

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

Keemia instituut

Kolloid- ja keskkonnakeemia õppetool

Hegne Lilleoja

Tõhustatud fosforiärastuse inhibitsiooni tuvastamine aktiivmudaprotsessis

Bakalaureusetöö keskkonnatehnoloogias (12 EAP)

Juhendaja MSc Kati Klein

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja:

Allkiri, kuupäev

TARTU 2020

Infoleht

Antud töö eesmärgiks oli välja töötada meetodika Tartu Ülikooli kolloid- ja keskkonnakeemia laboris, millega on võimalik hinnata potentsiaalset inhibitsiooni tõhustatud fosforiärastuse protsessile. Inhibitsioon võib tekkida kui reovesi sisaldab kõrges koguses toksilisi aineid, näiteks fenoolseid ühendeid, mis võivad tekkida rasketööstuses. Toksilisi ühendeid sisaldav reovesi võib pärssida reoveepuhasti bioloogilist fosforiärastusprotsessi, mis on tavapäraselt esimene bioloogiline protsess aktiivmudapuhastis ning seetõttu sissevoolus olevate saasteainete osas haavatavam. Kui aktiivmudaprotsessid on inhibeeritud, võib tõusta heitvees fosfori kontsentratsioon, mis võib puhastile kaasa tuua kõrged trahvimäärad ning põhjustada veekogude kinnikasvamist ehk eutrofeerumist. Meetodika testimisel valiti inhibiitoriks 3,5-diklorofenool, mida on mudelainena kasutatud ka teiste standartiseeritud meetodikate valideerimisel. Tõhustatud fosforiärastuse test viiakse läbi annuskatsena, kus hinnatakse inhibiitori mõju tõhustatud fosforiärastuse protsessidele. Tulemuste põhjal võib öelda, et käesolevas bakalaureusetöös välja töötatud tõhustatud fosforiärastuse inhibitsiooni määramise meetodika on rakendatav ning selle valideerimisparameetrid on kooskõlas teistes sarnastes meetodikates toodud vastavate väärtustega.

Võtmesõnad: aktiivmuda, inhibitsioon, tõhustatud fosforiärastus, tööstusreovesi

CERCS: T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

Abstract

The aim of the thesis was to develop a method for the evaluation of enhanced biological phosphorus removal process (EBPR) inhibition that could be used by the colloid and environmental chemistry laboratory of the University of Tartu. Inhibition of the process can occur when the wastewater contains high levels of toxic substances, such as phenolic compounds emitted by heavy industry. As EBPR is the first biological step in many wastewater treatment plants, the toxic components can severely limit or even stop the process. Resulting high phosphorus concentrations in the effluent may lead to high fines for the treatment plant and cause eutrophication in the receiving waterbodies. 3,5-dichlorophenol was chosen as the inhibitor for the testing of the developed method, as the substrate has been used in the testing of other similar standardized methods. The EBPR inhibition tests were carried out as a series of batch tests with tests vessels containing varying inhibitor concentrations. The results of the

newly developed method show the applicability of the EBPR inhibition test and the reliability parameters are in line with values from similar standardized methods.

Keywords: activated sludge, inhibition, enhanced biological phosphorus removal, industrial wastewater

CERCS: T270 Environmental technology, pollution control

Sisukord

Infoleht	2
Abstract	2
Sisukord.....	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1 Reovee päritolu ja koostis.....	6
1.2 Reoveepuhastus	7
1.3 Fosforiärastus bioloogiliste ja keemiliste meetoditega.....	8
1.3.1 Keemiline fosforiärastus	8
1.3.2 Tõhustatud fosforiärastus	9
1.4 Bioloogilist fosforiärastust inhibeerivad ühendid.....	11
1.4.1 Raskmetallid.....	11
1.4.2 Ravimijäägid	12
1.4.3 Fenoolid.....	12
1.5 Reovee toksilisuse hindamine	13
2. Materjalid ja meetoodika	15
2.1 Katse ettevalmistamine.....	15
2.2 Katse käik	16
2.3 Kasutatud valemid ja arvutused.....	17
3. Tulemused ja arutelu.....	19
3.1 Tõhustatud fosforiärastuse meetoodika väljatöötamine	19
3.2 Meetoodika usaldusväarsuse kontrollimine	24
4. Kokkuvõte.....	27
Summary	28
Kasutatud kirjandus.....	30
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	35

Sissejuhatus

Reovesi on olmes ja tööstuses tekkinud vesi, mis sisaldab kõrgeid reoainete kontsentratsioone. Põhilised reoained reovees on süsiniku-, lämmastiku- ja fosforiühendid. Lisaks võib reovesi sisaldada raskmetalle, mikroplaste ja orgaanilisi makro- ja mikrosaatseaineid. Efektiivne reovee puhastamine on oluline tagamaks madal reoainete koormus suublale, sest nii lämmastiku- ja fosforiühendid põhjustavad veekogudes eutrofeerumist. Enamikes olmereoveepuhastites toimub lämmastiku- ja fosforiärastus bioloogiliste protsesside kaudu, mis võivad olla tugevalt mõjutatud erinevate toksiliste ainete sisaldusest reovees.

Tavapärases olmereovees ei ole enamasti kõrge inhibeeriva toimega aineid ning põhilised inhibiitorid pärinevad olmereoveepuhastisse juhitud tööstuslikust reoveest. Inhibiitorite kontsentratsioonid tööstuslikus reovees võivad ajaliselt varieeruda suurel määral ning olla tugevalt seotud ka tööstusprotsesside efektiivsusega.

Bioloogiline fosforiärastus (Bio-P) on sageli aktiivmudapuhastusprotsessi esimene etapp ning seega on esimesena mõjutatud ka toksiliste ainete sisaldusest. Sellises olukorras võib puhastusprotsessis tekkida inhibitsioon ehk protsessi efektiivsus on osaliselt või täielikult toksiliste ainete poolt pärsitud. Pikaajaline inhibitsioon võib pöördumatult mõjutada ka mikroobikooslust ning hävitada protsessi läbiviivad bakterid. Inhibitsiooni tuvastamiseks ja mõõtmiseks on olemas rahvusvahelised standardid mitmete teiste reoveepuhastusprotsessidele, näiteks saasteaine mõju määramine aktiivmuda hapnikutarbele (ISO 8192) ja nitrifikatsioonile (ISO 9509), kuid tunnustatud meetodikaid fosforiärastusprotsessi jaoks ei ole. Bio-P protsessi on uuritud palju, kuid reeglina põhineb see pikaajalisel aktiivmuda aklimatiseerimisel laboritingimustega, sealhulgas sünteetilise reoveega.

Bakalaureusetöö eesmärgid on järgnevad:

- Leida meetodika läbiviimiseks olulisemad tingimused ning anda ülevaade testi läbiviimise olulistest meetodilistest aspektidest;
- Hinnata meetodi usaldusväärsust ning võrrelda parameetreid teiste olemasolevate inhibitsiooni määramise meetodikatega (ISO 8192, ISO 9509, denitrifikatsiooni test [1]).

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Reovee päritolu ja koostis

Reoveeks nimetatakse veehulka, mis jõuab elamutest, avalikest ruumidest ja tööstustest kanalisatsiooni kaudu reoveepuhastitesse. Reovesi sisaldab erinevaid tahkeid jäätmeid ja võõriseid (fekaalid, toidujäätmed, tänavasodi) ning lahustunud aineid nagu fosfor, lämmastik ja orgaaniline aine [2]. Üldiselt saab reovett jagada olmereoveeks ja tööstusreoveeks, mis erinevad omavahel suuresti nii koostise kui mahu poolest. Olme- ja tööstusreovee põhilised eripärad on toodud Tabel 1.

Tabel 1. Olme- ja tööstuslike reovee võrdlus [2]

Olmereovesi	Tööstusreovesi
Sarnane ka erinevates piirkondades	Tööstuse-spetsiifiline
Saasteainete sisaldus madalam	Saasteainetega kontsentreeritud
Muutused etteaimatavad	Muutused sageli ootamatud
Ei sisalda olulisel määral ohtlikke ühendeid	Ohtlike ainete sisaldus võib olla kõrge
Puhastamine odav	Puhastamine ressursimahukas
Reoveepuhastile ohutu	Potentsiaalne oht reoveepuhastile

Olmereoveeks nimetatakse kodumajapidamistes tekkinud reovett, mis asustatud kohtades kogutakse kokku tsentraalse kanalisatsiooniga ning juhitakse reoveepuhastitesse [3]. Hajaasustatud kohtades on majapidamistel tihti eraldiseisvad puhastussüsteemid (septikud, pinnaspuhastid jne), milles enamasti keerulisemat bioloogilist puhastust ei rakendata. Olmereovesi on koostise poolest ühtlane ning piirkondlikud erinevused on üldiselt väga väikesed. Peamised reoained olmereovees on orgaaniline süsinik ning erinevad lämmastiku- ja fosforiühendid, kuid olmereovesi võib sisaldada väikeses koguses ka muid ühendeid, näiteks orgaanilisi mikroasaasteaineid, mikroplaste ja raskmetalle [2]. Toksiliste ühendite sisaldus on olmereovees madal ning ei tekita bioloogilistes protsessides inhibitsiooni [1].

Tööstusreovesi on tööstusprotsesside käigus tekkinud reovesi, mis vastavalt tööstusprotsessi spetsiifikale sisaldab erinevaid keemilisi ühendeid. Raskematest tööstusharudest pärinev reovesi võib sisaldada näiteks kõrget fenoolide kontsentratsiooni, mis võib kahjustada olmereoveepuhastite tavapärasest protsessi [2]. Olulisemateks ohtliku tööstusliku reovee

allikateks Eestis on põlevkivitööstused, puidutööstused ja metallitööstused. Kuna tööstusreovee omadused võivad kõikuda, olla ebasoodsa toitainete vahekorraga ning sisaldada potentsiaalseid inhibiitoreid, rakendatakse neile tihti enne olmereoveepuhastisse juhtimist spetsiifilist eelpuhastust [4]. Sellega saab vähendada puhasti koormust ja tagada heitvee ohutum väljalase keskkonda. Tööstusreoveest on võimalik toota ka biogaasi (Estonian Cell) [5].

