

Tartu Ülikool
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia instituut

Triin Väisanen

**LÄMMASTIKU ÄRASTUSKIIRUSE UURIMINE
ANAEROOBSE AMMOONIUMI OKSÜDEERIMISE
(ANAMMOX) PROTSESSIL PÕHINEVAS
BIOELEKTROKEEMILISES SÜSTEEMIS**

Magistritöö (30 EAP)

Keskkonnatehnoloogia

Juhendaja:

PhD Ivar Zekker

Tartu 2021

Lämmastiku ärastuskiiruse uurimine anaeroobse ammooniumi oksüdeerimise (anammox) protsessil põhinevas bioelektrokeemilises süsteemis.

Lämmastiku ärastuskiirust uuriti anaeroobse ammooniumi oksüdeerimise (anammox) protsessil põhinevas bioelektrokeemilises süsteemis. Selleks võrreldi kolme mikroobsel elektrosünteesil (MES) põhinevat raku, millest kahte inokuleeriti anammox baktereid sisaldav biomass. Ühele biomassiga rakule rakendati potentsiaali. Kolmas rakk oli kontrollrakk, kuhu ei inokuleeritud anammox baktereid. Tulemused näitasid, et -700 mV juures võib lämmastiku ärastuskiirus tõusta kuni 30 mg N/m²/d, olles nii 2x kiirem potentsiaalita biomassiga MESis ning 1,5x kiirem kontrollrakust. Tulemustes nähtub, et võrreldes inokuleeritud bakteritega on anammox baktereid kõige rohkem potentsiaaliga MESis, viidates sellele, et -700 mV potentsiaal soosib anammox bakterite paljunemist.

Märksõnad: reovee puhastamine, lämmastikuärastus, bioelektrokeemilised süsteemid, mikroobne elektrosüntees, bioelektrokeemia.

CERCS kood: P305, T490

Research in nitrogen removal rate in anaerobic ammonium oxidation (anammox) process-based bioelectrochemical system.

Nitrogen removal rate was studied in anaerobic ammonium oxidation (anammox) process-based bioelectrochemical system. Three different microbial electrosynthesis (MES) cells were compared. Two MES were inoculated with anammox bacteria and one biomass containing MES were applied with voltage. Third MES was control MES. There were no applied voltage and anammox biomass in it. Results show that an electric potential -700 mV could result in nitrogen removal rate of 30 mg N/m²/d. This is twice as fast than in MES with biomass and without potential and 1,5 times faster than in control MES. Compared with inoculation, anammox bacteria has the fastest growth rate in MES with applied voltage -700 mV, indicating that this potential magnifies the growth rate of anammox bacteria.

Keywords: wastewater treatment, nitrogen removal, bioelectrochemical systems, microbial electrosynthesis, bioelectrochemistry.

CERCS code: P305, T490

SISUKORD

LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. ÜLEVAADE KIRJANDUSEST.....	8
1.1. Lämmastikuärastus traditsioonilistes reoveepuhastusjaamades.....	8
1.2. ANAMMOX	9
1.3. Bioelektrokeemilised süsteemid.....	12
1.3.1. Erinevad BESid.....	15
1.3.2. BESide positiivsed ja negatiivsed küljed	16
1.3.3. BESide rakendamine lämmastikuärastuses	17
2. MATERJALID JA MEETODID	19
2.1. MES rakud.....	19
2.2. Inokuleerimine	19
2.3. Sünteetilise lahuse ettevalmistamine.....	20
2.4. Ettevalmistused katseteks.....	20
2.5. Analüütilised vahendid ja meetodid.....	21
2.6. Arvutused	22
3. TULEMUSED.....	23
3.1. Katsete koondtulemused	23
3.2. Esimesed kolm katset	23
3.3. Katse proovivõtmise kellaegade vahetus.....	26
3.4. Katsed nädalatel viis kuni kaheksa.....	27
3.5. Lahti tulnud biomass ja sellele järgnev	31
3.6. Bakterid	33
KOKKUVÕTE.....	34
VIIDATUD ALLIKATE LOETELU.....	36
LISAD	42

Lisa 1. 16S rRNA analüüs anoodikambris.	42
Lisa 2. 16S rRNA analüüs katoodikambrites.	43
Lisa 3. 16S rRNA analüüs-osakaalud.	44
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	45
TÄNUSÕNAD.....	46

LÜHENDID

AOB	Ammooniumi oksüdeerivad bakterid.
BES	Bioelektrokeemiline süsteem.
Cyt <i>c</i>	C-tüüpi tsütokroom. Seotud elektronide transportimise protsessiga.
EET	Elektronide rakuväline ülekanne.
EFC	Ensümaatiline kütuseelement (tuleb ingliskeelsest sõnast <i>enzymatic fuel cell</i>).
HAO	Hüdrosüülamiini oksüreduktaasi ensüüm. Vastutab anammoxosoomis hüdrasiini oksüdeerimise eest N ₂ ks.
i.e.	Inimekvivalent. Ühe inimese põhjustatud keskmise ööpäevase tingliku veereostuskoormuse ühik.
MBBR	Liikuvate kandjatega biokilereaktor.
MDC	Mikroobsed magestamiselemendid (tuleb ingliskeelsest sõnast <i>microbial desalination cell</i>).
MEC	Mikroobne elektrolüüsirakk (tuleb ingliskeelsest sõnast <i>microbial electrolysis cell</i>).
MES	Mikroobne elektrosüntees (tuleb ingliskeelsest sõnast <i>microbial electrosynthesis</i>).
MFC	Mikroobne kütuseelement (tuleb ingliskeelsest sõnast <i>microbial fuel cell</i>).
MSC	Mikroobne päikeseenergiaal põhinev kütuseelement (tuleb ingliskeelsest sõnast <i>microbial solar cell</i>).
NOB	Nitritit oksüdeerivad bakterid.
PMFC	Taimedel põhinev mikroobne kütuseelement (tuleb ingliskeelsest sõnast <i>plant microbial fuel cell</i>).
VSS	Põletuskadu (tuleb ingliskeelsest sõnast <i>volatile suspended solids</i>) - kuivaine ja põletusjäägi vahe.

SISSEJUHATUS

Lämmastik on oluline element eluks maal. Lämmastikku sisaldavad ühendid aineringsse sattumisel võivad toimiva tasakaalu paigast ajada. Näiteks võib see viia veekogude kinnikasvamise ehk eutrofeerumiseni (Euroopa Komisjon 2010). Üheks võimalikuks lämmastikuringet mõjutavaks teguriks on ebatõhusa toitaineteärastuse efektiivsusega reoveepuhastusjaamad. Selle olukorra vältimiseks peavad reoveepuhastusjaamad suutma erinevate meetoditega eemaldada reoaineid, sealhulgas lämmastikku reoveest (Kõrgmaa *et al.* 2016).

