

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

Keemia Instituut

Kolloid- ja Keskkonnakeemia õppetool

Liselle Luks

**DENITRIFIKATSIOONI INHIBIBEERIMISE TESTI USALDUSVÄÄRSUSE  
KONTROLLIMINE**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja: dots Taavo Tenno

MSc Kati Klein

TARTU 2016

# Sisukord

Infoleht.....	3
Sissejuhatus.....	5
1 Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1 Reovee omadused.....	6
1.1.1 Reovees sisalduvad saasteained.....	6
1.2 Aktiivmudapuhastus.....	7
1.2.1 Nitrifikatsioon.....	10
1.2.2 Denitrifikatsioon.....	11
1.3 Ökotoksikoloogilised testid.....	13
1.4 Metoodika usaldusväärsuse kontrollimine.....	14
2 Eksperimentaalne osa.....	17
2.1 Katse kirjeldus.....	17
2.2 Metoodika.....	19
3 Tulemused.....	22
Kokkuvõte.....	27
Summary.....	28
Kasutatud kirjanduse loetelu.....	29
Tänuõnad.....	34
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	35

## **Infoleht**

Käesolev töö keskendub TÜ Keskkonnaanalüüsi laboris välja töötatud aktiivmuda denitrifikatsiooni inhibeerimise testi usaldusväarsuse kontrollimisele. Selles testis mõõdetakse, millisel määral mõjutab uuritav saasteaine või reovesi denitrifikatsiooniprotsessi kiirust. See on vajalik, sest tööstuspiirkondades juhitakse olmereoveepuhastitesse ka aktiivmudale potentsiaalselt ohtlikku tööstusreovett. Siiani pole aga välja töötatud kergesti rakendatavat denitrifikatsiooni inhibeerimise testi. Töös kasutati mudelainena 3,5-diklorofenooli. Tegemist on tuntud mürkainega, mida kasutatakse ka teistes standardiseeritud inhibitsioonitestides. Testi usaldusväarsust kontrolliti arvutades viie paralleelkatse  $IC_{50}$  (kontsentratsioon, mis inhibeerib 50% denitrifikatsiooni kiirusest), keskväärtus, standardhälve, standardmääramatus ja suhteline kogutud standardhälve. Lisaks võrreldi denitrifikatsiooni testi tulemuste kokkulangevust nitrifikatsiooni ja hapnikutarbe inhibeerimise standardtestidega. Tulemuste kokkulangevuse tõttu võib väljatöötatud denitrifikatsiooni inhibeerimise testi usaldusväärseks pidada.

Võtmesõnad: aktiivmudaprotsess, toksiline reovesi, denitrifikatsioon, inhibeerimine

CERCS kood: T270 keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

## **Abstact**

This paper focuses on controlling the reliability of denitrification inhibition test developed in the laboratory of Environmental Analysis of University of Tartu. The test measures the impact of toxicant or wastewater on denitrification rate. It is essential because industrial wastewater is subjected to municipal wastewater treatment plants in industrial regions. Industrial wastewater may contain potentially toxic substances to activated sludge. However, until now any easily applicable denitrification inhibition test does not exist. In this study, 3, 5-dichlorophenol was used as model chemical. It is a well-known toxic substance that is used in other standardized inhibitory tests as well. The reliability of the test was controlled by calculating the average of  $IC_{50}$  (concentration inhibiting 50% of denitrification rate), standard deviation, 95,4 % confidence interval of the average  $IC_{50}$  and coefficient of variation. These statistical characteristics were compared with the same values reported ISO standards of nitrification inhibition and oxygen uptake rate inhibition tests. Due to the concurrence of these tests, denitrification test can be counted reliable.

Keywords: activated sludge process, toxic wastewater, denitrification, inhibition

CERCS code: T270 Environmental Technology, pollution control

## Sissejuhatus

Reovesi tekib iga päev nii meie kodudes, kontorites kui ka erinevates tööstustes. Olenemata reovee päritolust on vaja see enne loodusesse suunamist puhastada. Põhilised saasteained, mis tuleb reoveest eemaldada, on orgaanilised ühendid, lämmastik ja fosfor. Enamlevinud meetod reovee puhastamiseks on aktiivmudaprotsess. Aktiivmuda on suspensioon bakteritest, seentest ja algloomadest. Selle tehnoloogia puhul kasutavad aktiivmudas elavad mikroorganismid reovees sisalduvaid saasteaineid enda ainevahetuses.

Muutused olmereovee koostises on etteaimatavad, sõltudes peamiselt ilmastikust. Tööstusreovees võib saasteainete sisaldus ootamatult suureneeda. See on tingitud sellest, et tööstusliku reovee iseloom sõltub rakendatud tootmistehnoloogiast ja parajasti läbiviidavatest protsessidest. Tööstuslik reovesi võib sisaldada ka kõrget kontsentratsiooni ohtlikke ühendeid. Saasteainete koguse oluline suurenemine ja ohtlike ühendite sisaldus reovees võib pärssida aktiivmudapuhastis mikroorganismide poolt läbiviidavaid reoveepuhastusprotsesse. Sellises olukorras ei ärastata reovees olevaid saasteaineid, needjuhitakse heitveega keskkonda.

Vältimaks olukorda, kus reovesi põhjustab puhastusprotsessi efektiivsuse olulist langust, on vaja kvantitatiivselt mõõta reovee mõju aktiivmudale. Olemas on standardmeetodid, et mõõta reovee mõju orgaanilise aine ärastamise efektiivsusele ja lämmastikuärastuse esimesele etapile – nitrifikatsioonile. Ei ole aga usaldusväärset ja kergestirakendatavat standardmeetodikat, et hinnata reovee mõju lämmastikuärastuse teisele etapile – denitrifikatsioonile.

Bakalaureusetöö eesmärgiks on mõõtareovee mõju denitrifikatsioonile. Reovee mõju hindamine denitrifikatsiooniprotsessile on vajalik, et saada teada, kas ja millises koguses võib uuritavat reovett suunata aktiivmudapuhastisse. Eesmärgi saavutamiseks teostati laborikatsed viies paralleelis. Katsetes mõõdeti denitrifikatsioonikiiruse muutust kolme tunni jooksul erineva toksikandi (3,5-diklorofenooli) kontsentratsiooni juures. Metoodika usaldusväärtuse kontrollimiseks arvutati viie paralleelmõõtmise standardhälve, 95,4% usaldusnivoo ( $k=2$ ) ja suhteline kogutud standardhälve.

# 1 Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Reovee omadused

Reovesi on inimtegevuse tagajärjel tekkinud saastunud vesi. Sõltuvalt reovee päritolust liigitatakse see olme- ja tööstusreoveeks. Olmereovesi tekib igapäeva toimetuste käigus kodustes majapidamistes, koolides ja kontorites. Olmereovett on lihtne puhastada, sest see on suhteliselt ühtlase koostisega, selles ei sisaldu märkimisväärses koguses aktiivmudaprotsessile pärssivaid ühendeid. Olmereovee eeliseks on ka see, et see sisaldab aktiivmudaprotsessi toimumiseks vajalikku orgaanilist ainet, fosforit, lämmastikku ja mikrotoitaineid. Olmereovee kogus ja kontsentreeritus sõltuvad põhiliselt ilmastikust. Lumesulaperioodil ning vihmavalingute korral on reovee kogused suuremad ning vesi lahja. Põuaperioodil on olukord vastupidine, siis on reovee kogused väikesed, kuid saasteainete kontsentratsioon kõrge (Cirja jt., 2007; Bitton, 1994).

Tööstusreovesi tekib tootmise käigus, näiteks ravimitööstuses, keemiatööstuses või paberi tootmisel (Bautista jt., 2008). Tööstusreovee koostis on ettevõtte spetsiifiline ehk sõltub olulisel määral sellest mida ja kui suurtes kogustes ettevõtte toodab. Kuna tööstuslik reovesi ei sisalda kõiki mikroorganismidele vajalikke toitaineid, on selle puhastamisel vaja sageli protsessi puuduolevaid toitaineid lisada (näiteks lämmastikku või fosforit) (Hussain jt., 2015).

Tööstusreovee muutlik koostis ning selles sisalduvad toksilised ained vähendavad aktiivmudaprotsessi efektiivsust (Scruggs, Randall, 1998). Aktiivmudaprotsesse pärssivatest ühenditest sisaldab tööstusreovesinäiteks raskmetalle ja fenooli (Bautista jt., 2008).

Osades piirkondades suunatakse olmereoveepuhastisse lisaks olmereoveele ka tööstuslik reovesi. Niimoodi on see näiteks Järve Biopuhastis (Järve biopuhastus). Mõnikord on tööstuses rakendatud eelpuhastust (näiteks defenoleerimine ja rasva eemaldamine), kuid sageli jõuab puhastisse ka eelnevalt töötlemata reovesi (Chudoba, 1996).