1.2 Reoveepuhastus

Reovett puhastatakse läbi mitmete füüsikaliste, keemiliste ja bioloogiliste protsesside, mis toimuvad etapiviisiliselt reoveepuhastites. Tavapärase puhastusprotsessi koosneb mehaanilisest puhastusest (eemaldatakse tahke prügi ja liiv), keemilis-bioloogilisest puhastusest (ärastatakse orgaaniline süsinik, lämmastiku- ja fosforiühendid) ja järelpuhastusest (järelsetitus ja tertsiaalne puhastus). Pärast puhastusprotsessi suunatakse puhastatud reovesi ehk heitvesi loodusesse [2].

Mehaaniline puhastus enamikes reoveepuhastites koosneb võre abil tahkete jäätmete eraldamisest ning liivapüümisest, mille käigus setitatakse tahked mineraalosakesed. Suuremates puhastites kasutatakse järgmise etapina eelsetitamist, kus eraldatakse orgaaniline heljum [6]. Eelsetitit kasutatakse peamiselt metaankääritiga puhastites, sest eelsetitiga eraldatud toormuda on kõrge orgaanilise aine sisaldusega ning metaanitootlikusega [2].

Mehaanilisele puhastusele või eelsetitusele järgneb keemilis-bioloogiline puhastus, kus peamiste reoainete eraldus käib mikroorganismide elutegevuse ja keemilise sadestamise teel. Lämmastikuühendite ärastuseks kasutatakse peamiselt mitmeastmelist bioloogilist puhastust, fosforiühendite ärastuseks saab kasutada nii bioloogilise kui keemilisi meetodeid. Bioloogilise puhastuse käigus tekkinud bakterimass ehk aktiivmuda eraldatakse veest järelsetituse käigus. Järelsetitis toimub gravitatsioonilise setitamise käigus nii baktermassi kui sadestatud fosforiühendite eraldus, pinnale jääv puhastatud reovesi juhatakse vastavalt vajadusel kas läbi lisapuhastuse (membraanid ja filtrid) või otse puhasti väljavoolu [6].

Bioloogilist puhastust viib läbi aktiivmuda – heljuv suspensioon erinevatest bakteritest ja mikroorganismidest. Aktiivmudapuhastus toimub vastavalt spetsiifilisele protsessile nii aeroobses (nitrifikatsioon), anaeroobses (bio-P) ja anoksilises (denitrifikatsioon) keskkonnas [2,7]. Aktiivmudas leidub väga palju erinevaid baktereid: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Paracoccus* [8]. Aktiivmuda kasutamine on laialt levinud

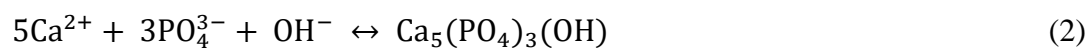
protsess, sest selle meetodiga on nii lämmastiku- kui fosforiärastuse efektiivsus kõrge ning hoolduskulud väikesed [2]. Samas nõuavad bioloogilised protsessid täpsemat opereerimist ning on rohkem mõjutatavad erinevate toksiliste ühendite, temperatuuri, pH ja teiste tingimuste poolt.

1.3 Fosforiärastus bioloogiliste ja keemiliste meetoditega

Fosfor on oluline keemiline element ja elutähtis toitaineline enamike elusorganismide jaoks, suuremad fosforikogused veefaasis põhjustavad aga ulatuslikku keskkonnakahju (eutrofikatsioon) [9-10]. Reovees esineb fosfor peamiselt ortofosfaatide, polüfosfaatide ning orgaaniliste fosfaatidena, mis reoveepuhastusprotsessi käigus seotakse reoveesetesse [11]. Kõrge fosforisisaldus muudab reoveesette potentsiaalseks väetiseks, kuid erinevad toksilised ühendid nii olme- kui tööstusreovees muudavad töödeldud reoveesette otsekasutuse põllumajanduses ohtlikuks [12].

1.3.1 Keemiline fosforiärastus

Fosfori keemiline eemaldamine reoveest toimub koagulatsiooni teel. Koagulantidena kasutatakse põhiliselt alumiinium- ja rauasooli või kaltsiumhüdraate [13-15].



Koagulatsioon saavutatakse kahes faasis [13-15]:

- Efektiivsel segamisel toimub keemiline reaktsioon, mille käigus toimub koagulandi ja fosforiühendi omavaheline kinnitumine. Intensiivsel segamisel tagatakse koagulandi ühtlane jaotus terves veefaasis, mis tagab efektiivsema reaktsiooni reoainega. Esimene faas kestab kuni kaks minutit.
- Aeglasema segamisega või ilma segamiseta teises faasis toimub osakeste üksteise külge kinni kleepumine ehk flokulatsioon. Selle tulemusel muutuvad osakesed raskemaks, vajuvad põhja ja eemaldatakse süsteemist. Teine faas on oluliselt pikem, kestes keskmiselt 30 minutit.

Koagulatsiooni, flokulatsiooni ja settimise läbimisel ei ole vesi veel täielikult puhas. Osakesed, mis välja ei settinud ja jäid vette hõljuma, saab vajadusel eemaldada järelfiltratsiooniga, mille käigus enne puhastist väljumist läbib heitvesi poorse filtri, mis püüab kinni heljumi ja väiksemad fosfaat- ja lämmastikühendid [13-15].

Fosfori keemiline sadestamine reoveest on levinud protsess, mida on võrreldes bioloogilise fosforiärastusega oluliselt lihtsam opereerida. Levinud on ka bioloogilise ja keemilise fosforiärastuse kombineerimine. Kuna bioloogiline fosforiärastus kasutab orgaanilist süsinikku, sobib keemiline fosforiärastus ka reoveele, kus orgaanilise süsiniku sisaldus on madal [16].

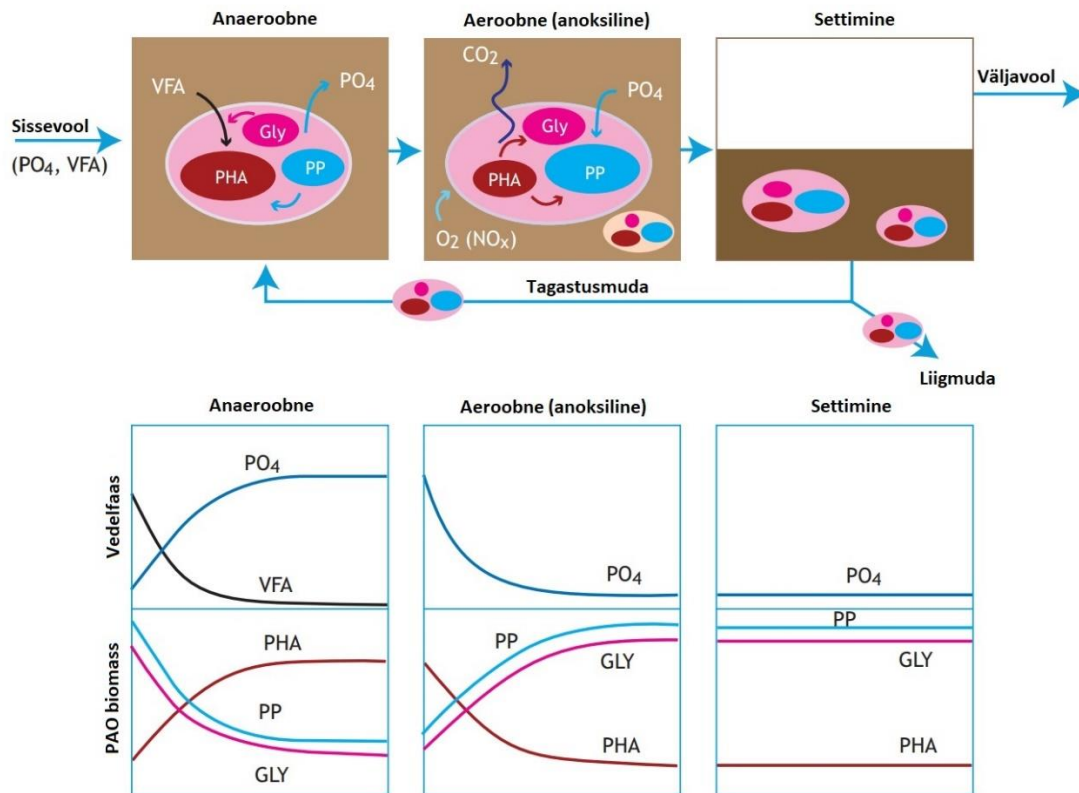
1.3.2 Tõhustatud fosforiärastus

Bioloogiline fosforiärastus toimub väiksemal määral ka tavapärastes tingimustes bakterite elutegevuse käigus, hinnanguliselt tarbitakse orgaanilist süsinikku, lämmastikku ja fosforit suhetes 100:5:1. Kasutusel on tõhustatud fosforiärastuse protsess (bio-P), mille käigus on võimalik saavutada ärastussuhe 100:5:3 [17]. Vajadusel on võimalik rakendada ka eelmises peatükis kirjeldatud keemilist sadestamist, eriti olukorras, kus bioloogiliselt ei suudeta fosfori piirnorme heitvees täita [18].

Bio-P-d viivad läbi polüfosfaate akumulereivad organismid ehk PAO-d. PAO-d suudavad aeroobsete ja aneroobsete tingimuste vaheldumisel siduda bakteriraku sisse aina suuremas koguses polüfosfaate, mille tulemusena on võimalik saavutada tavapärasest kõrgem fosforiärastuse efektiivsus. Teatud aja tagant sadestunud PAO-d eemaldatakse veekeskkonnast või saadetakse uuele ringile, et vähendada rakku talletatud polüfosfaatide tagasileostumist vesikeskkonda [2,19,20]. Üks levinud polüfosfaati akumulereivates bakterirühmadest on *Candidatus Accumulibacter* [21]. Tõhustatud fosforiärastus toimub täissegunenud mahutis, et tagada aktiivmuda hõljuv olek.