Selleks, et reoveepuhastusjaama heitvee juhtimisel suublasse ei halveneks maismaaökosüsteemide seisund, on Eestis määrusega reguleeritud nõuded nii reovee puhastamise kui heitvee suublasse juhtimise kohta (Keskkonnaminister 2019a). Samuti on alates 300 inimekvivalendiga (i.e.) reoveepuhastusjaamadel fikseeritud piirväärtused ja reovee puhastusastmed (vt Tabel 1), millele heitvesi vastama peab (Keskkonnaminister 2019b).

Tabel 1. Saastenaõtjate piirväärtused veepuhastusjaama väljavoolus ja reovee puhastusastmed reoveepuhastusjaama reostuskoormusest lähtuvalt (Keskkonnaminister 2019b).

	300–1999 i.e. mg N/l / %	2000–9999 i.e. mg N/l / %	10 000–99 999 i.e. mg N/l / %	100 000 ja enam i.e. mg N/l / %
Üldlämmastik	60/30	45/30	15/80	10/80

Lämmastikuärastus reoveepuhastusjaamades on aeganõudev ja energiamahukas. Seetõttu uuritakse uusi ja energiatõhusamaid lahendusi. Üheks selliseks lahenduseks on anammox protsessi kasutamine. Anammox on anaeroobne ammoniumi oksüdatsiooni protsess, kus anoksilises keskkonnas eemaldatakse ammonium (NH_4^+) ja nitrit (NO_2^-), mis muundatakse õhulämmastikuks (N_2) (Hauck *et al.* 2016). Kuigi anammox protsess avastati juba 1980ndatel aastatel (Mulder 1989), on seda just viimasel ajal rohkem uuritud (Fan *et al.* 2020; Li *et al.* 2021). Viimastel aastatel on järjest enam uuritud ka erinevate bioelektrokeemiliste süsteemide (BES) kasutamist lämmastikuärastuses (Ding *et al.* 2017; San-Martín *et al.* 2018; Zekker *et al.* 2020). Nende kahe protsessi koostoime uurimine on ajendanud selle töö kirjutamist.

Selle töö eesmärk on uurida:

- Kas ja kuidas tõhustub lämmastikuärastuse kiirus anammox protsessis, kui rakendada välist elektronide juurdeandmist (tõstes potentsiaali) bioelektrokeemilisele süsteemile.

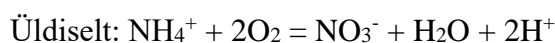
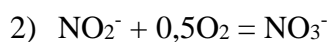
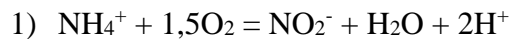
Töö põhineb kogulämmastiku vähenemise võrdlemisel vooluga ja vooluta bioelektrokeemilises anammox süsteemis ning kontrollrakus.

1. ÜLEVAADE KIRJANDUSEST

1.1. Lämmastikuärastus traditsioonilistes reoveepuhastusjaamades

Kõige levinumad reoveepuhastusjaamad põhinevad aktiivmudapuhastitel (Kala 2017). Ka Eestis on enamik reoveepuhastusjaamu aktiivmudapuhastitel põhinevad. Aktiivmudapuhasteid kasutatakse seetõttu, et nad suudavad reoveest ärastada muuhulgas lämmastiku- ja fosforiühendeid. Aktiivmuda on biomass, mis sisaldab endas reovees olevaid baktereid ja muid mikroorganisme. Tegemist on bioloogilise puhastusega, kus mikroorganismid kõrvaldavad reoveest erinevaid aineid, kasutades seda oma elutegevuses. Bioloogiline puhastus toimub nii aeroobses kui anaeroobses (sh anoksilises) keskkonnas (Kõrgmaa *et al.* 2016).

Tavapärane lämmastikuärastus aktiivmudapuhastites toimub nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsesside kaudu (Rodriguez Arredondo *et al.* 2014; Mandel *et al.* 2019). Nitrifikatsioon on protsess, kus kemolitoautotroofid nagu ammooniumi oksüdeerivad bakterid (AOB) muudavad reovees oleva ammooniumi nitritiks, millele järgneb nitriti muutmine nitraadiks (nitritit oksüdeerivate bakterite (NOB) abil) (vt võrrand 1). Protsess toimub aeroobses keskkonnas (Kokabian *et al.* 2018). Ammoonium muudetakse nitritiks *Nitrosomonas* bakterite abil, nitriti oksüdeerimist nitraadiks vahendavad *Nitrobacter* tüved (Xin *et al.* 2008; Rodriguez Arredondo *et al.* 2014). Võrrandil 1 ja 2 on näidatud nitrifikatsioon (Rodriguez Arredondo *et al.* 2014):



Denitrifikatsiooni käigus muudetakse nitraat õhulämmastikuks (N_2). Seda protsessi vahendavad heterotroofsed bakterid, näiteks *Pseudomonas* perekonda kuuluvad bakterid, aga ka näiteks liigi *Paracoccus denitrificans* esindajad. Denitrifikatsioon toimub hapnikuvaeses (anoksilises) keskkonnas (vt võrrand 3) (Xin *et al.* 2008; Rodriguez Arredondo *et al.* 2014; Kokabian *et al.* 2018). Heterotroofsed mikroorganismid kasutavad nitraati elektronaktseptorina ning energiaks kasutavad nad olemasolevat orgaanilist ainet (Ahn 2006). Võrrandiga 3 on näidatud denitrifikatsiooni stöhhioomeetria (Rodriguez Arredondo *et al.* 2014):

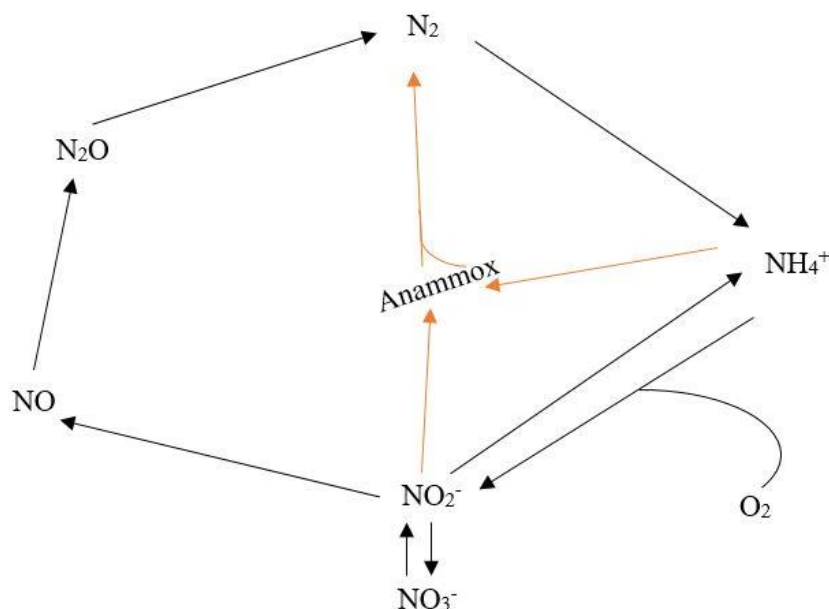


Traditsioonilise lämmastikuärastuse protsessi eelis reoveepuhastuses on see, et ta suudab ärastada lämmastikku ka väga madalate kontsentratsioonide juures (Rodriguez Arredondo *et al.*

