist süsinikku ja katoodil tekkivat vesinikku.

## KOKKUVÕTE

Inimtegevuse tagajärjel suunatakse üha rohkem lämmastikühendeid keskkonda. Selle tagajärjel suureneb lämmastikühendite kontsentratsioon veekogudes, ning ületades sealne ökosüsteemi isepuhastuvõime, avalduvad probleemid nagu veekogude eutrofeerumine ja joogivee saastumine. Antud töös pöörati suuremat tähelepanu denitrifikatsiooni protsessis esinevatele lämmastikoksiididele, eelkõige nitraadile, mis põhjustab lisaks veekogude kinnikasvamisele ka haiguste teket.

Antud töö laiem eesmärk oli uurida kas mikrobioloogilisi elektrosünteesi reaktoreid on võimalik kasutada nitraatidest tuleneva veereostuse eemaldamiseks ja täpsemalt uuriti kuidas mõjuta MES-reaktoris kasutatav elektripinge denitrifikatsiooni protsessi, mille käigus mikroorganismid redutseerivad nitraadi mitmes järgus molekulaarseks lämmastikuks. Mikrobioloogilise elektrosünteesi reaktori puhul on tegemist süsteemiga, milles rakendatakse elektrivoolu, et luua sobivad tingimused mikrobioloogiliste protsesside läbiviimiseks. MES-reaktoris toodetakse katoodil vesinikku, mis on energiaallikaks autotroofsetele denitrifitseerijatele ja seeläbi on võimalik viia läbi denitrifikatsiooni protsessi, madala orgaanilise süsinikuga keskkonnas.

Tulenevalt töö eesmärgist, viidi läbi kaks katset, esimese puhul valmistati 12 läbivoolset mikrobioloogilist elektrosünteesi reaktorit, milles sooviti puhastada nitraadidega saastunud vett. Reaktorid jagati nelja gruppi, milles rakendati erinev pinged 0,6V; 1,4V; 1,6V ja kontroll, mille puhul elektrivoolu ei rakendatud. Teise katse puhul valmistati 4 identset MES-reaktorit, mis erinesid üksteisest sammuti rakendavate elektripingete poolest 0,4V; 1,0V; 1,6V ja kontroll – ehk elektripinget ei rakendatud.

Kõrgemate pingete korral saavutati suurem denitrifikatsiooni efektiivsus mõlemas katses. Esimese katse puhul oli märgata suuremat naerugaasi emissiooni kõrgemate pingete puhul ning teise katse puhul oli märgata ka üldlämmastiku kontsentratsiooni, sealhulgas nitraatide vähenemist. Kui esimese katse korral ei täheldatud olulisi muutusi keskkonda

iseloomustavate parameetrite suhtes nagu pH ja hapniku kontsentratsioon, siis teise katse puhul oli olukord hoopis teine. Madalamate pingete korral ja reaktoris kus elektrivoolu ei rakendatud, tõusis hapniku kontsentratsioon oluliselt kõrgemaks, võrreldes reaktorites milles oli kõrgem pinge. Sellegi poolest ei suudetud teise katse puhul saavutada piisavalt madalat hapniku kontsentratsiooni, mistõttu oli denitrifikatsiooni protsess inhibeeritud. Teise katse puhul oli märgata ka kõrgemate pingete korral madalat pH-d, kusjuures kõrgem pinge hoidis pH stabiilsemana.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et mikrobioloogilist elektrosünteesi reaktorit on võimalik kasutada denitrifikatsiooni protsessi mõjutamiseks, kusjuures rakendatava pinge muutus mõjutab protsessi kulgu erinevalt. Sellele vaatamata jäid antud töö raames tehtud katsetes puhastusefektiivsused väga madalaks, mistõttu on kõrgema efektiivsuse saavutamiseks vaja läbi viia täiendavaid uuringuid ning eksperimente, et teha kindlaks, kas antud tehnoloogia võiks olla arvestatavaks alternatiiviks praegustele reoveepuhastuse praktikatele.