Tõhustatud fosforiärastuse üldine skeem on toodud Joonisel 1. Anaeroobsetes tingimustes kasutavat PAO-d vesifaasist süsinikuallikaid (lenduroid rasvhappeid), et toota polühüdrosüülalkanoaate (PHA). PHA-de talletamiseks vajalik energia saadakse rakusiseste polüfosfaatide lagundamisel, mille tulemusena vabanevad vesikeskkonda ortofosfaadid [19]. Keskkonnatingimuste muutumisel aeroobseks või anoksiliseks hakkavad PAO-d läbi viima vastupidist protsessi – varasemalt talletatud PHA-sid kasutatakse energiaallikana, et siduda

vesikeskkonnast ortofosfaate rakusisesteks polüfosfaatideks. PHA-de lagundamise käigus toodetakse ka glükogeeni [20]. Tsükli võib korrata mitu korda ning Bio-P efektiivsus tuleneb asjaolust, et iga uue aeroobse tsükliga seotakse bakterirakku suuremas koguses polüfosfaati, kui anaeroobse tsükliga lagundatakse.



Joonis 1. Tõhustatud fosforiärastuse skeem anaeroobses ja aeroobses keskkonnas, kus joonisel kasutatud lühendid tähistavad: VFA - lenduvad rasvhapped, PHA - polühüdrosüalkanoaadid, PP – polüfosfaat ja GLY - glükogeen [2].

Tõhustatud fosforiärastuse süsteemis on ka kitsaskohti. Tugevad vihmajad, toitainete vähesus või nitraatühendite sisaldus anaeroobses keskkonnas omavad protsessile negatiivset mõju ning võivad puhastusprotsessi pärssida. Tõhustatud fosforiärastuse protsessi efektiivsust võivad vähendada ka glükogeeni akumulatsioonid organismid ehk GAO-d, kes kasutavad ära lenduvad rasvhapped süsinikuallikana ilma fosfaati sidumata. Sellisel juhul ei jää PAO-dele piisavalt energiaallikat, et protsessi läbi viia [19]. GAO-sid on leitud paljudes täismahulistes Bio-P süsteemides ning kuna nad suurendavad lenduvate rasvhapete nõudlust, vähendades seega tõhustatud fosforiärastuse efektiivsust. Ka antud töös on arvestatud GAO-de negatiivse efektiga ning püütud leida PAO-dele õiged kohastumistingimused [20].

1.4 Bioloogilist fosforiärastust inhibeerivad ühendid

Nii tõhustatud fosforiärastusele kui teistele bioloogilistele reoveepuhastusprotsessidele on kõige ohtlikumad erinevad raskmetallid, ravimijäägid ja fenoolid, peamiselt vastavate ainete kõrge püsivuse, toksilisuse ja bioakumuleerivate omaduste poolest. Lisaks võib tõhustatud fosforiärastust olla inhibeeritud protsessitingimustest, näiteks lahustunud hapniku sisaldusest, temperatuurist ja pHst [20,22].

1.4.1 Raskmetallid

Raskmetallid on metallid, mille tihedus on 5 g/cm^3 ning mis on elusorganismidele toksilised, sest need akumuleeruvad organismis. Sellised metallid on näiteks Cr, Cu, Cd, Zn, Ni, As ja Pb [23]. Raskmetallid satuvad reovette väikses koguses nii kodumajapidamistest kui suuremas koguses erinevate tööstuste kaudu (maavarade rikastusvabrikutest ning keemia-, elektroonika- ja metallitööstustest) [24]. Näiteks galvaniseerimine tekitab märkimisväärselt palju metalliühendeid reovees (kaadmium, tsink, kroom, nikkel, vanaadium, plii, vask, plaatina, hõbe, titaan). Samuti on vask ja tsink väga laialdaselt kasutusel igapäevaelus, nii torude, katuste kui elektroonikakomponentidena. Raskmetalli jäätmeid tekib ka puidutehastes, anorgaanilise pigmendi tootmisel ning nafta rafineerimisel [23].

Raskmetallid on organismis bioakumuleeruvad ning võivad pikema tarbimise korral põhjustada tõsiseid haiguseid ja tervisekahjustusi: arengupeatust, vähki, siseorganite ja närvisüsteemi kahjustumist. Elavhõbeda ja pliiürgituse korral võib organismis tekkida autoimmuunne reaktsioon, mille tagajärjel hakkab organismi immuunsüsteem hävitama enda rakke [23].

Aktiivmuda jaoks võib järsk raskmetallide sisalduse suurenemine reovees tuua kaasa olulisi muutusi mikrobioloogilises koosluses, mille tagajärjel võivad bakteristruktuurid (flokid) laguneda ning aktiivmuda üldine aktiivsus oluliselt langeda [25]. Lisaks on kõrge raskmetallide kontsentratsiooni juures aeglustatud või isegi täielikult peatatud mikroorganismide paljunemine [26]. Raskmetallid mõjutavad erinevaid bioloogilisi funktsioone ning võivad orgaanilistes molekulides asendada teisi vajalikke metalle (näiteks kaadmium kinnitub biomolekulis tsingi kohale). Kõige suurema toksilisusega raskmetallid aktiivmudale on kaadmium, plii ja elavhõbe [26].

1.4.2 Ravimijäägid

Ravimid on mõeldud erinevate haiguste raviks nii inimestel kui loomadel ning seetõttu disainitud mõjutama bioloogilisi organisme. Ravimijäägid satuvad reovette nii väljeheidete kui ebakorrekse käitlemise tõttu ning neid ei ole võimalik täielikult eemaldada. Ravimijääkide inhibeeriv toime sõltub nende füüsikalise-keemilistest parameetritest, bioakumulatsioonist ning toksilisusest [22]. Antibiootikumijäägid ning teised antibakteriaalsed ained on mõeldud bakterite hävitamiseks ning seetõttu on nende toksilisus aktiivmudale väga kõrge. Tugev efekt juba väikestes kontsentratsioonides on ka erinevatel põletikuvastastel ravimitel (diklofenak, paratsetamool) ja hormoonravimitel. Ravimijääkide sattumisel loodusesse on kõige suuremaks ohuks aga antibiootikumiresistentsuse teke, mis toob kaasa olulisi mõjusid inimeste tervisele [27].

1.4.3 Fenoolid

Fenoolid on ohtlikud aromaatsed süsivesinike hüdroksüühendid, mis satuvad reovette erinevatest tööstustest (keemia- ja ravimitööstustest, paberi- ja tselluloositehastest ning põlevkivi, nafta- ja kivisöetööstustest) [28]. Eestis on põhiliseks murekohaks fenoolidega Ida-Virumaa, kus asuvate põlevkivitööstuste tõttu on fenoolühendite tase nii reovees kui looduses oluliselt kõrgem võrreldes ülejäänud Eesti piirkondadega. Fenoolid satuvad veekogudesse põlevkiviõlitehaste territooriumidelt, kaevandustest ning poolkoksi- ja aherainemägedest [29]. Fenoolide mürgisus inimorganismile on 10-24 mg/l, kaladele 9-25 mg/l [28]. Kuna tegu on mürgise ainega, mis on väga ohtlik vee-elustikule, on sellele seatud erinevad piirnormid. Põhjavees, mida kasutatakse joogiveena, ei tohi erialuseliste fenoolide piirnorm ületada 1 µg/l. Fenoolide poolestusaeg võib põhjavees ulatuda 12 kuni 168 tunnini [29]. Fenoolid on väga kõrge inhibeeriva toimega ka kõigile bioloogilistele reoveepuhastusprotsessidele [4], mõjutades nii bakterite metabolismi [30], bakterimembraanide tugevust kui ka erinevate biomolekulide funktsioone [26]. Lisaks võivad erinevad fenoolsed ühendid sattudes reoveepuhastuse bioloogilistesse protsessidesse mõjutada aktiivmuda flokulatsiooni ning vähendada sellega olulist muda settimiskiirust [31].

1.5 Reovee toksilisuse hindamine

Toksilised ühendid võivad tekitada erinevates bioloogilistes protsessides inhibitsiooni, kuna nad häirivad bakterite tavapärase metabolismi kulgemist. Selle tulemusena ei saa bakter oma elutegevuseks toota enam vajalikul määral energiat ning võib hukkuda. Väiksemate toksilise ühendi kontsentratsioonidega võib bakterikooslus pikema aja jooksul kohaneda (olmereovee lisandid), kuid tööstusreoveega kaasnevate piik-kontsentratsioonidega võib kaasneda protsesside osaline või täielik inhibitsioon.

Reovee või selles sisalduvate ühendite mõju erinevatele bioloogilistele protsessidele on võimalik hinnata mitmete meetoditega:

- ToxTrak – võimaldab hinnata joogivee, reovee ja loodusliku vee toksilisust. Põhineb bakterite hingamist takistavate inhibiitorite mõju hindamisel resasuriini abil. Resasuriin on aktiivne värvaine rakkude metabolismis, mis reageerib bakterite hingamisele. Kui hingamine väheneb, muutub redutseerimisel resasuriin resorufiiniks ning värvus muutub sinisest roosaks. Selle meetodiga on võimalik teha kolori- ja fluorimeetrilisi mõõtmisi [32-33].
- Raman-FISH – võimaldab mikrospektroskoopiliselt hinnata fosforit ärastavate organismide (PAO) rakusisese polüfosfaadi, rasvhapete ja glükogeeni sisaldust [34].

Olemas on Rahvusvahelise Standardiorganisatsiooni (ISO) poolt välja antud standardiseeritud testid, mida kasutatakse reovee toksilisuse mõju määramiseks erinevatele puhastusprotsessidele:

- Hapnikutarbe inhibeerimise test (ISO 8192) – määratakse potentsiaalse saasteaine või reovee mõju aktiivmuda hapnikutarbele. Meetod toimub aeroobsetes tingimustes ning igas katsepudelis määratakse pidevalt hapniku kontsentratsioon. Inhibitsiooni tekkimisel aktiivmuda hapnikutarve väheneb [35].
- Nitrifikatsiooni infibeerimise test (ISO 9509) – hinnatakse toksikandi mõju nitrifikatsiooni protsessile. Katse kestab tavaliselt kolm tundi ning selle aja sees mõõdetakse, kui kiiresti muutub ammoonium nitraadiks ja tulemuste põhjal saab järeldada saasteaine mõju [36].
- Biolagundatavuse määramise test (ISO 9888) – hinnatakse orgaanilise aine lagundatavust bioloogiliste protsesside poolt. Testis määratakse keemilist hapnikutarvet

(KHT) või lahustunud orgaanilist süsinikku, mille tulemusena saab kirjeldada reovee või toksilise aine biolagundatavust [37].