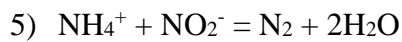
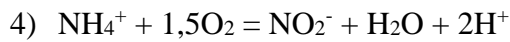
2014). Miinuseks traditsioonilises reoveepuhastuses on see, et nii denitrifikatsiooniprotsess kui fosforiärastus vajavad orgaanikat. Nitrifikatsiooniprotsess vajab toimimiseks aeratsiooni. Seega nii aeratsioon kui välise orgaanika (nt metanool) lisamine suurendavad reoveepuhastuse maksumust (Mandel *et al.* 2019). Aeratsioonile kuluv energiakulu võib moodustada kuni 60% reoveejaama koguenergia tarbimisest (Rodriguez Arredondo *et al.* 2014). Keskmises reoveepuhastusjaamas Euroopas, mille reostuskoormus on 200 000 ie, kulub aereerimisele aastas kuni pool miljonit eurot (Vilajeliu-Pons *et al.* 2018). Seetõttu otsitaksegi lahendusi, mis vähendaks reoveejaamas aeratsioonile kuluvat energiat ning mis ei vajaks orgaanika lisamist.

1.2. ANAMMOX

Anammox ehk anaeroobne ammooniumi oksüdatsioon on alternatiivne protsess denitrifikatsioonile reoveepuhastuses. See on protsess, kus mikroorganismid muundavad ammooniumi (NH_4^+) ja nitriti (NO_2^-) õhulämmastikuks (N_2) anoksilistes tingimustes (vt Joonis 1). Nitrit on selles protsessis elektronaktseptoriks (Rodriguez Arredondo *et al.* 2014; Hauck *et al.* 2016, Zekker *et al.* 2020). Ammooniumi ja nitriti kasutamise käigus ammutavad anammox bakterid organismi ülesehituseks vajalikke aineid (Sinninghe-Damste *et al.* 2002). Anammox protsessi kirjeldavad ka võrrandid 4 ja 5, kus esimeses etapis tekib nitrit, mis seejärel kasutatakse bakterite poolt koos ammooniumiga.

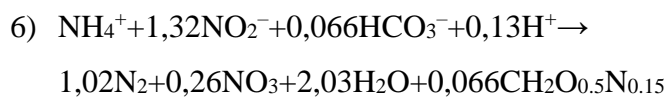


Joonis 1. Anammox protsessi otsetee lämmastikuringes (Kartal *et al.* 2010).

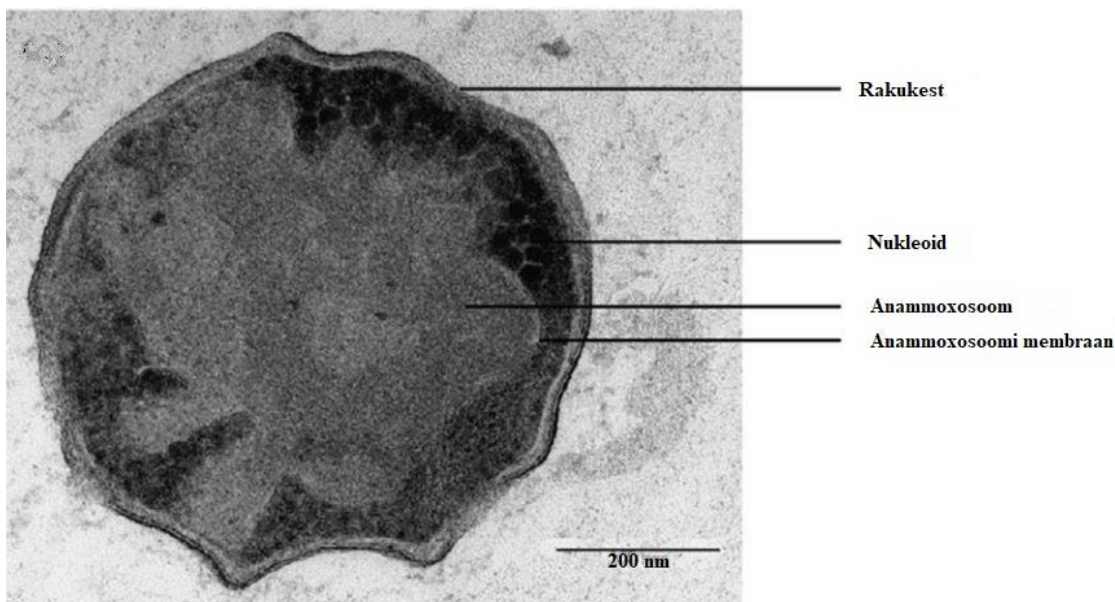


Võrrandid 4 ja 5. Anammox protsessile eelneb nitriti tootmine (Rodriguez Arredondo *et al.* 2014).

Anammox protsessi viivad läbi anammox bakterid. Anammox bakterid kuuluvad peamiselt hõimkonda *Planctomyces*. 1999. aastal avastati anammox protsessi läbiviivaks bakteriliigiks *Candidatus Brocadia anammoxidans*, mida peetakse senini domineerivamaks anammox protsessi läbiviivaks liigiks (Kuenen 2008). On leitud (Kuenen 2008; Meng *et al.* 2017), et anammox bakterid suudavad CO₂-te süsinikuallikana kasutades sünteesida juurde rakke ehk toota biomassi. Toodetud biomass väljendub valemiga CH₂O_{0.5}N_{0.15}. Nitrit võib selles reaktsioonis olla elektronaktseptoriks ammooniumi oksüdatsioonil ning elektrondonoriks süsinikdioksiidi reduktsioonil. Protsessi kirjeldab võrrand 6 (Kuenen 2008; Meng *et al.* 2017):



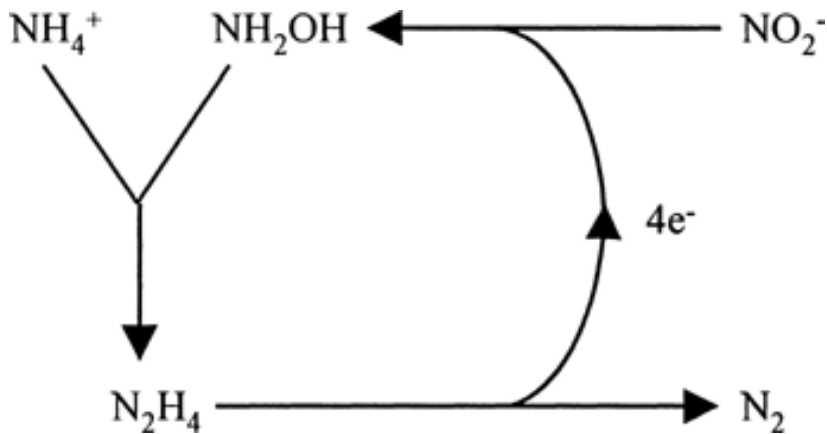
Anammox bakteritel on neile spetsiifiline organell, mida kutsutakse anammoxosoomiks (vt Joonis 2). Anammoxosoomi peetakse anammox bakterite energia tootmise organelliks ning seal toimub anammox protsess (Sinninghe-Damste *et al.* 2002).