### 1. 1. 1 Reovees sisalduvad saasteained

Põhilise osa reovees sisalduvatest saasteainetest moodustavad orgaaniline aine, fosfor ja lämmastik. Orgaaniline aine esineb reovees süsinikuna ning võib olla kas lahustunud või tahkel kujul (Gray, 2004). Fosfor on mittemetalliline keemiline element, mida kasutatakse palju väetiste koosseisus ning mis on inimorganismis asendamatu element. Kuna fosfor on taimede makrotoitelement, siis võib ta keskkonda sattudes põhjustada veekogude eutrofeerumist. Seetõttu

on fosfor reovees saasteaine. Lämmastik on mittemetalliline element, mida kasutatakse palju väetistes. Lisaks orgaanilisele ainele, fosforile ja lämmastikule sisaldab reovesi ka ohtlikke ühendeid. Ohtlikud ühendid on raskmetallid ja orgaanilised saasteained (ravimijäägid, fenoolid, kloororgaanilised ühendid), mille eemaldamine reoveest on raskendatud. Ohtlikud ühendid takistavad mikroorganismide elutegevust ja metabolismi, pärssides seeläbi reoveepuhasti puhastusefektiivsust (Bennett, 1989).

Raskmetallideks nimetatakse metalliliste omadustega elemente, mille tihedus on suurem kui  $5000 \text{ kg/m}^3$ . Enamus raskmetalle on toksilised ja kantserogeensed, olles seetõttu inimestele ja loodusele ohtlikud. Raskmetallidest sisaldab tööstusreovesi kõige sagedaminikaadmiumit, elavhõbedat, kroomi ja niklit (Srivastava, Majumder, 2008). Lisaks raskmetallidele sisaldab tööstusreovesi ka fenooli. Fenoolid ehk hüdroksübenseenid on bioloogilistele protsessidele väga mürgised ning inhibeerivad suurel määral aktiivmudaprotsessi efektiivsust. Fenoolid mõjutavad inimeste tervist nii lühi- kui ka pikajalise kokkupuute korral (Novozymes).

## **1. 2 Aktiivmudapuhastus**

Aktiivmuda on helbeline biomass, mis koosneb seentest, algloomadest, heljumist ja kolloidosakestest. Aktiivmuda kasutamine põhinebki just temas sisalduvate mikroorganismide rakendamisel.

Aktiivmudaprotsess on tänapäeval enimkasutatav bioloogiline reoveepuhastuse tehnoloogia, mida kasutatakse nii olmereovee kui ka tööstusliku reovee puhastamiseks. Aktiivmudapuhastuse laialdane kasutus põhineb tema paindlikkusel ehk võimalusel tema opereerimisparameetreid muuta. Aktiivmudatehnoloogia puhul kasutavad aktiivmudas elavad mikroorganismid enda elutegevuseks reovees sisalduvaid saasteaineid, millest nad toodavad uut biomassi (Gray, 2004).

Aktiivmudapuhastus toimub mitmes etapis. Klassikaliselt on reoveepuhastis eristatud anaeroobne, anoksililine ja aeroobne keskkond (joonis 1). Esimesena jõuab reovesi bioloogilise fosforiärastuse ehk bioP mahutisse. Selles mahutis saab alguse tõhustatud fosforiärastuse protsess. See on rangelt anaeroobne mahuti, kus on suur kergestilaguneva orgaanilise aine sisaldus. BioP mahutis tarbivad fosforit akumulatsioonid mikroorganismid reovees sisalduvat kergestilagunevat orgaanikat ning lagundavad rakkudes olevaid polüfosfaatseid ahelad ortofosfaatideks.

Ortofosfaadid lähevad lahuse faasi. BioP protsessi anaeroobses etapis suureneb lahuses ortofosfaatide ning väheneb orgaanilise aine sisaldus (Sathasivan,2003).

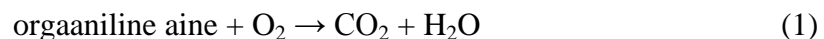
Teine etapp on anoksliline, kus toimub lämmastikuärastuse teine etapp ehk denitrifikatsioon. Selles mahutis puudub molekulaarne hapnik, kuid sinna pumbatakse aeroobsest mahutist osa aktiivmudasuspensioonist, mis sisaldab nitraati ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ). Kui nitraati on liiga vähe, siis on denitrifikatsiooniprotsess häiritud (Lin jt., 2009).

Kolmas etapp on aeroobne. Olmereoveepuhastis toimub süsteemi aereerimine mehhaaniliselt. Hapnikuga varustatus tagatakse surve all oleva õhu juhtimisel aeratsioonimahutisse. Õhumullid tekitavad turbulentsi, mille tõttu suurendab hapniku ülekannet. Lisaks bakterite piisava hapnikuga varustamisele on aereerimine oluline ka aktiivmudasuspensiooni segamiseks (Gray, 2004).

Aeratsioonimahutis toimub kolm protsessi: fosfori ärastuse teine etapp, nitrifikatsioon ja orgaanilise aine aeroobne oksüdeerimine. Fosforiärastuse teises etapis seovad mikroorganismid hapnikurikas keskkonnas reoveest ortofosfaadid ning talletavad need enda rakumassis polüfosfaatidena( Sathasivan,Majumder, 2003).

Fosforit saab ärastada ka keemiliselt, selleks lisatakse reoveele kas soola või lupja ning tekib sade (Srivastava, Majumder, 2008). Keemiliseks sadestamiseks kasutatakse erinevaid soolasisid( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ;  $\text{FeCl}_3$ ;  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ;  $\text{MgSO}_4$ ), mis reageerivad fosforiga ning moodustavad mittelahustuva sademe ( $\text{FePO}_4$ ;  $\text{AlPO}_4$ ;  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ ) (Lenntech).

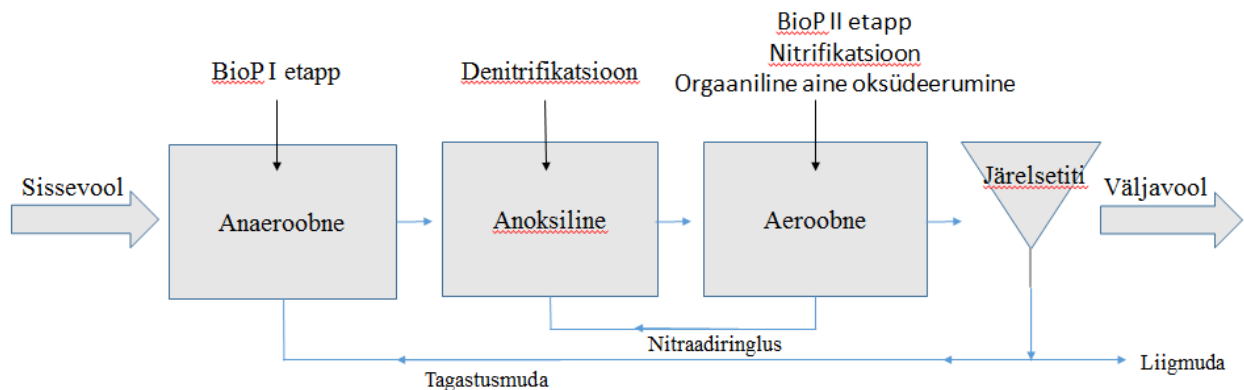
Aktiivmudapuhastuses talletatakse 60% orgaanilisest ainest rakumassi ning 40% oksüdeeritakse süsihappegaasiks ja veeks (valem 1).



Orgaanilise aine ärastusefektiivsust mõõdetakse peamiselt kolme näitaja järgi. Nendeks on KHT, BHT ja TOC. KHT ehk keemiline hapnikutarve näitab, kui palju hapnikku kulub 1 liitris vees oleva orgaanilise aine ärastamiseks. BHT ehk bioloogiline hapnikutarve näitab, kui palju hapnikku kulub 1 liitris vees oleva orgaanilise aine bioloogiliseks oksüdeerimiseks mikroorganismide poolt. BHT jaotatakse inkubeerimisperioodi kestvuse alusel  $\text{BHT}_5$  ja  $\text{BHT}_7$ -ks.  $\text{BHT}_5$  näitab viie päeva bioloogilist hapnikutarvet ja  $\text{BHT}_7$  seitsme päeva hapnikutarvet. TOC näitab kogu orgaanilise süsinikusisaldust (Sawyer jt., 2003).



Peale aereerimist suunatakse reovee ja aktiivmuda segu järelsetitisse. Setitis eraldatakse heitvesi ja muda teineteisest gravitatsiooniliselt ehk muda setitatakse ja puhastatud reovesi suunatakse suublasse. Osa settinud mudast suunatakse bioP mahutisse. Seda osa mudast, mida bioP mahutisse ei juhita nimetatakse liigmudaks. Liigmuda eemaldatakse süsteemist ning suunatakse reoveesette käitlemisele. Olenevalt reoveepuhasti suurusest kasutatakse erinevaid settekäitluse lahendusi (joonis 1) (Henze jt., 1995).