2. Materjalid ja metoodika

Katsed viidi läbi Tartu Ülikooli Chemicumi kolloid- ja keskkonnakeemia laborites ajavahemikus 20.06.2019-02.12.2019. Katsete tegemiseks kasutati 100 000 inimekvivalendi suurusest olmereoveepuhastist toodud aktiivmuda ning reovett, mis olid maksimaalselt laboris seisnud ühe päeva. Mudelainena kasutati 3,5- diklorofenooli. Katseid tehti nii sünteetilise kui ka reoveepuhasti sissevoolust võetud reoveega. Sünteetiline reovesi on koostiselt olmereoveega väga sarnane ning seda kasutatakse süsinikuallikana mitmetes laboratoorses katsetes, kaasa arvatud inhibitsioonide uurimisel.

Tulemusi töödeldi MS Excelis.

2.1 Katse ettevalmistamine

Igas katses kasutati seitset 1000 ml katsepudelit, kuhu lisati samas koguses aktiivmuda, reovett, kraanivett, happeliste/aluseliste mikroelementide ja naatriumatsetaati lahuseid ning vastavalt konkreetsele pudelile 0-10 mg/l 3,5-diklorofenooli. Kahte katsepudelis ei lisatud mudelainet, et jälgida katse toimimist ilma toksikandita ja nii veenduda katse töötamises.

Proovipudelitesse (V = 1L) lisatud ainete loetelu:

- 1 ml fosfaatpuhver
- 1 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 1 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 1 ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- 2 ml aluselised mikroelemendid
- 2 ml happelised mikroelemendid
- 100 ml CH_3COONa (naatriumatsetaat)
- 7 ml 40g/l K_2HPO_4 lahust (2g/50 l-s) (dikaaliumvesinikfosfaat)
- 550 ml reovett
- Erinevas koguses 3,5-diklorofenooli
- 300 ml aktiivmuda (lisati viimasena, vahetult enne deaeratsiooni käivitamist ja enne nullproovi võtmist)

Aktiivmuda hoiti enne katse algust aeroobses keskkonnas selleks, et tagada aktiivmuda töö katses. Reovett hoiti külmikus 4°C juures, et säilitada vees olevad ühendid, mis võivad kõrgema temperatuuri juures ära laguneda. Kuna katsed teostati toatemperatuuril, seisis reovesi enne katse algust samuti toasoojas, et vältida aktiivmudale temperatuurišoki tekkimist. Enne katsesse lisamist loputati aktiivmuda kraaniveega, et eraldada aktiivmuda sellega kaasa tulnud reoveest. Kuna anaeroobse etapi käiku mõjutavad ka nitrit- ja nitraatioon, aitab aktiivmuda läbi pesemine vältida nende kandumist katsesse. Katse kestuseks oli 7 tundi, katse algas ühe tunnise deaereerimisega puhta lämmastikuga (N₂), et tagada anaeroobses etapis lahustunud hapniku puudumine, pärast mida viidi läbi kuus tundi aereerimist. Igast proovist määrati fosfori kontsentratsioon.

2.2 Katse käik

Katse alguses võeti kõikidest proovipudelidest nullproov, mida tsentrifuugiti viis minutit 4750 rpm-ga. Aktiivmuda ja vesi eraldati üksteisest koheselt pärast tsentrifuugimist, et vältida fosfaatide leostumist tahkest faasist vedelfaasi. Aktiivmuda kuivatati kuivatusahjus 105 °C juures enne analüüside teostamist. Kokku võeti proovid katse alguses, deaereerimisfaasis 30. ja 60. minutil ning järgnevalt katse jooksul 90. minutil, 150. minutil, 240. minutil ja 360. minutil. Kokku võeti igast proovipudelist 7 proovi.

Katse ajal jälgiti ka hapniku ja pH kontsentratsioone. Kui pH tõusis üle 8, lisati proovipudelitesse paar tilka 4 M vesinikkloriidhapet, et kõrge pH väärtus ei mõjutaks katse toimimist. Katsepudelites tagati pidevalt läbisegunenud olek kasutades magnetsegajaid, millega välditi aktiivmuda suspensiooni kontsentratsiooni (MLSS) ebahütlast jaotust. MLSS-i mõõdeti katse lõpus ning katsete keskmine MLSS oli 4 ± 0.8 g/l.

Nii veest kui aktiivmudast määrati fosfori kontsentratsiooni spektrofotomeetriliselt. Kõik kasutatud meetodikad on toodud Tabel 2.

Tabel 2 - Kasutatud analüüsimetodikad

Parameeter	Meetod	Metoodika kirjeldus
PO ₄ ⁻³ (veest)	Kolorimeetriline	Spektrofotomeeter: Hach Lange DR 2800
Üldfosfor (tahketest proovidest)	määramine molübdaadi ja askorbiinhappega	Spektrofotomeeter: Hach Lange DR 2800

MLSS	Gravimeetriline määramine 105 °C	Kaal: Scaltech SBC 31; kuivatuskapp: SNOL 67/350
pH	Potentsiomeetriline määramine	pH-meeter: Evikon 6115
O ₂	Elektrokeemilise anduriga määramine	Hapnikuanalüsaator: Marvet Junior 2000

2.3 Kasutatud valemid ja arvutused

Laboratoorsete katsete käigus saadud tulemuste analüüsimiseks kasutati alljärgnevaid arvutuskeeme ja valemeid:

- MLSSi arvutamiseks kasutati valemit 4, kus MLSS - muda kuivaine sisaldus (g/l); m - kuivanud muda kaal (g) ja V - proovi ruumala (ml).

$$MLSS = \frac{m \times 1000}{V} \quad (4)$$

- Absoluutne standardhälve arvutati valemi 5 järgi, kus s - absoluutne standardhälve (mg/l), x_i - i-nda mõõtmise tulemus (mg/l), \bar{x} - mõõtmistulemuste aritmeetiline keskmine (mg/l) ja n - mõõtmiste arv.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (5)$$

- Suhtelise kogutud standardhälve valem on toodud valemis 6, kus u - suhteline kogutud standardhälve (%), s - absoluutne standardhälve (mg/l) ja \bar{x} - mõõtmistulemuste aritmeetiline keskmine (mg/l).

$$u = \frac{s}{\bar{x}} \quad (6)$$

- Standardmääramatus katteteguriga kaks (e laiendmääramatus) arvutati valemi 7 alusel, kus U - standardmääramatus katteteguriga 2 (mg/l) ja s - absoluutne standardhälve (mg/l).

$$U = 2 \times s \quad (7)$$

- Fosfaadi inhibitsiooni sidumise ja vabastamise kiirust arvutati valemi 8,9 ja 10 alusel, kus R_P - fosfaadi vabastamise/sidumise kiirus ($\text{mgP} \times \text{gMLSS}^{-1} \times \text{h}^{-1}$), $R_{P,0}$ - fosfaadi vabastamise/sidumise kiirus nullproovis ($\text{mgP} \times \text{gMLSS}^{-1} \times \text{h}^{-1}$), $R_{P,x}$ - fosfaadi vabastamise/sidumise kiirus inhibiitoriga proovipudelis katsepudelis ($\text{mgP} \times \text{gMLSS}^{-1} \times \text{h}^{-1}$), $C_{alg,P}$ - fosfaadi kontsentratsioon katse alguses (mg/l), $C_{lõpp,P}$ - fosfaadi kontsentratsioon proovivõtuhetkel (mg/l), $MLSS$ - aktiivmuda suspensiooni kontsentratsioon (g/l), Δt - protsessi kestus proovivõtuhetkel (h), I_P - fosforiärastuse inhibitsioon (%)

$$R_P = \frac{(C_{alg,P} - C_{lõpp,P})}{MLSS} \times \Delta t \quad (\text{fosfaadi sidumise kiirus}) \quad (8)$$

$$R_P = \frac{(C_{lõpp,P} - C_{alg,P})}{MLSS} \times \Delta t \quad (\text{fosfaadi vabanemise kiirus}) \quad (9)$$

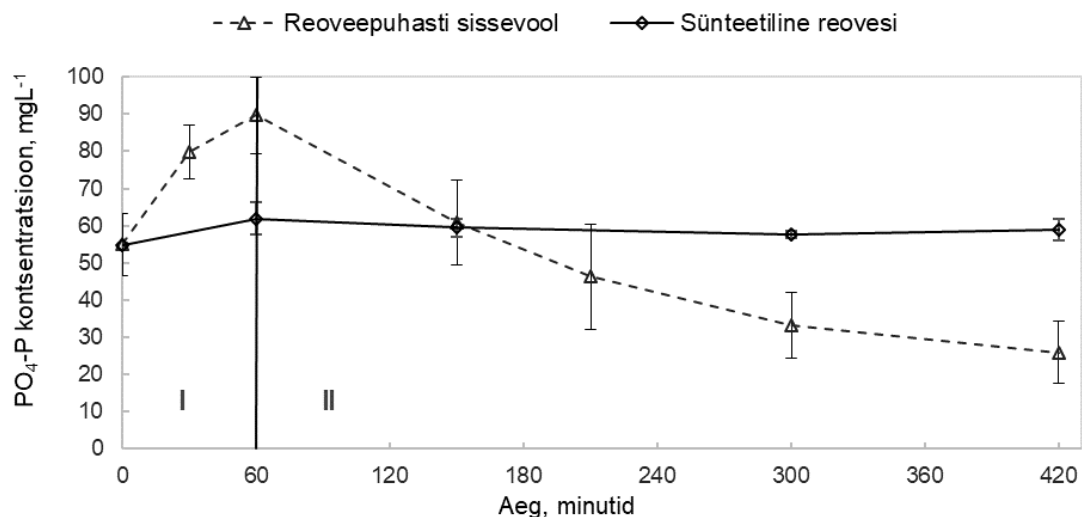
$$I_P = \frac{(R_{P,0} - R_{P,x})}{R_{P,0}} \times 100\% \quad (10)$$