Joonis 2. Anammoxosoomi struktuur. Mõõtkava 200 nm (Meng *et al.* 2017).

Üheks vaheühendiks, mis anammox protsessi käigus tekib, on energiarikas, kuid teistele organismidele toksiline ühend hüdrasiin (Kartal *et al.* 2010; Cho *et al.* 2020). Anammoxosoomis leidub HAO ehk hüdroksüülamiini oksüreduktaasi ensüüm, mis vastutab

hüdrasiini oksüdeerimise eest N_2 -ks. Hüdrasiini oksüdeerimisel õhulämmastikuks tekib neli elektroni, mida kasutatakse uuesti nitriti redutseerimisel hüdroksüülamiiniks (Schalk *et al.* 1998; van Niftrik *et al.* 2012). Anammoxosoomis leidub ka tsütokroom c (Cyt c), mis on seotud tekkinud elektronide transportimise protsessiga ka bioelektrokeemilistes süsteemides (Kuenen 2008). Protsess kirjeldatud Joonisel 3.



Joonis 3. Hüdrasiini teke anammoxi käigus (Schalk *et al.* 1998).

Anammox protsessi teeb keeruliseks see, et anammox bakterite kasv on aeglane. $35^\circ C$ juures võib bakterite pooldumine aega võtta 10–12 päeva. Lisaks sellele, et bakterid kasvavad pigem soojemates tingimustes, toimib anammox protsess paremini kõrge ammooniumisisaldusega reovee puhul (Kartal *et al.* 2010). Anammox bakterid poolduvad korra 2–3 nädala jooksul (Sinninghe-Damste *et al.* 2002). Näiteks tehti katse, millest nähtus, et $29^\circ C$ juures on anammox bakterite pooldumisaeg 24 päeva, $12,5^\circ C$ juures pikenes see aeg 79 päevani (Laureni *et al.* 2015). Anammox bakterid on tundlikud välistele mõjuteguritele nagu pH, soolsus ja hapnikutase. Nende kasvu pärsib intensiivne aeratsioon (Meng *et al.* 2017).

Anammox protsessi eelis võrreldes traditsioonilise nitrifikatsioon-denitrifikatsiooni põhimõttel toimuva lämmastikuärastusega on see, et väheneb vajadus varustada süsteemi üleliigse hapnikuga, sest protsess ei nõua tugevat aereerimist. Seetõttu vähenevad elektrikulud ning CO_2 ja N_2O emissioonid on limiteeritud (Hauck *et al.* 2016; Zekker *et al.* 2019). Anammox protsess ei vaja ka lisa orgaanilise süsiniku allikat, mille abil protsessi läbi viia. Bakterid kasutavad kasvamiseks süsinikuallikana olemasolevat CO_2 (Kartal *et al.* 2010; Hauck *et al.* 2016). Süsteemi eeliseks võrreldes traditsioonilise reoveepuhastusjaamaga on ka väiksem liigmuda teke (Ahn 2006; van Loosdrecht 2008).

Reoveejaama sissevoolus on lämmastik enamasti ammooniumi kujul. Anammox protsessi toimimiseks on vaja saada ammooniumile lisaks piisavas koguses nitritit. Selleks on anammox

protsessi kombineeritud erinevate protsessidega. Üks selline on näiteks SHARON (Single High Rate Ammoonium Removal Over Nitrite) protsess. SHARON on bioloogiline protsess, kus ammoonium oksüdeeritakse nitritiks nitritit oksüdeerivate bakterite vahendusel. Sellega saadakse nitriti ja ammooniumi 50:50 vahekord. Energiavajadus sellises kombineeritud protsessis on võrreldes traditsioonilise reoveepuhastusega väiksem, kuna ei ole vaja lisada lisa orgaanilist süsinikuallikat (Kuenen 2008; Rodriguez Arredondo *et al.* 2014).

Esimene SHARON ja anammox koostoimel põhinev reaktor (mahuga 80 m³) rajati 2002. aastal Hollandisse Rotterdami linna, et puhastada kõrge ammooniumisisaldusega reovett Dokhaven-Sluisjesdijk reoveejaamas. Selle reaktori käimasaamine võttis aega 2 aastat anammox bakterite aeglase kasvu tõttu. 2006. aasta septembriks töötas reaktor täielikult ning suutis eemaldada lämmastikku ärastuskiirusega 8–10 kg N m³/d (Kuenen 2008). Traditsioonilise reoveepuhastuse ja SHARON/Anammox kombineeritud protsessi võrdlus 25 000 000 i.e. reostuskoormuse juures on näha Tabelis 2.

Tabel 2. Traditsiooniline reoveepuhastusjaam võrrelduna SHARON/Anammox kombineeritud protsessiga Hollandis 25 miljoni ie juures (van Loosdrecht 2008).

Võrreldav element	Ühik	Traditsiooniline reoveepuhastus	SHARON/Anammox
CO ₂ emissioon	kilotonn/aastas	400	6
Energia tarbimine	MW	80	41
Liigmuda teke	kilotonn VSS/aastas	370	270

Selleks, et kiirendada anammox bakterite toimima hakkamist, viidi Taiwanis 2014 aastal läbi katse, kus ühte reoveejaama inokuleeriti teisest reoveejaamast toodud muda, mis sisaldas anammox baktereid. Kuue kuuga suutsid anammox bakterid reoveejaamas, kuhu nad inokuleeriti, kasvada ning seejärel hakata seal lämmastikku ärastama. Mõlemas reoveejaamas olevast mudast leiti *Candidatus Brocadia* perekonna esindajaid. Selle katsega jõuti järeldusele, et anammox baktereid saab kanda ühest reoveejaamast teise, mis tähendab, et neid baktereid ei pea varasemalt laboratoorse puhtusega tehiskeskkonnas kasvatama (Meng *et al.* 2017).

1.3. Bioelektrokeemilised süsteemid

Bioelektrokeemilised süsteemid on süsteemid, kus mikroorganisme kasutades muudetakse orgaaniliste ainete lagundamisel tekkiv keemiline energia elektrienergiaks või soovitud keemilisteks produktideks (Pant *et al.* 2012). Bioelektrokeemilised süsteemid koosnevad kahest