Joonis 1. Aktiivmudapuhastus

Aktiivmudaprotsessi opereerimiseks kasutatakse erinevaid parameetreid. Põhilised aktiivmudapuhastusega seotud opereerimisparameetrid on MLSS (*mixed liquor suspended solids*), mudakoormus (F/M suhe), hüdrauliline viibeaeg (HRT-*hydraulic retention time*), muda vanus (SRT- *sludge retention time*), muda settivuse indeks (SVI-*sludge volume index*) ja C:N:P suhe. MLSS ehk aktiivmuda suspensiooni kontsentratsioon on suspendeeritud orgaanilise (k. a mikroorganismid) ja mineraalse aine koguhulk (Bitton, 1994). MLSS on seotud tekkiva jääkmuda hulga; mida suurem on MLSS seda vähem tekib muda (Gray, 2004). Mudakoormus väljendab toitainete hulka mikroorganismide kohta ehk näitab orgaanilise aine koormust aktiivmudapuhastile. Madala mudakoormuse korral on toitaineid vähe, kuid mikroorganisme palju (Waterfacts). HRT on aeg, mille sissevoolanud vesi keskmiselt puhastusprotsessis veedab. HRT väärtus on oluline orgaanilise aine ärastamiseks ning nitrifikatsiooniks. SRT on mudahelbe viibeaeg bioloogilises töötuses (Bitton, 1994). Madal SRT viitab muda kiirele mikroorganismide kasvule ja kõrge SRT aeglasele kasvule (Gray, 2004). Lämmastikuärastuse efektiivseks toimimiseks rakendatakse muda vanust vähemalt 15 päeva. SVI näitab ühe grammi muda mahtu

milliliitrites peale 30-minutilist setitamist. Hea settivusega muda puhul on muda settivuse indeksi väärtus alla 100 (Envirolabs). C:N:P suhe näitab, kui palju on teineteise suhtes süsinikku, lämmastikku ja fosforit. Optimaalne C: N: P suhe on 100: 5: 1 (Gray, 2004). Juhul kui lämmastiku ja fosfori sisaldused on väga madalad, on vaja neid puhastusprotsessi juurde lisada.

### 1. 2. 1 Nitrifikatsioon

Nitrifikatsioon on kaheetapiline protsess, mille käigus oksüdeeritakse ammoonium ( $\text{NH}_4^+$ ) nitritiks ( $\text{NO}_2^-$ ) ja nitraadiks ( $\text{NO}_3^-$ ). Nitrifikatsioon toimub aeroobsetes tingimustes. Optimaalne pH vahemik on 8,0–9,0 (Henze jt., 1995). Nitritiks oksüdeerumise reaktsiooni nimetatakse nitritatsiooniks (valem 2) ja nitraadiks oksüdeerimist nitratatsiooniks (valem 3) (Nitrification). Mõlemaid protsesse viivad läbi kemolitoautotroofsed bakterid. Energia saadakse ammoniaagi ja nitriti oksüdeerimisest, süsinikuallikas on süsihappegaas ( $\text{CO}_2$ ) ning elektronakseptor on hapnik. Nitritatsiooni viivad läbi ammooniumi oksüdeerivad bakterid (AOB) – *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* ja *Nitrosolobus*. Selle protsessi käigus langeb pH (Henze jt., 1995). Nitratatsiooni viivad läbi nitritit oksüdeerivad bakterid (NOB) – *Nitrobakterid*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* ja *Nitrocystis* (Nitrification).



Ammooniumi ja nitriti oksüdeerimise madala energiasaagise tõttu kasvavad nitrifitseerivad bakterid aeglaselt. Nitrifitseerijate aeglane kasvukiirus muudab nitrifikatsiooniprotsessi tundlikuks. Nitrifikatsiooniprotsessi tundlikkus on ka peamine nitrifikatsiooniga seotud probleem reoveepuhastites (Henze jt., 1995).

Nitrifikatsiooni mõjutavad mitmed tegurid: substraadi kontsentratsioon, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, pH ja toksilised lisandid reovees. Nitrifikatsiooni toimumiseks peab lahustunud hapniku kontsentratsioon olema vähemalt 0,2–0,5 mg/l. Optimaalne temperatuurivahemik on 10°–22°C. Nitrifikatsiooni kiirus langeb, kui temperatuur tõuseb üle 35°C või langeb alla 10°C. Nitrifikatsiooni inhibeerivad raskmetallid, väävlühendid, aniliiniühendid, fenoolid ja tsüaniidid. Eriti tundlik on just nitritatsioon (Henze jt., 1995).

### 1. 2. 2 Denitrifikatsioon

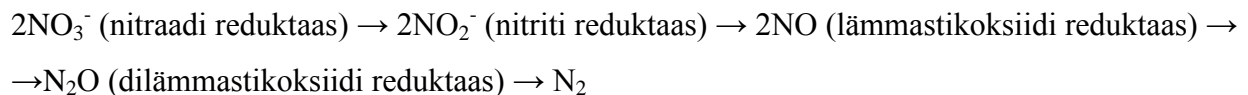
Denitrifikatsioon on bioloogiline nitraadi redutseerimise protsess, mille lõppsaaduseks on gaasiline lämmastik (valem 4). Selles protsessis on molekulaarse hapniku asemel elektoriakseptoriks nitraat. Seetõttu toimub denitrifikatsioon molekulaarse hapnikuta ehk anoksilises keskkonnas (Lin jt., 2009).



Denitrifikatsiooni protsessis osaleb palju erinevaid baktereid, kes suudavad elektronakseptorina kasutada hapniku asemel nitraati (Knowles, 1982). Denitrifitseerivad bakterid on biokeemiliselt ja taksonoomiliselt mitmekesine bakterite rühm. Enamus on heterotroofid, kuid leidub ka organotroofe, litotroofe, fototroofe (Knowles 1982; Lin jt., 2009). Denitrifitseerivad bakterid on levinud enamikes looduslikes keskkondades, k.a reovees ja aktiivmudas. Kõik denitrifitseerijad on võimelised ka aeroobselt hingama ning efektiivselt oksüdeerima orgaanilist ainet. Kuna aeroobsest hingamisest saab rohkem energiat, siis hapniku olemasolul pole denitrifikatsioon energeetiliselt mõistlik (Chen, Strous, 2013). Nende omaduste tõttu pole denitrifitseerijatele vaja luua erilist kasvukeskkonda (Lin jt. 2009).

Denitrifikatsioon toimub neljas etapis (valem 5):

1. Nitraadi redutseerimine nitritiks. Seda reaktsiooni läbi viivat ensüümi nimetatakse nitraadi reduktaasiks;
2. Nitriti redutseerimine lämmastikoksiidiks, mida viib läbi ensüüm nitriti reduktaas;
3. Lämmastikoksiidi redutseerimine dilämmastikoksiidiks, mida viib läbi ensüüm lämmastikoksiidi reduktaas;
4. Dilämmastikoksiidi redutseerimine gaasiliseks lämmastikuks, mida viib läbi dilämmastikoksiidi reduktaas.



(5)

Organismid, kes sisaldavad vähemalt kahte või kolme neist ensüümidest ja toodavad dilämmastikoksiidi või gaasilist lämmastikku nimetatakse denitrifitseerijateks.

Denitrifikatsioonil ja aeroobsel hingamisel on sama respiratsioonimehhanism. Sellest ka denitrifitseerivate bakterite võime aeroobselt hingata. Bakteri koosluste tekkimiseks kulub päevi kuni nädalaid. Sama saab öelda ka ensüümide eluea kohta. Seetõttu võib denitrifitseerivatel organismidel olla võimatu enda hingamisrada igakord uuesti üles ehitada, kui lahustunud hapniku kontsentratsioon keskkonnas suureneb/väheneb(Chen, Strous, 2013).

Lin jt.alusel peavad denitrifitseerivad bakterid vastama järgmisele nõuetele: a) vähemalt 80% redutseeritud nitraadist või nitritist muudetakse gaasiliseks lämmastikuks või lämmastikoksiidiks, b) denitrifitseerijate suurem kasvukiirus tagab nitraadi redutseerimise nitritiks või lämmastikoksiidiks See on peamine punkt, et organism denitrifitseerijaks liigitada, c) nitraadi kontsentratsioon peab vähenema ehk olema peamine metabolismi osa, d) mikroorganismi rakkudes peab olema tuvastatav tsütokroom cd või dissimilatoorne nitriti reduktaas. Tegemist ei tohi olla kõrvalreaktsiooniga (Lin jt., 2009).

### **Denitrifikatsiooni mõjutavad faktorid**

Denitrifikatsiooni mõjutavad lahustunud hapniku kontsentratsioon, orgaanilise aine kättesaadavus, nitraadi kontsentratsioon, pH väärtus ja inhibiitorite olemasolu keskkonnas.

Hapnik pärsib lämmastikoksiidi reduktaasi. Hapnik ei takista mitte ainult denitrifitseerivate ensüümide aktiivsust, vaid ka nende sünteesi. Isegi kui hapnik süsteemis ära tarbitakse, on reduktaas inhibeeritud veel 40 minutit kuni 3 tundi (McKenney jt., 1999).

Denitrifikatsiooni toimumiseks on vaja orgaanilist süsinikku, sest see varustab mikroorganisme vajaliku energiaga, olles reaktsioonis elektrondonor. Orgaanilise aine puudumine või selle vähene hulk inhibeerib denitrifikatsiooni. Selleks et oleks piisavalt orgaanilist ainet, toimub reoveepuhastis denitrifikatsioon enne orgaaniliste ainete eemaldamist (anoksiline keskkond on enne aeroobset) ning substraadi (ehk nitraadi) olemasolu tagatakse nitraadiringlusega aeroobsest etapist anoksilisse ( Mihelcic, Luthy, 1988).