## **TÄNUAVALDUS**

Sooviksin tänada enda juhendajaid Ülo Manderit ja Kuno Kasakut huvitava lõputöö teema ja juhendamise eest. Lisaks tänan Alar Teemuskit, kes analüüsis gaasiproove ning Mae Urit ja Kristel Krooni, kes teostasid keemia analüüsid. Suur aitäh ka Päärn Paistele, kes tegi elektroodidest SEM pildid ning Mart Muhelile, kes oli katsete ülesseadmisel abiks.

## KASUTATUD KIRJANDUS

1. Y. Xiao, Y. Zheng, S. Wu, Z.-H. Yang, ja F. Zhao, Bacterial Community Structure of Autotrophic Denitrification Biocathode by 454 Pyrosequencing of the 16S rRNA Gene. *Microb. Ecol.* 69 (2014) 492.
2. J. A. Camargo ja Á. Alonso, Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Int.* 32 (2006) 831.
3. Riigi Teataja, Joogivee kvaliteedi- ja kontrollinõuded ning analüüsimeetodid. <https://www.riigiteataja.ee/akt/111012013002> viimati alla laetud 26.11.2016.
4. U. Skiba *et al.*, Biosphere–atmosphere exchange of reactive nitrogen and greenhouse gases at the NitroEurope core flux measurement sites: Measurement strategy and first data sets. *Agric. Ecosyst. Environ.* 133 (2009) 139.
5. A. Rezaee, M. Safari, ja H. Hossini, Bioelectrochemical denitrification using carbon felt/multiwall carbon nanotube. *Environ. Technol.* 36 (2015) 1057.
6. N. Pous, S. Puig, M. Dolores Balaguer, ja J. Colprim, Cathode potential and anode electron donor evaluation for a suitable treatment of nitrate-contaminated groundwater in bioelectrochemical systems. *Chem. Eng. J.* 263 (2015) 151.
7. B. Thamdrup, New Pathways and Processes in the Global Nitrogen Cycle. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43 (2012) 407.
8. H. Lu, K. Chandran, ja D. Stensel, Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Res.* 64 (2014) 237.
9. Web Of Science.  
[www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com) viimati alla laetud 02.05.2017.
10. M. Zhou, H. Wang, D. J. Hassett, ja T. Gu, Recent advances in microbial fuel cells (MFCs) and microbial electrolysis cells (MECs) for wastewater treatment, bioenergy and bioproducts. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88 (2013) 508.
11. K. Rabaey ja R. A. Rozendal, Microbial electrosynthesis — revisiting the electrical route for microbial production. *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 706.

12. V. S. Bagotsky, *Fundamentals of Electrochemistry*, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, 2006, p. 1-181.
13. S. Kondaveeti ja B. Min, Nitrate reduction with biotic and abiotic cathodes at various cell voltages in bioelectrochemical denitrification system. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36 (2013) 231.
14. B. E. Logan ja J. M. Regan, *Microbial Fuel Cells—Challenges and Applications*. *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5172.
15. V. K. Nguyen, S. Hong, Y. Park, K. Jo, ja T. Lee, Autotrophic denitrification performance and bacterial community at biocathodes of bioelectrochemical systems with either abiotic or biotic anodes. *J. Biosci. Bioeng.* 119 (2015) 180.
16. Y. Jiang, M. Su, ja D. Li, Removal of Sulfide and Production of Methane from Carbon Dioxide in Microbial Fuel Cells-Microbial Electrolysis Cell (MFCs-MEC) Coupled System. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (2014) 2720.
17. W. Li, S. Zhang, G. Chen, ja Y. Hua, Simultaneous electricity generation and pollutant removal in microbial fuel cell with denitrifying biocathode over nitrite. *Appl. Energy.* 126 (2014) 136.
18. N. Afsham, R. Roshandel, S. Yaghmaei, V. Vajihinejad, ja M. Sherafatmand, Bioelectricity Generation in a Soil Microbial Fuel Cell with Biocathode Denitrification. *Environ. Eff.* 37 (2015) 2092.
19. A. Sotres, M. Cerrillo, M. Viñas, ja A. Bonmatí, Nitrogen removal in a two-chambered microbial fuel cell: Establishment of a nitrifying–denitrifying microbial community on an intermittent aerated cathode. *Chem. Eng. J.* 284 (2016) 905.
20. B. H. Kim, I. S. Chang, G. C. Gil, H. S. Park, ja H. J. Kim, Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell. *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 541.
21. M. Safari, A. Rezaee, B. Ayati, ja A. Jonidi-Jafari, Bio-electrochemical reduction of nitrate utilizing MWCNT supported on carbon base electrodes: A comparison study. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 45 (2014) 2212.
22. I. Kłodowska, J. Rodziewicz, ja W. Janczukowicz, Effect of technological and environmental parameters on electrolytically aided denitrification using the anaerobic rotating multi-disc reactor. *Ecol. Eng.* 85 (2015) 223.