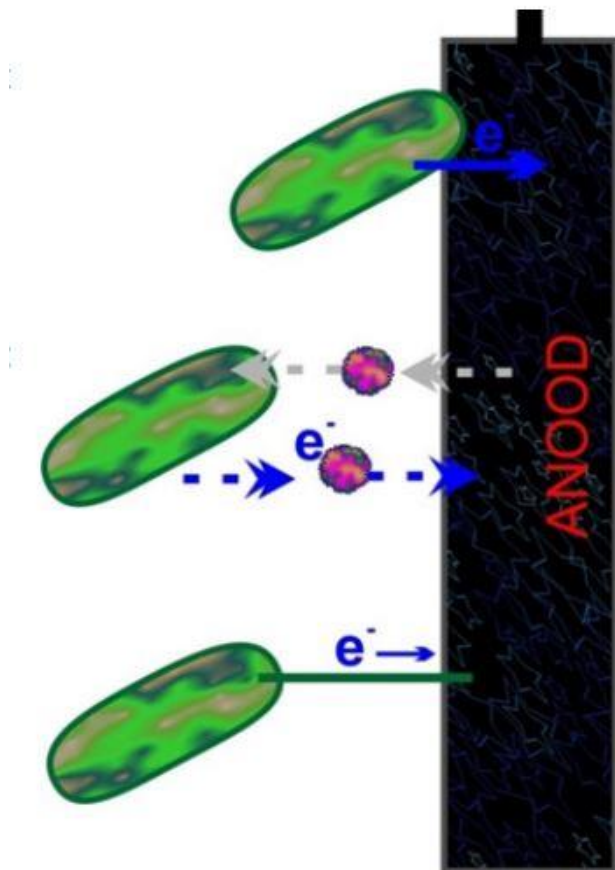
elektroodist- anoodist ja katoodist, mis on omavahel ühenduses välise ahelaga, moodustades nii vooluahela (European Commission 2013). Elektroodid võivad asuda eraldi kambrites- anoodi- ja katoodikambris (Bajracharya *et al.* 2016). Orgaanilise aine lagundamisel bioelektrokeemilises süsteemis tekivad elektronid (negatiivselt laetud osakesed) ja prootonid (positiivselt laetud osakesed (H^+)). Mikroorganismid kannavad ühendite lagundamise järel elektronid anoodile, mis seejärel liiguvad välise vooluringi kaudu katoodile. Tekkinud prootonid liiguvad läbi katioonvahetusmembraani katoodikambrisse (Rodriguez Arredondo *et al.* 2014; Sun *et al.* 2020).

Elektrokeemilistes süsteemides toimuvad nii oksüdeerumis- kui redutseerimise reaktsioonid ehk redoksreaktsioonid. Nende mõlema protsessi potentsiaalid on erinevad, olles nii protsessis tekkivatele elektronidele liikumapanevaks jõuks. Elektronid liiguvad madalama potentsiaaliga piirkonnast kõrgema potentsiaaliga piirkonda (Rodriguez Arredondo *et al.* 2014). Anoodil on orgaanilise aine oksüdatsioonil madal redokspotentsiaal, katoodil toimuvates reaktsioonides aga kõrge redokspotentsiaal. See paneb elektronid liikuma anoodilt katoodile. Selline elektronide liikumine läbi välise vooluahela ongi elektrivool. Kui sellest protsessist võtavad osa mikroobid või ensüümid, siis on tegemist bioelektrokeemiliste süsteemide ehk BESidega. Kui mikroobid katalüüsivad reaktsioone nii anoodil kui katoodil, siis kutsutakse neid elektroode vastavalt bioanoodiks ja biokatoodiks (Bajracharya *et al.* 2016).

BESid võivad jaguneda galvaanilisteks ja elektrolüütilisteks. Galvaanilised BESid on mõeldud elektri tootmiseks. Sellised on näiteks mikroobsed kütuseelemendid (MFC). Elektrolüütilisele rakule peab aga lisama elektrit, et viia läbi katoodil toimuvaid redoksreaktsioone. Selline on näiteks mikroobne elektrolüüsirakk (MEC) (Rodriguez Arredondo *et al.* 2014). Järjest enam uuritakse BESe selle eesmärgil, et mõista produktide sünteesi mikroobse elektrisünteesi (MES) kaudu (Pant *et al.* 2012).

BESide toimimiseks on vaja elektrokeemiliselt aktiivseid mikroorganisme, kes panevad bioelektrokeemilised süsteemid toimima. See toimub rakuvälise elektronide ülekandega. Rakuvälise elektronide ülekanne (EET, tuleb ingliskeelsest lausest *extracellular electron transfer*) on nähtus, kus BESis olevad mikroorganismid vabastavad orgaanilise aine lagundamisel oma rakkude seest elektrone elektroodile. On teada kaks meetodit elektronide kandmiseks elektroodile: otsene ülekanne bakteritelt ja vahendatud ülekanne bakteritelt. Otsene võib omakorda jaguneda kaheks: a) otsese kontakti kaudu mikroorganismi ja elektroodi pinna vahel; b) elektronid kantakse mikroorganismilt elektroodile mediaatori vahendusel või läbi väikeste moodustiste (tsütoplasma väljasopistuste), näiteks nanojuhtmete kaudu, mis ulatuvad

rakumembraani väliskihist välja ning kinnituvad elektroodile (Rabaey & Rozendal 2010; European Commission 2013). Otsene ülekanne näha Joonisel 4.



Joonis 4. Otsene elektronide ülekanne elektroodile. Üleval tegemist otsese kontaktiga, keskel mediaatori vahendusega ning alumisel elektronide ülekanne nanojuhtmega (Tamm 2015).

Vahendatud ülekande puhul kasutavad mikroorganismid süsteemis leiduvaid spetsiaalsete omadustega molekule transpordi molekulidena. Elektronid kantakse esmalt rakupinnale, kust transpordi molekulid need kokku koguvad ning edasi elektroodile kannavad. Kõige selle tulemina suudavad mikroorganismid kasvada ümber elektroodi, moodustades selle ümber biokile. Mida suurem on elektroodi pindala ja eripind, seda suurem biokile saab moodustuda. See toob kaasa suurema elektronide tootmise ning seeläbi suurema elektri-, vesiniku- või erinevate kemikaalide tootmise (Rabaey & Rozendal 2010; European Commission 2013).

Elektrokeemiliselt aktiivsete mikroorganismide elutegevuse ja ainevahetuse tulemina muudetaksegi keemiline energia elektrienergiaks või vastupidi. Anoodil oksüdeerivad mikroorganismid biolagunevat orgaanilist ainet, muutes selle CO₂-ks. Katoodil vahendavad nad redutseerimisreaktsioone (Rodriguez Arredondo *et al.* 2014). Katoodi reaktsioonide tulemusel moodustuvad erinevad lõpp-produktid (Pant *et al.* 2012). Mikroorganismide reaktsioonide ja elutegevuse tulemina eemaldatakse lahuses olevat orgaanilist ainet ning selle tulemina tekivad elektronid, prootonid ja CO₂. Mikroorganismid saavad energiat, kui nad kannavad tekkinud elektrone elektronaktseptorile nii aeroobsetes kui anaeroobsetes tingimustes (Junga *et al.* 2020). On leitud, et elektrivoolu sobivad tootma näiteks *Shewanella* ja *Geobacter* perekonda kuuluvate bakterite liigid (Bajracharya *et al.* 2016).