3. Tulemused ja arutelu

3.1 Tõhustatud fosforiärastuse meetodika väljatöötamine

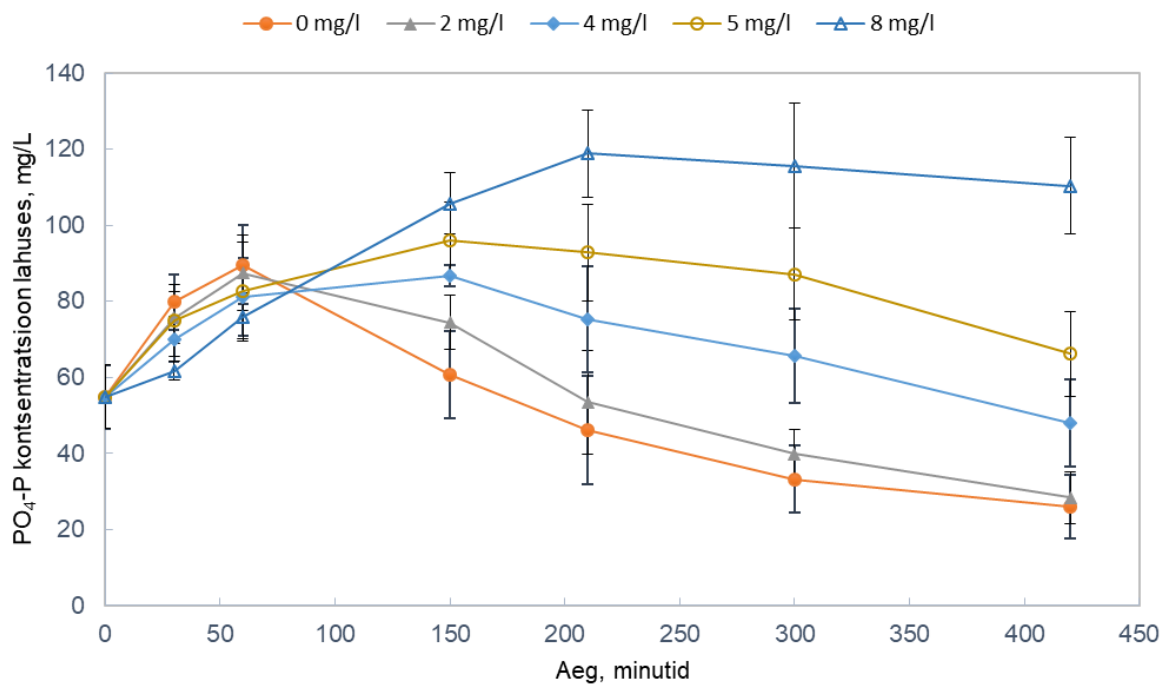
Mitmetes standardiseeritud testides kasutatakse tavapäraselt olmereovee asemel sünteetilist reovett. Kuna reovesi on kiiresti riknev, on sünteetilise reovee kasutamine lihtsam, sest seda on võimalik OECD retsepti järgi laboris valmistada. Olmereovett tuleb kohale transportida olmereoveepuhastist ning kasutada paari päeva jooksul, seega oleks ka tõhustatud fosforiärastuse inhibitsiooni meetodika puhul lihtsam kasutada sünteetilist reovett.

Laboratoorse katsete esimeses järgus hinnati sünteetilise reovee ja olmereovee erinevust katses kasutamisel (Joonis 2). Esimesed laboratoorsed katsed teostati sünteetilise reoveega, mille puhul ei esinenud ei ortofosfaatide sisalduse suurenemist anaeroobses ega sidumist aeroobses faasis. Olmereoveega tehtud katses olid mõlemad muutused olemas. Sellest võib järeldada, et sünteiline reovesi ei olnud sobilik antud meetodika jaoks. Põhjuseks võib olla sünteetilise reovee süsinikuallikas, sest varasemad uuringud on näidanud, et erinevad süsinikuallikad sobivad erinevate PAO kultuuridele [38]. Katses kasutatud bakterimass ei olnud kohanenud sünteetilise reovee ning selle süsinikuallikatega. Baktermassi kohanemine reoveega võib aega võtta mitu kuud ning antud katsetes ei rakendatud bakterimassi adapteerimist sünteetilisele reoveele [39]. Seetõttu jätkati katseid olmereoveepuhastist toodud reoveega.



Joonis 2. Anaeroobse ortofosfaatide vabastamise (I) ja aeroobse ülesidumise (II) kõverad, kui süsinikuallikana kasutati sünteetilist- ja olmereovett, n=3 (sünteiline reovesi), n=7 (olmereovesi)

Bio-P inhibitsiooni määramiseks võrreldakse ortofosfaatide vabanemist ja sidumist anaeroobses ja aeroobses faasis tühiproovi ja inhibiitorit sisaldavate proovide vahel. Katses kasutatud seitsmest annuspudelist lisati toksikanti viite pudelisse, kahte pudelisse 3,5-diklorofenooli ei lisatud, et saada kätte protsessi tavapärase efektiivsus. Kaks nullproovi tulemust keskmistati, et saada inhibitsiooni kirjeldamiseks võrdlusalus.



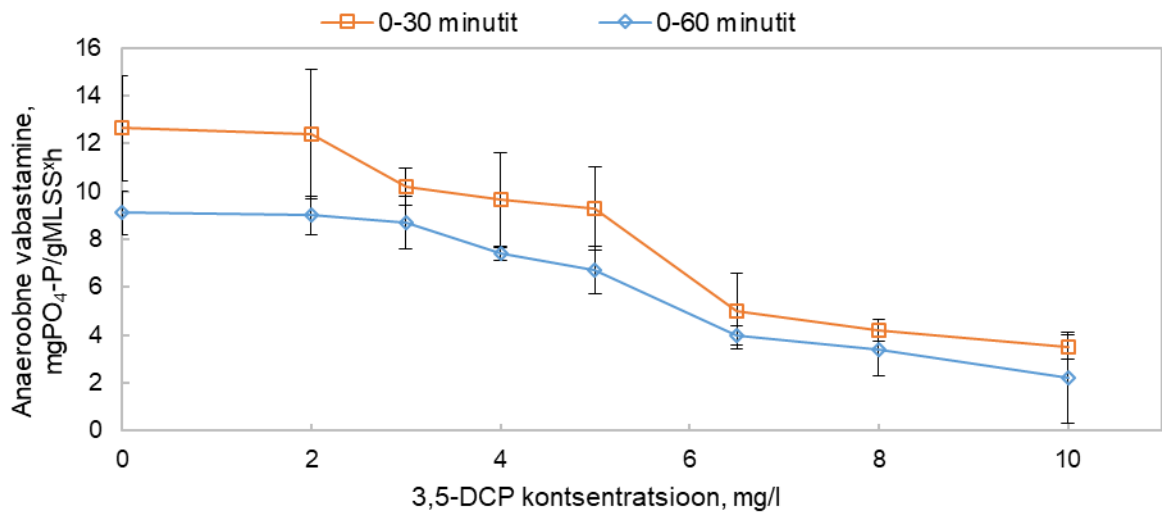
Joonis 3. Tõhustatud fosforiärastuse inhibitsiooni tulemused erinevatel 3,5-diklorofenooli kontsentratsioonidel (n=7)

Joonis 3 iseloomustab Bio-P inhibitsiooni meetodika efektiivset toimimist, mis on saavutatud katse sooritamisel mudelaineiga erinevatel kontsentratsioonidel. Fosforiärastuse katse esimese tunni aja jooksul anaeroobses keskkonnas toimub efektiivse protsessi korral fosforiühendite vabanemine baktermassist, mille käigus saadud energiat kasutatakse polühüdrosüalkanoaatide tootmiseks. Pärast 60-minuti pikkust anaeroobset tsüklit järgnes 6-tunni pikkune aeroobne etapp, kus leiab aset ortofosfaatide sidumine lahusest, mida iseloomustab fosfaatiooni kontsentratsiooni langus. Graafikutele vaadeldav lühike $PO_4\text{-P}$ kontsentratsiooni tõus ning järgnev pikaajalisem langus on tõhustatud fosforiärastusele iseloomulik. Seetõttu on inhibitsiooni tekkimine lihtsasti tuvastatav ka graafiliselt.

Katsepudelitesse lisati mudelainet vastavalt 2, 4, 5, 6.5 ja 8 mg/l 3,5-diklorofenooli (Joonis 3). Võrreldes tühiprooviga on selgelt näha toksikandi kontsentratsiooni suurenedes aina tugevamat inhibeerivat mõju tõhustatud fosforiärastuse protsessi toimimisele. Väikeste toksikandi kontsentratsioonide puhul (2 mg/l) on fosforiärastuse tõhusus sarnane tühiproovile, 4 mg/l ja 5 mg/l puhul on mõju suurem, kuid tulemustest on tuvastatav Bio-P-le iseloomulik fosfaatide sidumine ja vabastamine. Kõrged 3,5-diklorofenooli kontsentratsioonid (6.5 ja 8 mg/l) inhibeerisid fosforiärastust peaaegu täielikult. Katse lõppedes oli kõige kõrgem fosfaatiooni sisaldus 8 mg/l toksikandi sisaldusega proovis ja kõige madalam tühiproovis. Katse tulemusena saab öelda, et valitud mudelaine tekitab tõhustatud fosforiärastusele inhibitsiooni ning valitud katsemetoodika sobis inhibitsiooni kirjeldamiseks.