Denitrifikatsiooniks sobilik pH vahemik on 7,0– 8,0. Madal pH inhibeerib esmalt dilämmastikoksiidi reduktaas ning edasise langusega ka teised ensüümid, põhjustades seega denitrifikatsiooni efektiivsuse languse. Kui kõik muud tingimused denitrifikatsiooniks on

tagatud, aga pH on liiga madal, siis denitrifikatsiooni ei toimu (Knowles, 1982). Kõrge pH väärtus põhjustab nitriti akumulatsiooni (Glass, Silverstein, 1998).

Denitrifikatsiooni reduktaasid on inhibiitorite suhtes tundlikud. Väävel inhibeerib dilämmastikoksiidi reduktaasi ning seda seostatakse N<sub>2</sub>O kuhjumisega väävlirikastes meresetetes (Knowles, 1982).

### **1. 3 Ökotoksikoloogilised testid**

On olemas mitmeid meetodikaid, millega hinnata reo- või heitvee mõju keskkonnale. Sageli kasutatakse selleks erinevaid indikaatororganisme, kellest levinuimad on *Daphnia magna* ja *Pseudomonas putida*.

*Daphnia magna* on väike planktiline koorikloom, kes elab puhta veega keskkondades. Seda liiki on hea ökotoksikoloogilistes testide kasutada, sest ta paistab läbi ning tema sisemust saab mikroskoobi abil näha (Animal Diversity Web). *Daphnia magnaga* tehakse kahte erinevat testi. Number 202 on akuutse immobilisatsioon test, kus indikaatororganismidele lisatakse kasvukeskkonda erinevas kontsentratsioonis uuritavad reovett või spetsiifilist saasteainet. Määratakse kontsentratsioon, mille puhul 50% indikaatororganismidest hukuvad (IC<sub>50</sub>). Numbriga 211 tähistatakse kroonilise toksilisuse testi, mille lõpus loendatakse, kui palju järglasi tekib ühe organismi kohta. Nii saab määrata madalaima saasteainete kontsentratsiooni, mis põhjustab negatiivse efekti (OECD guideline).

*Pseudomonas putida* on pinnases ja veekogudes levinud bakter, kellega tehakse kasvuinhibitsiooni testi. Tegemist on heterotroofse mikroorganismiga, kes elab puhtas vees. ISO nimekirjas kannab see test numbrit 10712. Seda saab kasutada pinnase-, põhja- ja reovee uuringutes (ISO 10712:1995).

Olemas on ka mitmed standardmeetodikad, et hinnata reovee mõju aktiivmudaprotsessidele. Neist enimkasutatud on Zahn-Wellensi biolagundatavuse test, hapnikutarbe inhibeerimise test ja nitrifikatsiooni inhibeerimise test.

Zahn-Wellensi meetodikat kasutatakse, et hinnata reovees sisalduva orgaanilise aine biolagundatavust aktiivmudaprotsessis (ISO 9888). Testis lisatakse proovinõusse aktiivmuda ja uuritav reovesi ning aereeritakse pidevalt 28 päeva jooksul. Testi alguses, vahepeal ja

lõpusmõõdetakse orgaanilise aine sisaldust. Orgaanilise aine kontsentratsioon määratakse kas lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC- *dissolved organic carbon*) või keemilise hapnikutarbe järgi (KHT). Selle testiga hinnatakse, millisel määral on võimalik aktiivmudaprotsessiga reoveest ärastada orgaanilist ainet (ISO 9888:1999).

Nitrifikatsiooni inhibeerimise testiga (ISO 9509) mõõdetakse reovee või uuritava saasteaine mõju aktiivmuda nitrifikatsioonikiirusele. Katses lisatakse aktiivmudale erinevas kontsentratsioonis uuritavat reovett või saasteainet ning mõõdetakse ammoniumi nitraadiks oksüdeerimise kiiruseid kolme tunni jooksul. Katsetulemustest on võimalik anda hinnang, kas uuritav reovesi mõjutab nitrifikatsiooniprotsesside efektiivsust või mitte (ISO 9509:2006).

Hapnikutarbe inhibeerimise test (ISO 8192) on meetod, millega mõõdetakse reovee või uuritava saasteaine mõju aktiivmudas elavate mikroorganismide hapnikutarbele. Testiga saab hinnata, millisel määral mõjutab uuritav reovesi või saasteaine aktiivmudapuhastis aeroobseid protsesse, eriti orgaanilise aine eemaldamist (ISO 8192:2007).

Reovee või uuritava saasteaine mõju denitrifikatsioonile saab määrata atsetüleenmeetodiga. Atsetüleen inhibeerib denitrifikatsiooni viimase reduktaasi ehk dilämmastikoksiidi reduktaasining protsessi lõpp-produkt on  $N_2O$ . Mõõdetakse  $N_2O$  teket protsessis kuue tunni vältel. Metoodika puuduseks on see, et vajalik on gaaskromatograafi olemasolu, mistõttu ei ole see alati kergesti rakendatav. Gaaskromatograaf on kallis seade, mis ei ole kättesaadav igale laborile. Lisaks on reoveepuhastitele oluline just väljavoolu jääva nitraadi kontsentratsioon, mistõttu on selle väärtuse järgi inhibitsiooni väljendamine mõnikord rohkem põhjendatud (Daum, Schenk, 1997; Milenkovski, 2010).

#### **1. 4 Metoodika usaldusväärsuse kontrollimine**

Metoodika usaldusväärsuse kontrollimiseks kasutatakse metoodika valideerimist. Metoodikavalideerimine on protsess, mille eesmärk on välja selgitada, kas metoodika vastab eesmärgile, s.t kas ta kõlbab analüüsiks, milleks teda soovitatakse kasutada. Metoodika kõlblikkuse kriteerium on vastavus konkreetse analüüsi jaoks esitatud nõuetele. Nõudeid võivad esitada näiteks labori klient või seadusandlik akt, millele vastavust analüüdiga kontrollitakse. Sageli on nõuded ka korduvusele ja korratavusele ning enamasti defineeritakse nõuetega ka rakendusala ( analüüt, maatriks, sisalduse piirid). Valideerimise käigus määratakse metoodika

karakteristikud ja piirangud ning selgitatakse millised mõjurid ja millisel määral võivad neid muuta. Valideerimine võimaldab demonstreerida, kas meetodikaga saadud tulemused on usaldusväärsed ja kas meetodika on sobiv antud analüüsiks. Valideerimise andmetele tuginedes saab meetodikat parendada: leida võimalikud veaallikad ja need elimineerida. Valideerimiseks kasutatakse mitmeid vahendeid. Valideerimise käigus määratakse vastavalt esitatavatele nõuetel erinevad parameetrid: selektiivsus, rakendusala, avastamis- ja määramispiir, lineaarne ala ja meetodika tõesus. Iga testi puhul ei määrata ilmtingimata kõiki parameetreid (Leito, Viitak, 2007).

Üks enimkasutatud meetod määramatuse hindamiseks on Nordtest. Nordtesti laialdane kasutamine põhineb tema lihtsusel. Lihtsus seisneb selles, et määramatuse hindamisel saab kasutada igapäevase kvaliteedikontrolli tulemusena saadud andmeid, eeskätt kontrollkaarte ja võrdlusmõõtmiste tulemusi. Kontrollkaardi ehk X-kaardi puhul vaadeldakse mõõdetud analüüsi sisalduse kokkulangevust ning selle koostamisel eeldatakse, et 99% punktidest jääb vahemikku  $\pm 3$  standardhälvet ehk kontrolltsooni. Tulemused mis jäävad vahemikku  $\pm 1$  standardhälvet ehk kesktsooni on usaldusväärsemad.  $\pm 2$  standardhälbe piiridesse e häiretsooni langevad tulemused ei ole enam nii usaldusväärsed, tuleb leida viga ning see likvideerida. Kontrolltsooni langevad tulemused on ebausaldusväärsed ning proov tuleb uuesti võtta. Viga tuleb otsida ka siis, kui mitu punkti järjest langevad häire- või kontrolltsooni. See näitab, et midagi on valesti, eriti tähelepanelik tuleb olla, kui tulemused hakkavad kasvavalt kuhugi poole triivima (Leito, Viitak, 2007; NT Technical Report).

Nordtest meetodi määramatuse allikad on jaotatud juhuslikeks ning süstemaatilisteks. Juhuslike vigade tõttu ei saada samas laboris erinevatel päevadel täielikult kokkulangevaid tulemusi. Süstemaatilise hälbe tõttu saadakse referentsväärtusest süstemaatiliselt madalamad või kõrgemad väärtused. Samuti võib olla, et tulemused saadakse kord madalamad, kord kõrgemad (ehk tulemused ei hälbi kindlas suunas).