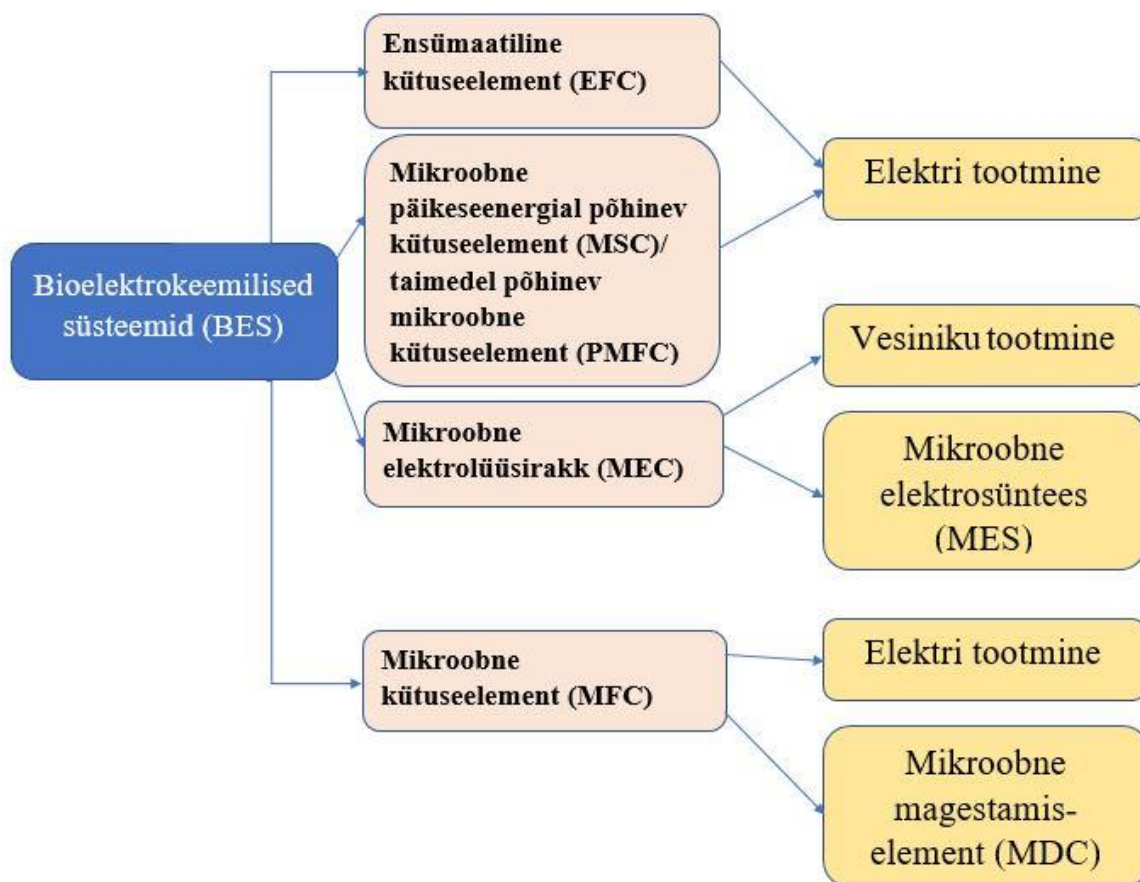
1.3.1. Erinevad BESid

Kõige enam uuritud BESid on mikroobsed kütuseelemendid (MFC) ja mikroobsed elektrolüüsirakud (MEC). Mikroobsetes kütuseelementides oksüdeerivad mikroorganismid anoodikambris orgaanilist ainet ning selle tulemina tekivad elektronid. Mikroorganismid seovad tekkinud elektronid anoodi pinnaga, mis seejärel liiguvad läbi välise vooluringi katoodikambris olevale katoodile. Selle protsessi käigus toodetakse elektrit. Süsteemi elektroneutraalsuse tagab anoodi- ja katoodikambri vahel olev ioone poolläbilaskev membraan, mis võimaldab anoodil tekkivatel ioonidel liikuda katoodikambrisse (Bajracharya *et al.* 2016; Junga *et al.* 2020).

Mikroobsete elektrolüüsirakkude (MEC) ülesehitus on sarnane MFCle. MECe ei kasutata aga elektritootmiseks. Neile rakendatakse lisapinget, et elektrolüüsi läbi viia ning toota väärtuslikke ühendeid orgaanilistest hapetest, alkoholidest. See paneb elektronid liikuma anoodilt katoodile, kus toodetakse vesinikku (H₂). MECide puhul on katood anaeroobses keskkonnas, soodustades nii vesiniku tootmist. MECi toimimiseks vajalikku elektrit võib panna tootma ka MFC, muutes need süsteemid täiesti bioelektril põhinevaks (Bajracharya *et al.* 2016).

Järjest enam uuritakse mikroobset elektrosünteesi ehk MESi. See on BES, kus CO₂ või orgaaniline molekul muudetakse mikroorganismide abil katoodil teiseks, kõrgema väärtusega orgaaniliseks molekuliks. Selleks, et muuta CO₂ mõneks teiseks ühendiks, on vaja katoodile rakendada pinget. Mikroobset elektrosünteesi on kasutatud näiteks atsetaadi, etanooli, butüraadi jt ühendite moodustamiseks, kasutades selles näiteks CO₂ (Bajracharya *et al.* 2016; Junga *et al.* 2020; Jourdin & Burdyny 2021).

Lisaks on uuritud ensümaatilist kütuselementi (EFC), kus elektrit toodetakse elektroodi pinnal või elektrolüüdi lahuses olevate spetsiifiliste ensüümide vahendusel. On olemas mikroobne päikeseenergiat põhinev kütuseelement (MSC), mis kasutab fotoautotroofseid mikroobe või kõrgemaid taimi, et püüda päikeseenergiat, mida omakorda kasutatakse elektroaktiivsete bakterite poolt elektri või erinevate produktide tootmiseks. Taimedel põhinevad mikroobsed kütuseelemendid (PMFC) ühendavad taimede juured mikroobse kütuseelemendi anoodikambriga, tootmaks elektrit. Mikroobset magestamiselementi (MDC) on aga uuritud vee magestamise võimalusena (Bajracharya *et al.* 2016). Erinevad BESid on toodud kokkuvõtvalt Joonisel 5.



Joonis 5. Erinevad BESid ja nende kasutusvõimalused (Bajracharya *et al.* 2016).

1.3.2. BESide positiivsed ja negatiivsed küljed

BESid on uuritud nii bioelektri tootmiseks kui reovee puhastamiseks erinevatest ühenditest, sealhulgas lämmastikuühenditest. BESid peetakse osaks ringmajandusest, sest nad suudavad toota energiat ja erinevaid kemikaale, puhastades samaaegselt reovett (Junga *et al.* 2020).

BESide kasutamisel reovee puhastamisel tekib väga vähe liigmuda, mistõttu ei vaja sellistel süsteemidel põhinevad reoveepuhastusjaamad eraldi muda käitlemise tehnoloogiaid. Samuti on

MFCde kasutamise võimalik toota elektrit (Bajracharya *et al.* 2016). Sidudes omavahel erinevaid BESe suuremaks süsteemiks, saab luua veel jätkusuutlikumaid süsteeme. Näiteks ühendades MFC ja MECi, saab MFC toota MECi toimimiseks vajalikku energiat. CO₂-te, kui ühte orgaanilise aine lagunemisel tekkivat kõrvalprodukti, saavad mikroobid kasutada biomassi kasvatamiseks (Junga *et al.* 2020). On uuritud ka BESide kasutamist erinevate ühendite taaskasutusse võtmiseks. Näiteks kõrge ammooniumisisaldusega reovee puhul saab seal oleva ammooniumi eraldada ning suunata väetiste tootmiseks (Osset-Álvarez *et al.* 2019).