23. T. Van Doan, T. K. Lee, S. K. Shukla, J. M. Tiedje, ja J. Park, Increased nitrous oxide accumulation by bioelectrochemical denitrification under autotrophic conditions: Kinetics and expression of denitrification pathway genes. *Water Res.* 47 (2013) 7087.
24. F. Yan ja D. Reible, Electro-bioremediation of contaminated sediment by electrode enhanced capping. *J. Environ. Manage.* 155 (2015) 154.
25. B. H. Kim, S. S. Lim, W. R. W. Daud, G. M. Gadd, ja I. S. Chang, The biocathode of microbial electrochemical systems and microbially-influenced corrosion. *Bioresour. Technol.* 190 (2015) 395.
26. M. Rosenbaum, F. Aulenta, M. Villano, ja L. T. Angenent, Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 324.
27. K. B. Gregory, D. R. Bond, ja D. R. Lovley, Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* 6 (2004) 596.
28. H. Liu, Q. Yan, ja W. Shen, Biohydrogen facilitated denitrification at biocathode in bioelectrochemical system (BES). *Bioresour. Technol.* 171 (2014) 187.
29. P. Li, W. Xing, J. Zuo, L. Tang, Y. Wang, ja J. Lin, Hydrogenotrophic denitrification for tertiary nitrogen removal from municipal wastewater using membrane diffusion packed-bed bioreactor. *Bioresour. Technol.* 144 (2013) 452.
30. D. H. Park, M. Laivenieks, M. V. Guettler, M. K. Jain, ja J. G. Zeikus, Microbial Utilization of Electrically Reduced Neutral Red as the Sole Electron Donor for Growth and Metabolite Production. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 2912.
31. T. Reda, C. M. Plugge, N. J. Abram, ja J. Hirst, Reversible interconversion of carbon dioxide and formate by an electroactive enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 10654.
32. H. Bothe, S. J. Ferguson, W. E. Newton (Eds.), *Biology of the Nitrogen Cycle*, Elsevier, Amsterdam, 2007, p. 1-106.
33. S. J. Ferguson, Denitrification and its control. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 66 (1994) 89.
34. KEGG PATHWAY. Nitrogen metabolism - *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?pae00910+PA0296](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?pae00910+PA0296) viimati alla laetud 27.11.2016.
35. C. M. Jones ja S. Hallin, Ecological and evolutionary factors underlying global and local assembly of denitrifier communities. *ISME J.* 4 (2010) 633.