Nordtesti määramatuse hindamine koosneb mitmetest etappidest. Nordtesti rakendaval laboriltekitavad andmed määramatuse hindamiseks automaatselt igapäevase töö käigus ja lisaks pole vaja uuringuid teha. Teiseks eeliseks on määramatuse allikate (nt proovi ettevalmistamisest tulenev määramatus) automaatne arvesse võtmine kui kasutatavad andmed hõlmavad kõiki

analüüsi etappe. Sel juhul on määramatuse hinnangud väga realistlikud (Leito, Viitak, 2007; NT Technical Report).



## 2 Eksperimentaalne osa

### 2. 1 Katse kirjeldus

Katseid teostati ajavahemikus 26.11.2015- 24.02.2016 Tartu Ülikooli Keskkonnatehnoloogia ja Keskkonnanalüüsi laborites. Katsete tegemiseks kasutati olmereoveepuhasti aktiivmuda, mis ei olnud enne katse algust laboris seisnud kauem kui kaks päeva. Tulemuste töötlemiseks kasutati programmi MS Excel. Arvutati juhuslikku viga iseloomustavad parameetrid, mis sisalduvad Nordtesti meetodis. Süstemaatilist viga arvutustesse ei kaasatud, sest puudub mudelaine, mille inhibeeriv mõju denitrifikatsioonile oleks täpselt teada.

#### 1. Toitelahuse ettevalmistamine:

- Aktiivmuda pesti 1-liitrilises mõõtsilindris kraaniveega läbi, vajadusel kontsentreeriti või lahjendati aktiivmudasuspensiooni, milleruumala silindris oli peale pesemist 300-400 ml.
- Samasse silindrisse lisati:
  - Fosfaatpuhver – 1 ml
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 1ml
  - $CaCl_2 \cdot 7H_2O$  – 1ml
  - $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  – 1ml
  - Aluselised mikroelemendid – 2ml
  - Happelised mikroelemendid – 2 ml
  - $NaHCO_3$  (5,04 g/500ml) – 50ml
- Mõõtsilinder täideti kraaniveega 500 ml-ni.
- Toitelahuse kohastumine anoksilistele tingimustele (0,1-0,2 mgO<sub>2</sub>/l).
  - deaereeriti muda gaasilise lämmastikuga 20-30 minutit, misjärel suleti analüüsipudel õhukindlalt.
  - Adaptatsiooniperioodi kestis 1-2 tundi.

## 2. Katsepudelite ettevalmistamine

Katseseeriate läbiviimiseks kasutati seitset 250 ml proovipudelit, millest igaüks sisaldas nitraati, naatriumatsetaati ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), erinevas kontsentratsioonis mudelainet (3, 5- diklorofenooli), destilleeritud vett ning toitelahust (tabel 1). Proovipudelitesse juhiti katse alguses ja peale iga proovivõttu lämmastikku, et tagada anoksiline keskkond. Proovid võeti alghetkel, 1. tunnil ja 3.tunnil ning määrati nitraatlämmastiku kontsentratsioon. Lisaks määrati katse MLSS ning pH katse alguses ja lõpus. Katsete keskmine MLSS oli 1,74 g/l.

Tabel 1- Proovipudelitesse lisatud lahused ja nende hulgad

Reovee osakaal	Inhibiitori kontsentratsioon (mg/L)	$\text{NO}_3\text{-N}$ lahus (ml)	Na-atsetaat (ml)	Dest. vesi (ml)	Toksikant (ml)	Toitelahus (ml)
0%	0	15	25	160	0	50
0,25%	2,5	15	25	~159	0,625	50
0,5 %	3	15	25	~159	1,25	50
0,75%	5	15	25	~158	1,875	50
1%	10	15	25	157,5	2,5	50
3%	30	15	25	152,5	7,5	50
5%	50	15	25	147,5	12,5	50

## 2.2 Metoodika

Katse käigus määrati denitrifikatsiooni inhibitsioonikiiruse sõltuvus erinevast 3,5-diklorofenooli kontsentratsioonist proovides.

Tabel 2- Kasutatud meetodite loetelu, vastavad standardid ja kasutatud aparatuur

Parameeter	Meetod	Kasutatud aparatuur
NO <sub>3</sub> -N*	Ioonkromatograafiline määramine	Ioonkromatograaf: Metrohm 930 Compact IC Flex; kolonn: METROSEP A Supp 5 100/0,4;
NO <sub>3</sub> -N	SFS 5752 – kolorimeetriline määramine naatriumsalitsülaadi ja väävelhappega	Spektrofotomeeter: Hach Lange DR 2800
pH	Potentsiomeetriline määramine	pH meeter: Hach Sension 1
MLSS	Gravimeetriline määramine	Kaal: Scaltech SBC 31; kuivatuskapp: SNOL 67/350, Leedu

\*Ühe paralleelkatse puhul määrati nitraadi sisaldus ioonkromatograafia.

Kasutatud arvutusvalemid:

### Denitrifikatsiooni kiirus

$$V = \frac{(c_0 - c) * \Delta t}{MLSS}$$

V – denitrifikatsiooni kiirus (mg NO<sub>3</sub>-N/gMLSS\*h)

c<sub>0</sub> – NO<sub>3</sub>-N kontsentratsioon alghetkel (mg/l)

c – NO<sub>3</sub>-N kontsentratsioon uuritava ajahetkel (mg/l)

$\Delta t$  – katse kestus (h)

MLSS – muda kuivaine sisaldus (g/l)

### **Inhibeerimine**

$$I = \frac{v - v_x}{v_0} * 100\%$$

I – denitrifikatsiooni inhibeerimine (%)

$v_0$  – denitrifikatsiooni kiirus nullproovil (mg NO<sub>3</sub>-N/gMLSS\*h)

$v_x$  – denitrifikatsiooni kiirus uuritava toksikandi kontsentratsioonil (mg NO<sub>3</sub>-N/gMLSS\*h)

### **MLSS**

$$MLSS = \frac{m * 1000}{V}$$

MLSS- muda kuivaine sisaldus(g/l)

m- kuivatatud muda kaalutis (g)

V- võetud proovi ruumala (ml)

### **Absoluutne standardhälve**

$$s(y) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{keskmise})^2}{n - 1}}$$

s(y) – absoluutne standardhälve (mg/l)

$y_i$  – i-nda mõõtmise tulemus (mg/l)

$y_{\text{keskmine}}$  – mõõtmistulemuste aritmeetiline keskmine (mg/l)

$n$  – mõõtmiste arv

### **Standardmääramatus katteteguriga kaks (e laiendmääramatus)**

$$U(y) = 2 * s(y)$$

$U(y)$  – standardmääramatus katteteguriga 2 (mg/l)

$s(y)$  – absoluutne standardhälve (mg/l)

### **Suhteline kogutud standardhälve**

$$u = \sqrt{\frac{\left(\frac{s(y)*100}{y_{\text{keskmine}}}\right)^2 * (n-1)}{(n-1)}}$$

$u$  – suhteline kogutud standardhälve (%)

$s(y)$  – absoluutne standardhälve (mg/l)

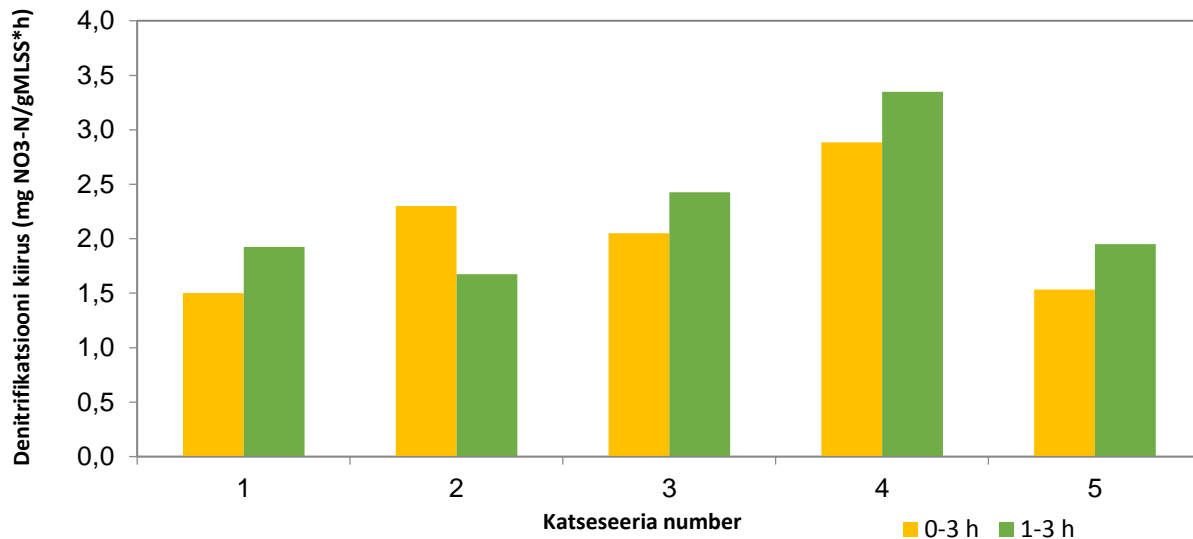
$y_{\text{keskmine}}$  – mõõtmistulemuste aritmeetiline keskmine (mg/l)