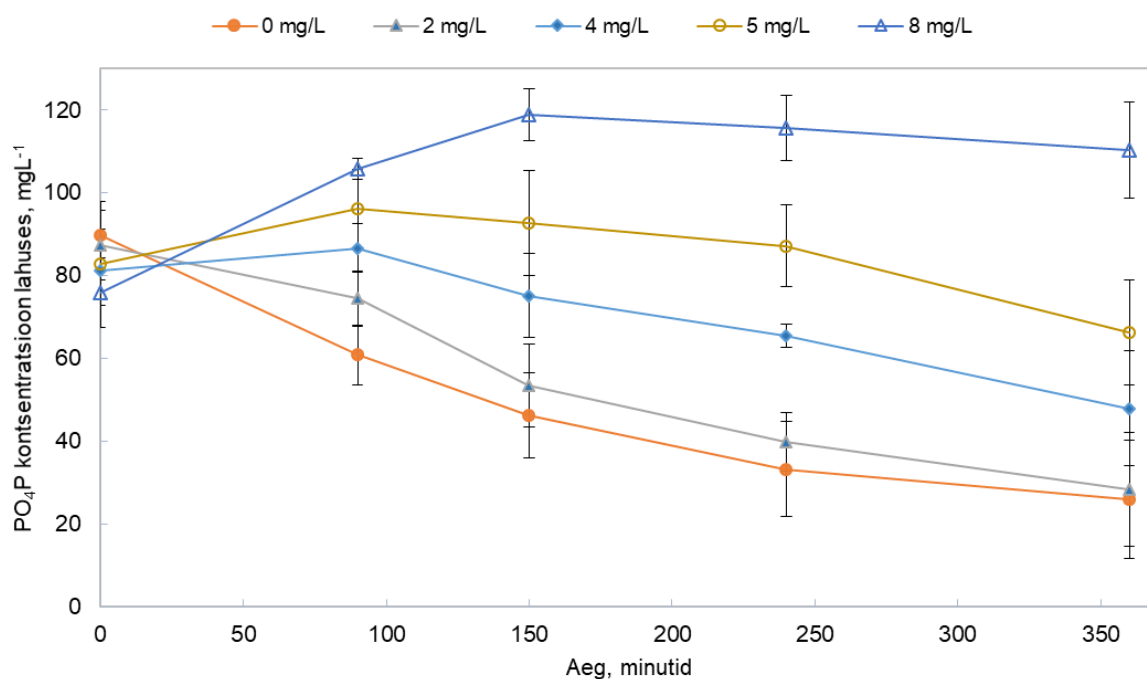
Joonis 4 ja Joonis 5 iseloomustavad täpsemalt mudelaine 3,5-diklorobenseeni tekitatud inhibitsiooni erinevatel kontsentratsioonidel nii anaeroobses kui aeroobses faasis toimuvate protsessiosale. Joonis 4 on graafiliselt esitatud anaeroobses faasis ortofosfaadi vabanemise kiirus bakterirakkudest 30-ne ja 60-ne minuti jooksul erinevatel mudelainel kontsentratsioonidel. Ortofosfaadi vabanemise täpsemaks kirjeldamiseks ja erinevate katseeriade tulemuste ühtlustamiseks on arvutatud ortofosfaadi vabanemine grammi MLSS-i kohta.

Kuigi katsetes kasutati anaeroobse faasi kestusena 60 minutit, on ortofosfaatide vabanemine esimese 30 minuti jooksul oluliselt kiirem ning selle aja jooksul vabaneb arvutuslikult ligi 90% fosfaadist. Inhibiitori erinevad kontsentratsioonid mõjutavad tervet anaeroobset faasi sarnaselt ning tulemustes ei avaldu suurt erinevust fosfori vabanemise kiiruse vähenemises 30 ja 60 minuti võrdluses. Väiksema erinevusena võib välja tuua kiiruste ühtlustumise inhibeerivates tingimustes, ilma mudelaine sisalduseta proovis erinesid kiirused $\sim 3 \text{ mg PO}_4\text{-P g}^{-1} \text{ MLSS h}^{-1}$ võrra, kõrgetel mudelaine kontsentratsioonidel aga vaid $\sim 1 \text{ mg PO}_4\text{-P g}^{-1} \text{ MLSS h}^{-1}$ võrra.



Joonis 4. Fosfaadi eraldumine anaeroobses keskkonnas erinevate 3,5- diklorofenooli sisalduste juures (n=7)

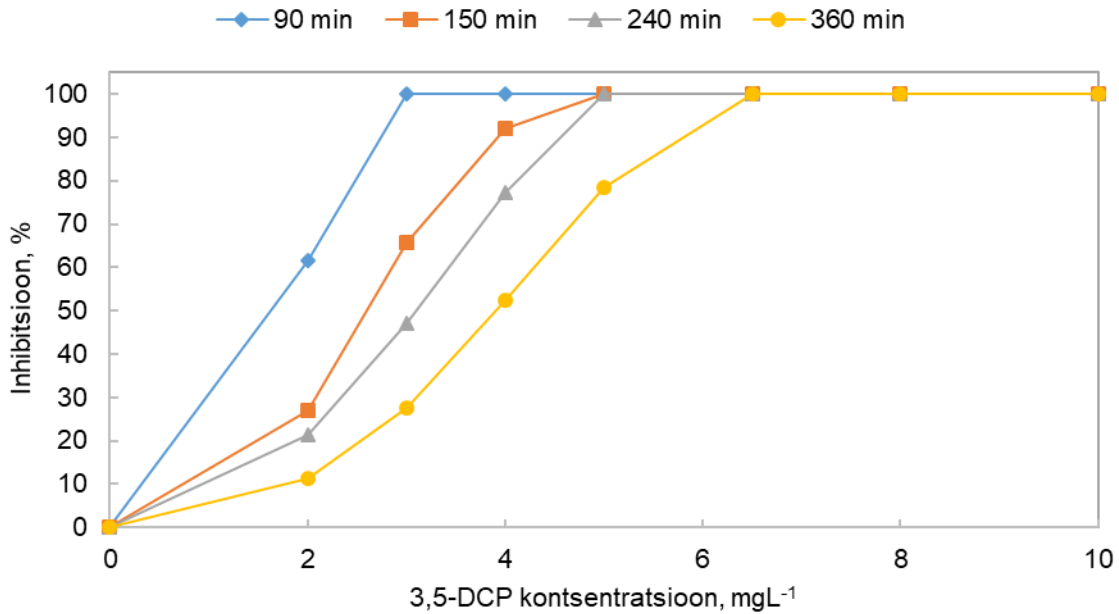
Joonis 5 iseloomustab mudelaine inhibitsiooni aeroobses faasis toimuvale alaprotsessile, mille käigus toimub lahusest ortofosfaatide sidumine raku sisse polüfosfaatideks. Tühiproovi korral langes fosfori kontsentratsioon lahuses 50 mg/l võrra ning oli katse lõpus 30 mg/l. 2 mg/l mudelaine proovis oli fosfori kontsentratsiooni langus veidi aeglasem, kuid katse lõpuks jõudis tühiprooviga sarnasele kontsentratsioonile. Inhibeeriv efekt aeroobsele faasile on paremini täheldatav alates 4 mg/l 3,5-diklorobenseeni kontsentratsioonidest. Kui veel 4 ja 5 mg/l sisalduse juures on fosfaatide sidumist katse jooksul toimunud, siis 8 mg/l fenoolisisaldusega proovis toimus fosfaadi sidumise asemel fosfaadisisalduse kasvamine ehk bio-P protsessi aeroobne osa oli täielikult inhibeeritud.



Joonis 5. Aeroobses keskkonnas fosfaatide sidumine 0-8 mg/l 3,5- diklorofenooli sisaldusega

Laboratoorsete katsete käigus hinnati ka aeroobse tsükli pikkust. Kuna meetodika puhul on oluline selle kasutusmugavus ja lihtsus, siis on eelistatud ajaliselt lühemad katsed. Inhibitsioonimäärad aeroobses faasis toimuvale fosfori sidumisele arvatati 90, 150, 240 ja 360 minuti kohta, kus inhibitsiooni aluseks võeti fosfori sidumise kiirus tühiproovis vastava aeratsiooniaja jooksul. Vastavad inhibitsioonimäärad on graafiliselt kujutatud Joonis 6.

Aeroobse tsükli pikkuse hindamiseks kasutati erineva aeratsiooniajaga arvatud IC_{50} kontsentratsioone ehk mudelaine arvutuslikku kontsentratsiooni, mille puhul oli inhibeeritud täpselt pool bio-P aktiivsusest. Arvutustest selgus, et lühema aeratsiooniajaga on oht toksikandi inhibeerivat toimet üle hinnata, 90 minuti kohta arvatatuna saadi 3,5-diklorofenooli IC_{50} väärtuseks 1,6 mg/l, 150 minuti puhul 2,6 mg/l, 240 minuti puhul 3,1 mg/l ja 360 minuti puhul 3,9 mg/l. Järeldusena võib öelda, et pikema aereerimisega saavutatakse täpsem tulemus ning kuigi sellest pikeneb meetodika ajaline kestus aitab see vältida inhibitsiooni ülehindamist.



Joonis 6. Inhibitsiooni määramine fosfori sidumisel aeroobses keskkonnas erinevate fenooli kontsentratsioonide juures rakendades 90, 150, 240 ja 360 minuti pikkust aeratsiooni (n=7)

3.2 Metoodika usaldusväarsuse kontrollimine

Reoveepuhastites kasutatakse mitmeid erinevaid bioloogilisi protsesse. Nitrifikatsiooniprotsessile ja hapnikutarbele on avaldatud inhibitsiooni mõõtmiseks rahvusvahelised metoodikad (ISO 8192 ja ISO 9509). Selleks, et võrrelda tõhustatud fosforiärastuse inhibitsioonimetoodika täpsust ning usaldusväarsust, on vaja välja arvutada mõningad usaldusväarsust näitavad parameetrid. Võrdlemise teeb lihtsaks ka tõsiasi, et kõikides standardmetoodikates on mudelainena kasutatud ka antud jaoks valitud 3,5-diklorobenseeni. Tõhustatud fosforiärastuse inhibitsioonimetoodikale väljaarvutatud parameetrid on toodud Tabel 3.

Aktiivmuda kasutatavate metoodikatele on iseloomulik kõrge ebatäpsus, mis tuleneb nii aktiivmuda varieeruvast aktiivsusest sõltuvalt aastaajast, mõõtmismeetodite ebatäpsusest kui ka katse käigus tekkivatest võimalikest kõrvalnähtudest (süsinikuallikas, mis ei ole mudaga adapteerunud, katse ülespanekuga tekitatud kahjustused aktiivmudale jne). Usaldusväarsusparameetrid on olulised, hindamaks metoodika suhtelist täpsust ja võimalikke variatsioone, mille abil on võimalik metoodika edaspidisel kasutamisel hinnata katse õnnestumist ja saadud tulemuste korrektsust.