36. M. S. Samad *et al.*, Phylogenetic and functional potential links pH and N<sub>2</sub>O emissions in pasture soils. *Sci. Rep.* 6 (2016) 35990.
37. J. P. Zehr ja R. M. Kudela, Nitrogen Cycle of the Open Ocean: From Genes to Ecosystems. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 3 (2011) 197.
38. T. Saeed ja G. Sun, A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. *J. Environ. Manage.* 112 (2012) 429.
39. G. Urbini, R. Gavasci, ja P. Viotti, Oxygen Control and Improved Denitrification Efficiency by Means of a Post-Anoxic Reactor. *Sustainability*, 7 (2015) 1201.
40. M. A. Gómez, E. Hontoria, ja J. González-López, Effect of dissolved oxygen concentration on nitrate removal from groundwater using a denitrifying submerged filter. *J. Hazard. Mater.* 90 (2002) 267.
41. W. M. Haynes, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, Vol. 93, CRC Press, 2012, ptk. 5 p. 1-205.
42. S. Teiter ja Ü. Mander, Emission of N<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, and CO<sub>2</sub> from constructed wetlands for wastewater treatment and from riparian buffer zones. *Ecol. Eng.* 25 (2005) 528.
43. Z. Wang, H. Deng, L. Chen, Y. Xiao, ja F. Zhao, In situ measurements of dissolved oxygen, pH and redox potential of biocathode microenvironments using microelectrodes. *Bioresour. Technol.* 132 (2013) 387.
44. Z. Shen, X. Chen, J. Jia, L. Qu, ja W. Wang, Comparison of electrokinetic soil remediation methods using one fixed anode and approaching anodes. *Environ. Pollut.* 150 (2007) 193.

# **ELECTRIC CURRENT EFFECT ON DENITRIFICATION PROCESS IN MICROBIAL ELECTROSYNTHESIS CELL**

Rauno Lust

## Summary

Because of human activity, even more nitrogen compounds are directed to environment. That causes higher nitrogen concentrations in waterbodies and by exceeding these ecosystems self-cleaning capacity, environmental problems such as eutrophication and groundwater pollution will occur. Current thesis primarily concentrates on nitrogen compounds that take part in denitrification process, mostly nitrate, that can cause health problems such as blue baby syndrome.

Thesis wider objective was to investigate if microbial electrosynthesis can be used to treat water that is polluted by nitrates. Closer attention was given to how different electric currents effect denitrification process, during which nitrates are reduced to nitrogen. Microbial electrosynthesis cell (MEC) is a system where electric current is used to achieve optimal conditions to carry on different microbial processes. On cathode hydrogen is produced, which is energy source for autotrophic bacteria and because of that denitrification can be conducted in absence of organic carbon.

During the work, two different experiments were made. For the first test 12 continuous flow MECs were constructed to treat nitrate polluted water. Reactors were divided into four groups and each group were manipulated by different electrical current 0,6V; 1,4V; 1,6V and control, where no current were applied. For the second test 4 batch type MECs were constructed, each reactor differed from another by applied current 0,4V; 1,0V; 1,6V and control, where no current were applied.

In both experiments, reactors with higher current achieved higher nitrogen removal efficiency. On first test, higher N<sub>2</sub>O emissions were detected and during the second test lower

total nitrogen and nitrate concentrations were achieved in reactors where higher current was applied. During first test no significant variations in environmental parameters like pH or oxygen concentration in four different groups were detected. But during the second test those parameters differed from each other vastly. In microbial electrosynthesis cells where electrical current was lower the oxygen concentrations were higher. MECs with higher current manipulation achieved lower oxygen concentrations but the oxygen concentrations were still too high and because of that the denitrification process was heavily inhibited. In MECs where higher current was applied the pH was also kept lower and more stable around the optimal range.

Based on the results it can be said that microbial electrosynthesis can be used to enhance denitrification process and different electrical currents can be used to manipulate the process. But during this work the pollutant removal efficiency stayed very low and to raise the technology's efficiency more research have to be made, to make sure if this technology can be a viable alternative for existing water treatment practices.

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

Mina, Rauno Lust

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

„ELEKTRIPINGE MÕJU DENITRIFIKATSIOONI PROTSESSILE MIKRO-BIOLOOGILISES ELEKTROSÜNTEESIRAKUS“,

mille juhendajad on prof. Ülo Mander ja PhD. Kuno Kasak,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace´i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
  3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **29.05.2017**