$n$  – paralleelkatsete arv

### 3 Tulemused

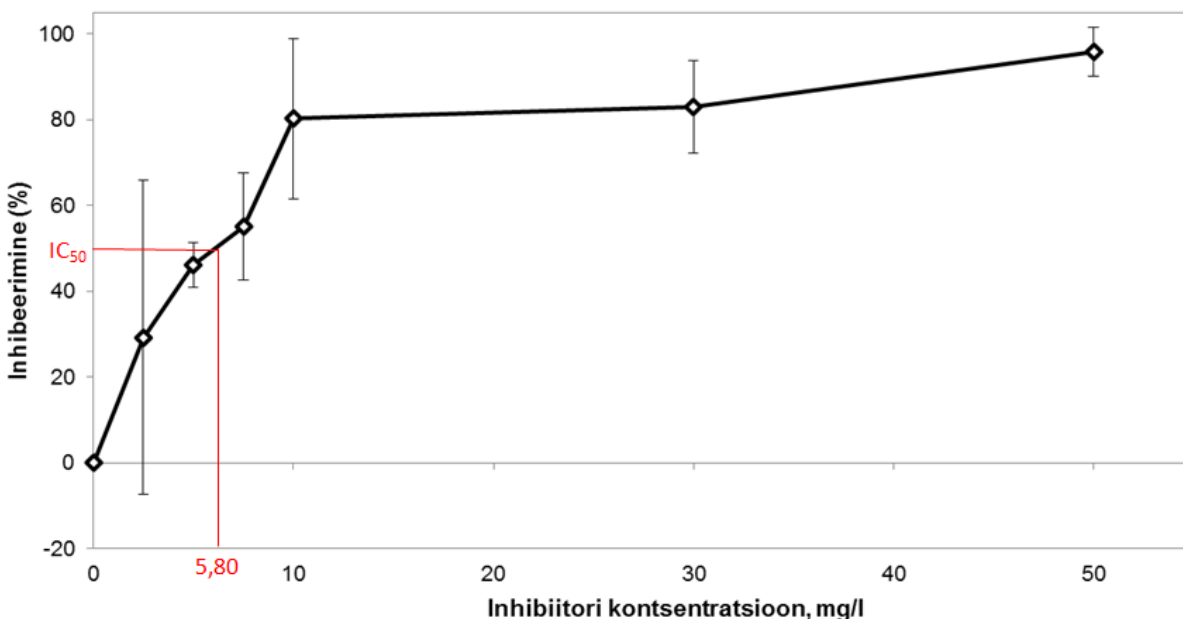
Denitrifikatsiooni inhibeerimise määr arvutatakse vastavalt sellele, kui palju väheneb denitrifikatsiooni kiirus kindla kontsentratsiooni uuritava aine korral. Joonisel 1 on toodud viie paralleelkatse nullproovide denitrifikatsiooni kiirused, mis on arvutatud alghetkest katse lõpuni (0-3h) ja esimesest tunnist katse lõpuni (1-3h). Nullproovid on proovid, kuhu ei lisatud 3,5-diklorofenooli ehk denitrifikatsiooni kiirust ei mõjutatud.

Alghetkest kuni 3. tunnini mõõdetud denitrifikatsiooni kiirused on samaväärsed või natukene madalamad (v.a 2. katseeria puhul), keskmine denitrifikatsiooni kiirus oli 2,1 mg NO<sub>3</sub>-N/gMLSS×h. 1.–3. tunnil toimus denitrifikatsioon natukene kiiremini, keskmine kiirus oli 2,3 mg NO<sub>3</sub>-N/gMLSS×h. Nullproovide denitrifikatsiooni kiirused on 1.–3.tunnil on suuremad tõenäoliselt seetõttu, et esimesel tunnil mikroorganismid veel kohastuvad. Kohastumisperioodi kasutatakse ka nitrifikatsiooni inhibeerimise testi tulemuste esitamisel (ISO 9509). Sellest tulenevalt on bakalaureusetöös inhibeerimise väärtused arvutatud 1. –3. tunni. Joonisel 1 on ka näha, et nullproovide denitrifikatsiooni kiirused erinesid ligikaudu 2 korda. Nullproovi väga madala efektiivsuse korral võime inhibeerivat toimet üle hinnata.



Joonis 1. Viie paralleelkatsedenitrifikatsiooni kiirused alghetkest katse lõpuni (0-3h) ja esimesest tunnist katse lõpuni (1-3h)

Uuritava saasteaine mõju reoveepuhastusprotsessi efektiivsusele väljendatakse sageli inhibitsioonikõveraga. Joonisel 2 on toodud denitrifikatsiooni inhibeerimise kõver 3,5-diklorofenooli kontsentratsioonidel kuni 50 mg/l. Inhibiitori kontsentratsioonil 2,5 mg/l on saadud suured veapiirid. Keskmise 3,5-diklorofenooli kontsentratsioon, mis inhibeeris 50% denitrifikatsioonikiirusest ( $IC_{50}$ ) oli 5,8 mg/l. Olulist muutust denitrifikatsiooni kiiruses on märgata kuni 10 mg/l, millest alates protsessi kiiruse vähenemine aeglustus oluliselt.



Joonis 2. Inhibitsiooni väärtused erinevatel 3,5-diklorofenooli kontsentratsioonidel

Teostatud denitrifikatsiooni inhibeerimise testi tulemuste kokkulangevust võrreldi nitrifikatsiooni inhibeerimise testi (ISO 9509) ja hapnikutarbe inhibeerimise testi (ISO 8192) standardites olevate vastavate väärtustega (tabel 3). Tulemusi saab omavahel võrrelda, sest kõigis kolmes inhibeerimise testis on kasutatud mudelainena 3,5- diklorofenooli.

Esimene parameeter mille alusel kolme inhibeerimise testi võrreldi, on keskmine 3,5-diklorofenooli kontsentratsioon, mis inhibeeris 50% denitrifikatsioonikiirusest ( $IC_{50}$ ). Keskmise  $IC_{50}$ väärtuste leidmisel eeldati kirjandusele tuginedes, et kõige tundlikum on saasteaine sisaldusele nitrifikatsioon ning denitrifikatsiooniprotsessi pärsib mürkaine sisaldus reoveses vähem (Liu, jt., 2013). Tabelis 3 on aga näha, et denitrifikatsiooni ja nitrifikatsiooni inhibeerimise testides on  $IC_{50}$ väärtused väga sarnased. Denitrifikatsiooni testis oli keskmine

väärtus 5,8 mg/l ja nitrifikatsiooni inhibeerimise puhul 5,6 mg/l. Nende tulemuste sarnasuse põhjal saab järeldada, et ka denitrifitseerivad bakterid võivad kindlate saasteainete suhtes olla väga tundlikud. Tulemusest ei saa aga järeldada, et reoveepuhastis toimuv denitrifikatsiooniprotsess on reoainetele sama tundlik kui nitrifikatsioon. Nitrifitseerivate mikroorganismidel on oluliselt madalam kasvukiirus kui denitrifitseerijatel. Seetõttu talub reaalses olukorras denitrifikatsiooniprotsess ohtlikke ühendeid enam kui nitrifikatsioon. Samal ajal on aga denitrifikatsiooniprotsess enne nitrifikatsiooni, mistõttu on seal saasteainete sisaldused alati kõrgemad.

Ootuspäraselt oli kõrgeim  $IC_{50}$  väärtus hapnikutarbe inhibeerimise testis – 9,8 mg/l. Heterotroofsed hapniku tarbivad mikroorganismid taluvad kõrgemat inhibiitori kontsentratsiooni reovees.

Teise parameetrina on võrreldud standardhälvet. Inhibeerimistestide standardhälbed erinevad teineteisest suurel määral. Denitrifikatsiooni inhibeerimistesti standardhälve on 0,8 mg/l, nitrifikatsiooni inhibeerimise standardhälve on 3,0 mg/l ja hapnikutarbe standardhälve 6,5 mg/l. Tulemused varieeruvad suurtes piirides, kui katseid teostatakse erineva aktiivmudaga, erinevates laborites ja erinevate inimeste poolt. Nitrifikatsiooni ja hapnikutarbe inhibeerimise teste on läbiviidud vastavalt kümnes ja viieteistkümnes erinevas laboris. Kuna Tartu Ülikooli Keskkonnanalüüsi labor on ainus, kus teostatakse aktiivmudal baseeruvaid inhibeerimise teste, on denitrifikatsiooni inhibeerimise testi katsed sooritatud ühes laboris ning ühe inimese poolt (ei viidud läbi laboritevahelisi võrdluskatseid). Ühes laboris ja ühe inimese poolt läbiviidud testide tulemused on sarnasemad kui erinevate laborite ja testide sooritajate puhul.