Võrreldes teiste ISO standarditega, on tõhustatud fosforiärastuse IC₅₀ tulemus kõige madalam, ISO 8192 keskmine IC₅₀ on 9,3 ± 3 mg/l ja laiendmääramatus 7,1 kuni 11,3 mg/l ning ISO 9509 keskmine IC₅₀ on 5,6 ± 3 mg/l ning laiendmääramatus 0,7 kuni 9,6 mg/l. Üldiselt on saadud tulemused standardmetoodika täpsustega sarnased, mis kinnitab meetodi kasutusvõimalust ning usaldusväärsust.

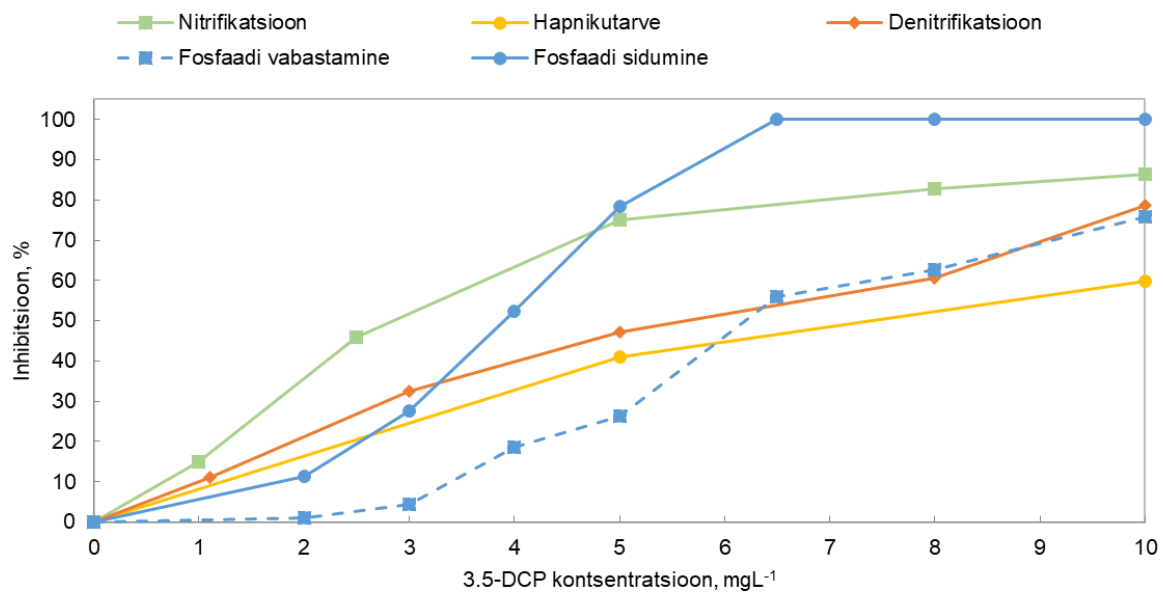
Tabel 3. Tõhustatud fosforiärastuse metoodika parameetrid

Parameeter	Ühik	Bio-P	Hapnikutarve	Nitrifikatsioon	Denitrifikatsioon
Keskmine IC ₅₀ väärtus	mg/l	3,9 ± 1	9,3 ± 3	5,6 ± 3	5,5 ± 2,2
95,4% usaldusnivoo, k=2	mg/l	2 ... 5,9	7,1 ... 11,3	0,7 ... 9,6	1,2 ... 9,8
Suhteline standardhälve	%	24,9	-	54	39,2

*Denitrifikatsiooni ja tõhustatud fosforiärastuse protsesside parameetrid on arvatud Tartu Ülikooli Chemicumi kolloid- ja keskkonnakeemia laboris. Nitrifikatsiooni ja hapnikutarbe inhibitsioonitestide parameetrid on refereeritud vastavatest ISO standardmetoodikatest. Antud laboris tehtud nitrifikatsiooni ja hapnikutarve inhibitsioonitestide väärtused 3,5-diklorofenooli jaoks on ISO standardites toodud vahemikes.

Tõhustatud fosforiärastuse inhibitsioonikatse tulemusi võrreldi teiste laboris kasutatud meetodite tulemustega ka graafiliselt (Joonis 7). Sama mudelainega on varasemate aastate käigus analüüsitud ka teiste reoveepuhastuse bioloogiliste protsesside inhibitsioonimetoodikaid ning võrdlus näitab, kui tundlikud on erinevad protsessid 3,5-diklorofenooli inhibitsioonile.

Fosfaadi sidumise ja vabastamise inhibitsioon oli võrreldes teiste protsessidega väga madalatel mudelaine kontsentratsioonidel väiksem, kuid üldised inhibitsioonikõverad on järsemad. See tähendab, et inhibitsioon tekib kiiremini ning juba väike toksikandi kontsentratsiooni suurenemine tõstab inhibitsiooni olulisel määral. Fosfaatide sidumisel on IC₅₀ väärtus 4 mg/l ning fosfaadi vabastamisel alles 6,5 mg/l juures ehk anaeroobses toimub inhibeerimine aeglasemalt kui aeroobses keskkonnas. Fosfori sidumine on 4,8 mg/l juures oluliselt rohkem mõjutatud inhibitsioonist kui fosfori vabastamine ning erinevalt teistest metoodikatest on 3,5-diklorobenseeni kontsentratsioonist alates fosfori sidumine täielikult inhibeeritud.



Joonis 7. Nitrifikatsiooni, hapnikutarbe, denitrifikatsiooni, fosfori vabastamise ja sidumise inhibeerimise tulemused erinevate 3,5- diklorofenooli kontsentratsioonide juures

4. Kokkuvõte

Fosforiärastus on puhastites bioloogilise etapi esimene protsess, kus toimub aktiivmuda abil fosfaatide eemaldamine reoveest. Kui reovesi sisaldab suures koguses toksilisi aineid, võib see aktiivmudaprotsessi inhibeerida, mis tekitab fosfaatide kontsentratsioon suurenemist reovees ning põhjustaks veekogude eutrofeerumist. Antud töö eesmärgiks oli tõhustatud fosforiärastuse meetodika välja töötamine ja selle usaldusväärsuse kontrollimine, millega on võimalik hinnata inhibitsiooni reoveepuhastite bioloogilise fosforiärastus protsessile. Töös kasutati mudelainena 3,5-diklorofenooli, mida on ka ISO 9509 ja ISO 8192 meetodikate valideerimisel kasutatud. Katsed sooritati Tartu Ülikooli Chemicumi kolloid- ja keskkonnakeemia laboris.

Katsete tegemisel tuli kasutada olmereoveepuhasti sissevoolu, sest sünteetilise reoveega ei esinenud ei ortofosfaatide sisalduse suurenemist anaeroobses ega sidumist aeroobses faasis. 3,5-diklorofenooli erinevates kogustes lisamine katsepudelitesse näitas, et mida suurem on toksilise ühendi kontsentratsioon, seda tugevamini inhibeeriti fosforiärastusprotsessi. Anaeroobse ja aeroobse keskkondade joonistelt on täpsemini välja toodud fosfaatide vabastamise ja sidumise tulemused erinevatel aegadel ja mudelaine kontsentratsioonidel.

Samuti analüüsiti katsete inhibitsiooni kiiruseid erinevate fenooli kogustega, kus selgus, et aeroobses keskkonnas 90 minuti möödumisel oli IC_{50} väärtuseks 1,6 mg/l ja 360 minuti möödumisel 3,9 mg/l. Järeldusena võib öelda, lühema katsega võib üle hinnata toksikandi inhibeerivat mõju.

Fosforiärastus on kõige tundlikum protsess reovees sisalduvatele toksilistele ühenditele (sest see on esimene protsess bioloogilises etapis). Inhibitsiooni koondtulemuste jooniselt oli näha, et võrreldes teiste ärastusprotsessidega oli kõige vähem mõjutatud anaeroobse ortofosfaatide vabanemine rakus ning alates 4,8 mg/l 3,5-diklorofenool sisaldusega oli kõige rohkem mõjutatud aeroobse polüfosfaatide sidumine. Sellest võib järeldada, et aeroobse keskkonna tundlikkus on antud katses saavutatud ning oluline tulemus.

Samuti võrreldi meetodika usaldusväärsust välja arvatud parameetritega teiste inhibitsiooni (ISO 8192, ISO 9509) määramise parameetritega, kus tõhustatud fosforiärastuse IC_{50} tulemus oli $3,9 \pm 1$ mg/l ja laiendmääramatus 2 kuni 5,9 mg/l. Nende tulemuste põhjal võib järeldada, et välja töötatud meetodika on vastavuses teiste väärtustega, on rakendatav ning bakalaureusetöö eesmärk saavutati.

Summary

Detection of enhanced phosphorus removal inhibition in the activated sludge process

Phosphorous removal is the first process in the biological stage, where the activated sludge removes phosphorus in wastewater. When wastewater contains large amounts of toxic substances, it can inhibit the activated sludge process, which would lead to an increase in the concentrations of phosphorus in the wastewater and cause eutrophication in waterbodies. The aim of this Bachelor's thesis was to develop enhanced phosphorus removal methodology and verify its reliability, which can be used to assess the inhibition of the biological phosphorus removal process in wastewater treatment plants. 3,5-dichlorophenol was used as a model substance, which has also been used in validation of ISO 9509 and ISO 8192 methodology. The experiment took place in the colloid and environmental chemistry laboratory of the University of Tartu.

The influent of the wastewater treatment plant had to be used for the experiments, because there was no increase in the content of orthophosphates in the anaerobic or binding in the aerobic phase with the synthetic wastewater. The addition of various amounts of 3,5-dichlorophenol in the test bottles showed that the higher the concentration of the toxic compound, the more strongly the phosphorus removal process was inhibited. The drawings of the anaerobic and aerobic environments show in more detail the results of phosphate release and binding at different times and model wave concentrations.

The rates of inhibition of the experiments were also analyzed with different amounts of phenol, which showed an IC_{50} of 1.6 mg/l after 90 minutes and 3.9 mg/l after 360 minutes in an aerobic environment. In conclusion, the inhibitory effect of a toxicant can be overestimated by a shorter test.

Phosphorus removal is the most sensitive process to toxic compounds in wastewater (because it is the first process in the biological stage). The summary of the inhibition results showed that the release of anaerobic orthophosphates in the cell was the least affected compared to other removal processes and aerobic polyphosphate binding was most affected from 3,5 mg/l 3,5-dichlorophenol. It can be concluded that the sensitivity of the aerobic environment has been achieved in this experiment and is an important result.