Negatiivsed küljed BESidel on näiteks kallid anoodi-, katoodi- ja membraanimaterjalid ning puudub teadmine, kuidas ja kui kaua need vastu peavad. Siiani on tehtud katseid pigem reovett imiteeriva lahusega kui reovee endaga, mistõttu ei teata, kuidas BESid realselt reovett puhastada suudavad. Vähe on pilootprojekte, kus neid rakendatakse. Samuti peab BESide kasutamisel mõtlema läbi, milliseid mikroorganisme kasutada, et saavutada soovitud tulemusi (Junga *et al.* 2020).

Iga bioloogilise süsteemi toimimine sõltub mitmetest teguritest nagu substraat, ensüümid, redokstingimused jne (Bajracharya *et al.* 2016). BESides toimuvat lämmastikuärastust mõjutavad tegurid nagu hapniku kogus, pH, hüdrauliline viibeaeg, aga ka süsteemide takistus. Mida väiksem on väline takistus, seda rohkem liigub anoodilt katoodile elektrone ning seeläbi on ka lämmastikuärastuse efektiivsus suurem (Sun *et al.* 2020).

1.3.3. BESide rakendamine lämmastikuärastuses

BESide rakendamisel lämmastikuärastuseks reoveest on tehtud mitmeid uuringuid, sealhulgas anammox protsessil põhinevaid. Näiteks Tartu Ülikoolis leiti (Zekker *et al.* 2020), et anammoxil põhinev mikroobne kütuserakk (MFC-ANA) suudab toota bioenergiat. Esimesel 30 katsetsüklil (iga tsükel kolm päeva) oli suurim saavutatud võimsustihedus 9,5 W m⁻³ ning viimasel 30 katsetsüklil 6,0 W m⁻³. Samaaegselt saavutati orgaanilise aine ärastusefektiivsus (mõõdetuna keemilise hapnikutarbe ehk KHT kaudu) 84±2% katse algtsüklites ja 80±2% katse lõputsüklites. Kogulämmastikuärastuse efektiivsus oli katse algtsüklites 89±4% ning katse lõpptsüklites 73±2%.

Vilajeliu-Pons jt (2018) viisid läbi katse bioelektrokeemilise süsteemiga, millele rakendati potentsiaali. Selle käigus sooviti anoksilises keskkonnas saada ammooniumist õhulämmastikku. Süsteemiga suudeti ärastada lämmastikku kiirusega 35±10 g N m⁻³ d⁻¹, saavutades ärastuse efektiivsuseks 97%, mis on võrreldav traditsioonilise lämmastikuärastuse efektiivsusega reoveejaamas. Traditsioonilistes reoveejaamades vajatakse peamiselt energiat

aereerimiseks, seda umbes $4,6 \text{ kWh kg}^{-1}$ ärastatud N kohta. Selles katses saadi BESi energiatarbimise suuruseks $1,16 \pm 0,21 \text{ kWh kg}^{-1}$ ärastatud N kohta. See on 35 korda madalam energiatarbimine kui traditsioonilises reoveejaamas. Seega on BESid ökonoomsed lahendused lämmasikühendite ärastuseks reoveest.

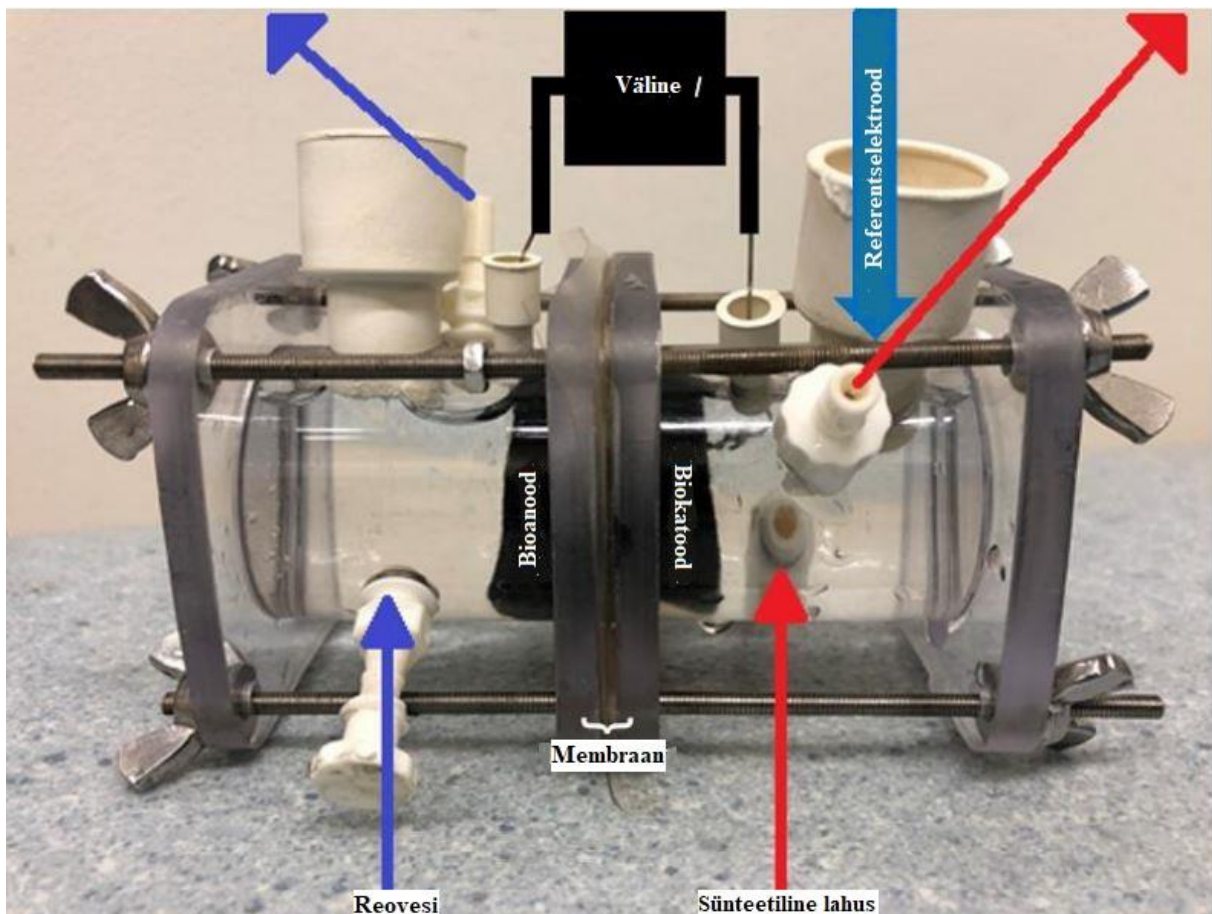
Leiti, et anammox bakteritel on elektronide rakuvälise ülekande (EET) võimekus (Shaw *et al.* 2020). Sellised bakterid on näiteks *Candidatus Brocadia* ja *Candidatus Scalindua* perekonna esindajad. Nitriti (NO_2^-) puudumisel suutsid anammox bakterid kanda ammooniumi anaeroobsel oksüdatsioonil tekkivad elektronid süsinikul põhinevale rakuvälisele elektronaktseptorile. Sellised elektronaktseptorid olid MECis olevad elektrodid. Selliselt suudeti muuta ammoonium õhulämmastikuks (N_2). Vaheühendina tekkis hüdroksüülamiin (NH_2OH). See katse (Shaw *et al.* 2020) näitab, et anammox protsessi saab seega bioelektrokeemilises süsteemis läbi viia ilma NO_2^- , NO_3^- või osalise nitritatsioonita.