Standardmääramatus näitab normaaljaotusele alluvate suuruste korral tulemuste õigsust 68% tõenäosusega. Määramatuse usaldusnivoo suurendamiseks korrutatakse standardmääramatus katteteguriga ning saadakse laiendmääramatus. Antud töös võeti katteteguriks kaks, et saada mõõtetulemus usaldatavusega 95,4%. Denitrifikatsiooni absoluutne standardhälve on 0,80 mg/l ehk standardmääramatus katteteguriga kaks on vahemikus 4,2 – 7,4. Hapnikutarbe inhibeerimistesti  $IC_{50}$  jääb katteteguriga kaks vahemikku 1,9 – 16,7. Võrreldes denitrifikatsiooni ja hapnikutarbe inhibitsiooni testidega on näha, et hapnikutarbe inhibeerimise testi vahemik on palju suurem. See on seotud absoluutse standardhälbe suurusega, mis on hapnikutarbe inhibitsioonitestil suurem.



Suhtelist kogutud standardhälvet võrreli denitrifikatsiooni ja nitrifikatsiooni inhibeerimise testide puhul. Denitrifikatsiooni suhteline kogutud standardhälve on 13,8% ning nitrifikatsioonil 54%. Nitrifikatsiooni testi suhteline kogutud standardhälve on oluliselt suurem kui denitrifikatsioonil.

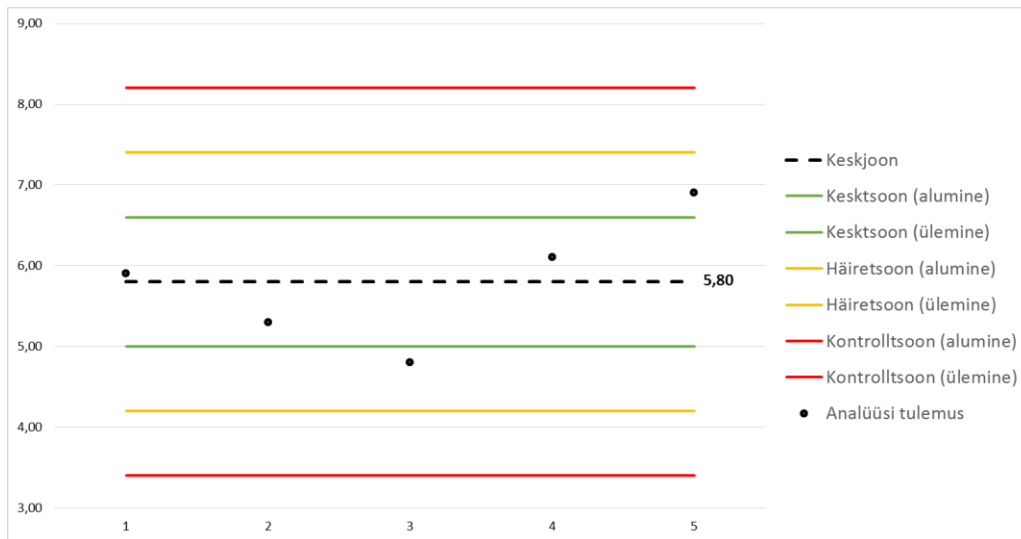
Tabel 3 - Denitrifikatsiooni, nitrifikatsiooni ja hapnikutarbe inhibeerimise testide statistiliste karakteristikute võrdlus

Parameeter	Denitrifikatsiooni inhibeerimine	Nitrifikatsiooni inhibeerimine	Hapnikutarbe inhibeerimine
<b>Keskmine EC<sub>50</sub> (mg/l)</b>	5,8	5,6	9,3
<b>Absoluutne standardhälve (mg/l)</b>	0,8	3,0	3,7
<b>Standardmääramatus katteteguriga kaks (mg/l)</b>	4,2...7,4	Pole arvatud	1,9...16,7
<b>Suhteline kogutud standardhälve (%)</b>	13,8	54	Pole arvatud
<b>Laborite arv</b>	1	10	15

Madalamad veapiirid denitrifikatsiooni inhibeerimise testis ei ole tingitud sellest, et antud meetodika oleks oluliselt parem kui varem väljatöötatud standardiseeritud meetodikad. Denitrifikatsiooni testi teostati vaid ühes laboris, ühe inimese poolt ja ühest reoveepuhastist pärineva aktiivmudaga. Kõik need asjaolud vähendavad oluliselt juhusliku vea suurust.

Kuigi tavapäraselt tehakse X-kontrollkaardid meetodikatele, kus on paralleelmõõtmisi 10-50, siis denitrifikatsiooni inhibeerimise meetodikale tehti X-kaart kasutades viite paralleelmõõtmist. Paralleelmõõtmisi tehti viis, sest denitrifikatsiooni inhibeerimise test on küllaltki tömahukas. X-kaardile kantakse edaspidi laboris perioodiliselt tehtud kontrollmõõtmisi, et hinnata tulemuste

usaldusväarsust. Graafikut 3 vaadates on näha, et 5-st tulemusest 3 ( 1., 2. ja 4.) jäävad kesktsooni ehk  $\pm 1$  standardhälbe piiridesse, sellisel juhul on tulemused usaldusväarsed ning korrigeerivad meetmed puuduvad. 3. ja 5. mõõtmise tulemused langevad häiretsooni, mille puhul tuleb kindlaks teha, kus peitub viga ning see likvideerida. Antud juhul on aga tulemuste arv liiga väike, et selliseid järeldusi teha.



Joonis 4. X-tüüpi kontrollkaart

## Kokkuvõte

Käesolev töö keskendub denitrifikatsiooni inhibeerimise testi meetodika usaldusväärsuse kontrollimisele. Denitrifikatsioon testi meetodika töötati välja Tartu Ülikooli Keskkonnaanalüüsi laboris. Välja töötatud testiga saab hinnata reovee või reovees sisalduvate saasteainete mõju denitrifikatsiooniprotsessi kiirusele. Denitrifikatsioon on bioloogiline lämmastikuärastuse protsess, mille käigus redutseeritakse nitraat molekulaarseks lämmastikuks. Tegemist on ühe osaga aktiivmudaprotsessist ning lämmastiku efektiivseks ärastamiseks on selle toimimine vajalik. Välja töötatud meetodika teeb eriliseks selle kiiresti rakendatavus ning odav hind. Denitrifikatsioonikiiruse inhibeerimiseks kasutati mudelainena 3,5-diklorofenooli. 3,5-diklorofenool on tuntud mürkaine, mida kasutatakse ka teistes inhibeerimise testides.

Metoodika rakendamisel saadud tulemuste õigsust kontrolliti koostatud Nordtest meetodil. Selleks koostati X-kaart. X- kaart ehk kontrollkaart võimaldab standardhälbeid kasutada hinnata, kas saadud tulemused on usaldusväärsed. Usaldusväärsuse hindamiseks jaotatakse X- kaardi osad standardhälbeid kasutades erinevateks tsoonideks. Välja töötatud denitrifikatsiooni testi tulemuste usaldusväärsuskontrolliti ka arvutatud  $IC_{50}$  keskväärtuse, standardhälbe, standardmääramatuse ja suhtelise kogutud standardhälbe abil. Lisaks arvutatud statistilistele karakteristikutele võrreldi ka laborite arvu, kus Saadud statistilisi karakteristikuid võrreldi nitrifikatsiooni ja hapnikutarbe ISO standardite vastavate väärtustega.

Välja töötatud meetodikat saab usaldusväärseks pidada, sest denitrifikatsiooni inhibeerimise testi ning ISO standardite nitrifikatsiooni ning hapnikutarbe inhibeerimise testi tulemuste kokkulangevuse tõttu. Meetodika usaldusväärsust näitab ka Nordtest meetodil koostatud X- kaart.

Välja töötatud meetodika valideerimiseks tuleks sooritada veel denitrifikatsioonikiiruse inhibeerimise katsed, et suurendada paralleelkatsete arvu. Suurema arvu paralleelkatsete korral on tulemused usaldusväärsemad.

## Summary

This paper focuses on controlling the reliability of denitrification inhibition test. Denitrification test was developed in the laboratory of Environmental Analysis of the University of Tartu. The test permits to evaluate the influence of waste water or toxic substances on denitrification rate. Denitrification is a biological process of nitrogen removal, where nitrate is reduced to molecular nitrogen. Denitrification is part of activated sludge process and its effective operation is an important part of nitrogen removal. The invented test is easily applicable and inexpensive. 3,5-dichlorophenol was used as a model chemical. It is a well-known toxic substance that is used in other inhibitory tests as well.

The accuracy of the test was controlled by using Nordtest method. A X-card was composed. X-card (control card) enables to evaluate whether the results are reliable. X-card is divided into three different zones by using standard deviation. The reliability of denitrification test was controlled by calculating the average of  $IC_{50}$ , standard deviation, 95,4 % confidence interval of the mean  $IC_{50}$  and coefficient of variation. The statistical characteristics of denitrification were compared with ISO standards results of nitrification and oxygen uptake rate inhibition tests.

Developed denitrification test can be regarded reliable because of the concurrence with nitrification and oxygen demand test results. Reliability can also be seen in the X-card of Nordtest.

To validate the denitrification inhibition method more tests should be made, to enlarge the amount of parallel tests. The results are more trustworthy with larger amount of parallel tests.

## Kasutatud kirjanduse loetelu

### Artikkel ajakirjas

J. L. Barnard, P. G. J, 1988, Dissolved oxygen control in the activated sludge process in: *Water Science and Technology* 20 (4/5), pp 93-100.