The methodology calculated parameters were compared with the other parameters of the determination of inhibition (ISO 8192, ISO 9509) to verify the reliability, where the IC₅₀ result of enhanced phosphorus removal was 3.9 ± 1 mg/l and the confidence level was 2 to 5.9 mg/l. Based on these results, it can be concluded that the developed methodology is in line with other values, is applicable and the goal of the Bachelor's thesis was achieved.

Kasutatud kirjandus

- [1] K. Klein and T. Tenno, "Estimating the impact of inhibitory substances on activated sludge denitrification process," *Water Pract. Technol.*, vol. 14, no. 4, pp. 863–871, Dec. 2019, doi: 10.2166/wpt.2019.069.
- [2] M. C. M. van Loosdrecht, P. H. Nielsen, C. M. Lopez-Vazquez, and D. Brdjanovic, *Experimental Methods in Wastewater Treatment*. IWA Publishing, 2016.
- [3] C. Tuser, "What is Wastewater?," *Water & Wastes Digest*, 2020. [Online]. Available: <https://www.wwdmag.com/wastewater-treatment/what-wastewater>. [Accessed: 29-May-2020].
- [4] K. Klein *et al.*, "Combined treatment of pyrogenic wastewater from oil shale retorting," *Oil Shale*, vol. 34, no. 1, pp. 82–96, Mar. 2017, doi: 10.3176/oil.2017.1.06.
- [5] A. Gaškov, "Kundas toodetakse biometaanid - Estonian Cell," *TööstusEST*, 2018. [Online]. Available: <https://www.estoniacell.ee/udised/toeostusest-september-2018-kundas-toodetakse-biometaanid/>. [Accessed: 29-May-2020].
- [6] C. P. Gerba and I. L. Pepper, "Wastewater Treatment and Biosolids Reuse," in *Environmental Microbiology*, Elsevier Inc., 2009, pp. 503–530.
- [7] K. V. Gernaey and G. Sin, "Wastewater Treatment Models," in *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set*, Elsevier Inc., 2008, pp. 3707–3718.
- [8] B. Zhang, X. Xu, and L. Zhu, "Activated sludge bacterial communities of typical wastewater treatment plants: distinct genera identification and metabolic potential differential analysis," *AMB Express*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13568-018-0714-0.
- [9] V. N. de Jonge and M. Elliott, "Eutrophication," in *Encyclopedia of Ocean Sciences*, Elsevier Ltd, 2001, pp. 306–323.
- [10] H. Malhotra, Vandana, S. Sharma, and R. Pandey, "Phosphorus nutrition: Plant growth in response to deficiency and excess," in *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*, Springer Singapore, 2018, pp. 171–190.
- [11] O. Ruzhitskaya and E. Gogina, "Methods for Removing of Phosphates from Wastewater," in *MATEC Web of Conferences*, 2017, vol. 106, doi:

- 10.1051/mateconf/201710607006.
- [12] M. N. V. Prasad, "Foreword," *Industrial and Municipal Sludge: Emerging Concerns and Scope for Resource Recovery*. Elsevier, pp. xxv–xxxii, 01-Jan-2019, doi: 10.1016/B978-0-12-815907-1.09997-9.
- [13] C. Mendez, "Coagulation and Flocculation Process Fundamentals," pp. 199–206.
- [14] Environmental Protection Agency, *Water Treatment Manuals: Coagulation, flocculation & Clarification*. Environmental Protection Agency, 2002.
- [15] J. M. Ebeling, P. L. Sibrell, S. R. Ogden, and S. T. Summerfelt, "Evaluation of chemical coagulation-flocculation aids for the removal of suspended solids and phosphorus from intensive recirculating aquaculture effluent discharge," *Aquac. Eng.*, vol. 29, no. 1–2, pp. 23–42, Oct. 2003, doi: 10.1016/S0144-8609(03)00029-3.
- [16] E. El-Bestawy, H. Hussein, H. H. Baghdadi, and M. F. El-Saka, "Comparison between biological and chemical treatment of wastewater containing nitrogen and phosphorus," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 32, no. 5, pp. 195–203, May 2005, doi: 10.1007/s10295-005-0229-y.
- [17] V. Lemmiksoo, T. Tenno, E. Mölder, and A. Tamm, "Regionaalsete reoveesete käitlemise lahenduste väljatöötamine ja jäätmete lakkamise kriteeriumite väljatöötamine reoveesete kohta III osa aruanne," 2015.
- [18] E.-J. Lee, A. K. An, and H.-S. Kim, "Effects of Coagulant with Different Basicity on Membrane-based Biological Treatment for Removing Phosphorus," *J. Coast. Res.*, vol. 79, pp. 65–69, Mar. 2017, doi: 10.2112/si79-014.1.
- [19] A. Oehmen *et al.*, "Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale," *Water Research*, vol. 41, no. 11. Elsevier Ltd, pp. 2271–2300, 01-Jun-2007, doi: 10.1016/j.watres.2007.02.030.
- [20] X. Zheng *et al.*, "Inhibitory factors affecting the process of enhanced biological phosphorus removal (EBPR) - A mini-review," *Process Biochemistry*, vol. 49, no. 12. Elsevier Ltd, pp. 2207–2213, 01-Dec-2014, doi: 10.1016/j.procbio.2014.10.008.
- [21] S. He and K. D. McMahon, "Microbiology of 'Candidatus Accumulibacter' in activated sludge," *Microb. Biotechnol.*, vol. 4, no. 5, pp. 603–619, Sep. 2011, doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00248.x.

- [22] A. J. Ebele, M. Abou-Elwafa Abdallah, and S. Harrad, "Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment," *Emerging Contaminants*, vol. 3, no. 1. KeAi Communications Co., pp. 1–16, 01-Mar-2017, doi: 10.1016/j.emcon.2016.12.004.
- [23] M. A. Barakat, "New trends in removing heavy metals from industrial wastewater," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 4, no. 4. Elsevier, pp. 361–377, 01-Oct-2011, doi: 10.1016/j.arabjc.2010.07.019.
- [24] I. S. Arvanitoyannis and T. H. Varzakas, "Fruit/Fruit Juice Waste Management: Treatment Methods and Potential Uses of Treated Waste," in *Waste Management for the Food Industries*, Elsevier Inc., 2008, pp. 569–628.
- [25] Y. Wang, Z. Ren, F. Jiang, J. Geng, W. He, and J. Yang, "Effect of copper ion on the anaerobic and aerobic metabolism of phosphorus-accumulating organisms linked to intracellular storage compounds," *J. Hazard. Mater.*, vol. 186, no. 1, pp. 313–319, 2011, doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.11.007.
- [26] S. Wasi, S. Tabrez, and M. Ahmad, "Toxicological effects of major environmental pollutants: An overview," *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 185, no. 3. pp. 2585–2593, Mar-2013, doi: 10.1007/s10661-012-2732-8.
- [27] J. Ruut, "Tervishoid ja keskkond: ravimijäädgid," 2017.
- [28] H. T. Hamad, "Removal of phenol and inorganic metals from wastewater using activated ceramic," *J. King Saud Univ. - Eng. Sci.*, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.jksues.2020.04.006.
- [29] K. Erg and S. Tarros, "Ordoviitsiumi Ida-Viru põlevkivibasseini ja Ida-Viru põhjaveekogumi omavahelise seose väljaselgitamine ohtlike ainete koormusallikate ja päritolu kaudu," 2017.
- [30] A. A. Gami, M. Y. S. K. A. K. F. A. Dahalan, A. Khalid, and S. A. Ahmad, "Phenol and its toxicity," 2004. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/271508777_Phenol_and_its_toxicity. [Accessed: 29-May-2020].
- [31] A. Hussain, S. K. Dubey, and V. Kumar, "Kinetic study for aerobic treatment of phenolic wastewater," *Water Resour. Ind.*, vol. 11, pp. 81–90, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.wri.2015.05.002.

- [32] K. Sak, H. Lust, and H. Everaus, “Tetrasoolium- (MTT) meetoodika võimaldab uurida potentsiaalselt aktiivsete ühendite kemosensitiivsust ja -resistentsust,” 2015.
- [33] E. Liwarska-Bizukojc, R. Ślęzak, and M. Klink, “Study on wastewater toxicity using ToxTrak™ method,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 23, no. 9, pp. 9105–9113, May 2016, doi: 10.1007/s11356-016-6096-4.
- [34] N. Majed and A. Z. Gu, “Application of Raman microscopy for simultaneous and quantitative evaluation of multiple intracellular polymers dynamics functionally relevant to enhanced biological phosphorus removal processes,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, no. 22, pp. 8601–8608, Nov. 2010, doi: 10.1021/es1016526.
- [35] International Organization for Standardization, *ISO 8192:2007 Water Quality - Test for Inhibition of Oxygen Consumption by Activated Sludge for Carbonaceous and Ammonium Oxidation*, vol. 2007. 2007.
- [36] International Organization for Standardization, *ISO9509 - Toxicity test for assessing the inhibition of nitrification of activated sludge microorganisms*. 2006.
- [37] International Organization for Standardization, *ISO 9888: Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Static test (Zahn-Wellens method)*. 1999.
- [38] F. J. Rubio-Rincón, L. Welles, C. M. Lopez-Vazquez, B. Abbas, M. C. M. Van Loosdrecht, and D. Brdjanovic, “Effect of lactate on the microbial community and process performance of an EBPR system,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. FEB, p. 125, Feb. 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.00125.
- [39] G. Wu and M. Rodgers, “Inhibitory effect of copper on enhanced biological phosphorus removal,” *Water Sci. Technol.*, vol. 62, no. 7, pp. 1464–1470, Oct. 2010, doi: 10.2166/wst.2010.431.

Tänuõnad

Soovin tänada kõiki, kes olid nõuks ja jõuks mulle selle töö valmimisel.

Kati Klein

Kristel Kroon

Markus Raudkivi

Christina Mürk

Grete Kaljulaid

Kadri Kuusk

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Hegne Lilleoja,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Tõhustatud fosforiärastuse inhibitsiooni tuvastamine aktiivmudaprotsessis“,

mille juhendaja on Kati Klein,

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 3.0, 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.

Hegne Lilleoja

Tartus, 01.06.2020