G. F. Bennett, 1989, Impact of toxic chemicals on local wastewater treatment plant and the environment, *Environmental Geology and Water Sciences*, Vol. 13, Issue 3, pp 201-212.

D. Brown, J. Kulis, B. Thomson, T. H. Chapman, D. B. Mawhinney, 2006, Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico Kathryn, Vol. 366, issues 2-3, pp. 772-783. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.10.007.

A. G. Calley, C.F. Forster, D.A. Stafford, 1977, *Treatment of Industrial Effluents*, Hodder and Stoughton, London.

J. Chudoba, 1989, Activated sludge-Bulking control, *Encyclopedia of Environmental Control Technology*, Vol. 3, *Wastewater Treatment Technology*, P.N. Cheremisinoff, Ed. Gulf Publishing Co., Houston, TX, pp. 171-202.

P. Chudoba, R. Pujol, 1996, Activated sludge plant facing grape harvest period- A case of study. *Water Science and Technology*, Vol. 34, issue 11, pp.25-32, doi:10.1016/S0273-1223(96)00817-7.

J. Chen, M. Strous, 2013, Biochimica et Biophysica Acta Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution, *BBA-Bioenergetics*, Vol. 1827, issue 2. pp 136-144.

M. Cirja, P. Ivashechkin, A. Schäffer, P. F. X. Corvini, 2007, Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR), *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, Vol. 7, Issue 1, pp.61-78.

D. Daum, M. K. Schenk, 1997, Evaluation of the acetylene inhibition method for measuring denitrification in soilless plant culture systems, *Biology and Fertility of Soils*, Vol. 24, issue 1, pp. 111-117.

- C. Glass, J. Silverstein, 1998, Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrate accumulation, *Water Research*, Vol. 32, Issues 3, doi:10.1016/S0043-1354(97)00260-1.
- A. Hussain, 1, S. K. Dubeyb, V. Kumarc, 2015, Kinetic study for aerobic treatment of phenolic wastewater, Vol. 11, pp. 81–90, doi:10.1016/j.wri.2015.05.002.
- R. Knowles, 1982, Denitrification, *Microbiological reviews*, Vol. 46, issue 1, pp 43-70.
- S. J. Kulkarni, Dr. J. P. Kaware, 2013, Review on Research for Removal of Phenol from Wastewater, *International Journal of Scientific and Research Publications*, Vol. 3, Issue 4.
- V. H Lewin, J. R Henley, 1972, Diffused air supersedes mechanical surface aeration at Oxford in: *Effluent and Wastewater Treatment Journal* 18, pp. 163-165.
- Y. Lin, J. Tay, Y. Liu et al 2009, Biological Nitrification and Denitrification Processes in: *Handbook of Environmental Engineering*, Vol. 8 pp. 539-588.
- C. Liu, K. Wang, X. Zheng, 2013, Effects of nitrification inhibitors (DCD and DMPP) on nitrous oxide emission, crop yield and nitrogen uptake in a wheat- maize cropping system, *Biogeosciences*.
- D. J. McKenney, C. F. Drury,\* and S. W. Wang, 1999, Effects of Oxygen on Denitrification Inhibition, Repression, and, Derepression in Soil Columns, *Soil Science Society of America*.
- J. R. Mihelcic, R. G. Luthy, 1988, Microbial Degradation of Acenaphthene and Naphthalene Under Denitrification Conditions in Soil-Water Systems, *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 1188-1198.
- Milenkovski S, Bååth E, Lindgren PE, Berglund O (2010) Toxicity of fungicides to natural bacterial communities in wetland water and sediment measured using leucine incorporation and potential denitrification. *Ecotoxicology* 19:285–294. doi: 10.1007/s10646-009- 0411-5.
- N. Nakada, T. Tanishima, H. Shinohara, K. Kiri, H. Takada, 2006, Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment, Vol 40, Issue 17, pp.3297-3303, doi:10.1016/j.watres.2006.06.039.

G.Ramanathan, C.Sales, W.Shieh, 2014. Simultaneous autotrophic denitrification and nitrification in a low-oxygen reaction environment in: Water Science & Technology volume 70, issue 4.

A. Sathasivan, 2003, Biological Phosphorus Removal Processes for Wastewater Treatment, Water and Wastewater Treatment Technologies.

C. E. Scruggs, C. W. Randall, 1998, Evaluation of filamentous microorganism growth factors in an industrial wastewater activated sludge system, Water Science and Technology, Vol. 37, issues 4-5, pp. 263-270.

N.K. Srivastava, C.B. Majumder, 2008 Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater, Vol 151, Issue 1, pp. 1-8 doi:10.1016/j.jhazmat.2007.09.101.

C. Wang, X. Hu, M. Chen, Y. Wu, 2005, Total concentrations and fractions of Cd, Cr, Pb, Cu, Ni and Zn in sewage sludge from municipal and industrial wastewater treatment plants, Vol. 119, Issues 1-3, pp. 224-245, doi:10.1016/j.jhazmat.2004.11.023.

X. Zheng, P. Sun, J. Han, Y. Song, Z. Hu, H. Fan, S. Lv, 2014, Inhibitory factors affecting the process of enhanced biological phosphorus removal (EBPR), Vol.49, Issue 12, pp.2207-2213, doi:10.1016/j.procbio.2014.10.008.

## **Materjalid internetist ja standardid**

Animal Diversity Web– Daphnia Magna

[http://animaldiversity.org/accounts/Daphnia\\_magna/](http://animaldiversity.org/accounts/Daphnia_magna/), viimati külastatud 14.05.2016.

Biological phenol degradation

<http://www.novozymes.com/en/solutions/wastewater-solutions/applications/Biological-phenol-degradation-wastewater-treatment/Pages/default.aspx>, viimati külastatud 14.05.2016.

Eesti standard EVS-EN ISO 9509:2006 Vee kvaliteet. Meetod kemikaalide ja heitvee pidurdava toime hindamiseks aktiivmudas mikroorganismidest põhjustatud nitritiseerimisele.

Envirolabs LTD. HOKLAS laboratory

<http://www.envirolabs.com.hk/services.php?catid=9&id=6>, viimati külastatud 14.05.2016.

ISO 10712:1995 Water quality Pseudomonas putida growth inhibition test (Pseudomonas cell multiplication inhibition test)

[http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=18800](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=18800), viimati külastatud 14.05.2016.

ISO 8192:2007 Water quality Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation

[http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=37369](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=37369), viimati külastatud 14.05.2016.

ISO 9509:2006 Toxicity test for assessing the inhibition of nitrification of activated sludge microorganisms

[http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=34812](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=34812), viimati külastatud 14.05.2016.

ISO 9888:1999 Water quality Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium Static test (Zahn-Wellens method)

[http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=28121](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=28121), viimati külastatud 14.05.2016.

Järve biopuhastus

[www.idavesi.ee](http://www.idavesi.ee), viimati külastatud 14.05.2016.

Nitrification

<http://nitrification.org/>.



NT Technical Report Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories.

NT Technical Report Uncertainty of Sampling

OECD Guideline for testing of chemicals „ Daphnia sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test“

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948249.pdf>, viimati allalaetud 14.05.2016.

Phosphorous removal from wastewater, Lenntech

<http://www.lenntech.com/phosphorous-removal.htm>, viimati külastatud 14.05.2016.

Waterfacts F:M ratio Wastewater Information

[http://www.waterfacts.net/Formulas/F-M\\_Ratio/f-m\\_ratio.html](http://www.waterfacts.net/Formulas/F-M_Ratio/f-m_ratio.html), viimati külastatud 14.05.2016.

## **Raamatud**

Bitton, 1994, Wastewater microbiology, pp 139-167, 209-229.

N. F. Gray, 2004, Biology of wastewater treatment, Vol. 2, Imperial College Press, Ireland, 2004, pp. 465-628.

M. Henze, P. Harremoës, Jes la Cour Jansen, E. Arvin, 1995, Wastewater Treatment (Biological and Chemical Processes).

I. Leito, A. Viitak Kvaliteeditagamine analüütilises keemias, TTÜ kirjastus, 2007.

J.I. Prosser, Autotrophic Nitrification in Bacteria, pp 125-133.

C. N. Sawyer, P. L. McCarty, G. F. Parkin, 2003, Chemistry of Environmental Engineering and Science, 5th Edition

## **Tänuõnad**

Autor soovib tänada inimesi, kes olid abiks käesoleva töö valmimisel:

Kati Kleini suurepärase juhendamise ja igakülgse toe eest.

Taavo Tennot juhendamise eest.

Kristel Krooni abi ja nõuannete eest.

Kursusekaaslasi toetuse eest.

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

Mina \_\_\_\_\_ Liselle Luks \_\_\_\_\_

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: \_\_\_\_\_ 15.04.1994 \_\_\_\_\_)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

\_\_Denitrifikatsiooni inhibeerimise testi meetodika usaldusväarsuse kontrollimine

\_\_\_\_\_ ,

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on \_\_Taavo Tenno, Kati Klein \_\_\_\_\_ ,

(*juhendaja nimi*)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, \_\_16.05.2016\_\_\_\_\_ (*kuupäev*)