Viimasel kümnendil on järjest enam uuritud mikroobset elektrosünteesi (MES), on arendatud katoodimaterjale, uuritud elektroaktiivseid mikroorganisme, rakuvälist elektronide kandmist ja mikroorganismide erinevaid funktsioone (Jourdin & Burdyny 2021). Näiteks on uuritud MESide kasutamist biogaasi tootmisel (Wang *et al.* 2021), vesinikperoksiidi (H_2O_2) tootmisel (Zou *et al.* 2021) ning lenduvate rasvhapete tootmisel (Noori *et al.* 2021), aga ka lämmastikuärastust anammox protsessil põhinevas MESis erinevatel potentsiaalidel (Nava 2020). See töö jätkab anammox protsessi uurimist MESis lämmastikuärastuseks.

2. MATERJALID JA MEETODID

2.1. MES rakud

Katsed viidi läbi kolme MES rakuga. Iga rakk koosneb nii anoodi- kui katoodikambrist mahutavusega 25 ml. Kambrate vahel asub prootonvahetusmembraan (Nafion 117). MES rakk on ehitatud polükarbonaadist. Nii anoodi- kui katoodikambris on elektroodid, bioanood ja biokatood, mis koosnevad süsinikvildist (kõrgus 12 mm, läbimõõt 22,5 mm, ruumala 4,7 ml). Elektroodid on omavahel ühendatud titaanist ühendusjuhtmega. Kambrate sulgemiseks kasutati nitiilkummist rõngaid. Anoodi- ja katoodikambri ühendamiseks prootonvahetusmembraaniga kasutati SYLGARD® polüdimetüülsiloksaan (PDMS) tihendeid. Rakk on näha Joonisel 6. Katoodikamber omakorda ühendati 500 ml pudeliga, milles olevat vedelikku tsirkuleeriti peristaltilise pumbaga (Nava 2020).



Joonis 6. Joonisel näha katses kasutatav MES rakk ning selle osad (Nava 2020).

2.2. Inokuleerimine

Elektroodid inokuleeriti bakteritega, sealhulgas anammox bakteritega, asetades elektroodid anammox protsessil põhinevatesse liikuvate kandjatega biokilreaktorisse (MBBR) (Zekker *et*

al. 2015). Inokuleerimine toimus kaks kuud. MBBR koosnes mehaanilise seguriga segatavast ja aereeritavast reaktorist. Pool reaktorist oli täidetud polüetüleenist biokile kandjatega. MES rakkude inokuleerimiseks kasutati kahte reaktorit. Esimest kasutati biokatoodi rikastamiseks. See kasutas NO_2^- -te ja NH_4^+ sisaldavat sünteetilist lahust toitelahusena. Teist reaktorit kasutati bioanoodi rikastamiseks ning see sisaldas kõrge ammooniumisisaldusega reovett ($\text{NH}_4^+ = 1000\text{--}1300 \text{ mg N L}^{-1}$) ja KHT ($400\text{--}700 \text{ mg L}^{-1}$).

2.3. Sünteetilise lahuse ettevalmistamine

Katsete läbiviimiseks kasutati katoodikambris sünteetilist lahust, mis imiteeris reovee lämmastikusisaldust. Toitelahuse koguste kaalumisel kasutati Radwag WPS 360/C/2 analüütilist kaalu. Lahuse valmistamiseks lahustati kraanivees lahustatud $0,17 \text{ ml NH}_4\text{Cl}$ (24 g N L^{-1} kontsentrati), $0,33 \text{ ml NaNO}_2$ (30 g N L^{-1} kontsentrati) ja 72 mg KNO_3 5000 ml kraanivees. Lisati veel 2 g naatriumbikarbonaati (NaHCO_3), 1 ml fosfaadi puhverlahust ($8,5 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$, $21,75 \text{ g K}_2\text{HPO}_4$, $33,4 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), 1 ml MgSO_4 lahust ($22,5 \text{ g MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ liitri destilleeritud vee kohta), 1 ml CaCl_2 lahust ($27,5 \text{ g CaCl}_2$ liitri destilleeritud vee kohta) ja 1 ml FeCl_3 lahust ($0,25 \text{ g FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ liitri destilleeritud vee kohta). Kokkusegatud lahust hoiti $4 \text{ }^\circ\text{C}$ juures külmkapis, et vältida ainete lagunemist.

2.4. Ettevalmistused katseteks

Katsed viidi läbi kolme MES rakuga (vt Joonis 7). Üks oli kontrollrakk, kuhu oli lisatud süsinikviltelektroodid ilma biomassita. Teises rakus olid süsinikviltelektroodid koos biomassiga. Kolmandas rakus olid süsinikviltelektroodid ning katoodile rakendati lisaks potentsiaali -700 mV .

Rakkude inokuleerimine bakteritega ning harjutamine potentsiaaliga algas oktoobrikuus 2018. aastal, kui MESid valmis ehitati. Esiolsetes katsetes olid poolused vahetuses. Katoodile rakendati positiivset laengut, mistõttu anoodil oli negatiivne laeng. Selliselt olid süsteemid 2019. aasta veebruarini. Veebruarist alates rakendati negatiivset laengut katoodile. Kuu aega rakendati potentsiaali -500 mV . Edasi rakendati potentsiaali -700 mV .

Põhimõõtmised teostati vahemikus märts–aprill 2019. Sellal oli katoodikambrile rakendatud potentsiaal -700 mV . Mõõtmisi teostati 1–2x nädalas. Aprillikuus tuli biomass potentsiaaliga MESi katoodikambris katoodilt lahti, mistõttu hakati edaspidi rakendama potentsiaali sellele rakule, kus varem oli lihtsalt biomassiga süsinikviltelektrood. Tehti ka katseid, kus ühelegi MESile potentsiaali ei rakendatud.

Iga katse alguses vahetati kõikides MES rakkude katoodikambrites toitelahus. Vana lahus eemaldati ja rakud loputati läbi demineraliseeritud veega. Seejärel lisati rakkudesse uus toitelahus. Katoodikambrid olid ühenduses 500 ml pudeliga, kuhu oli lisatud 300 ml toitelahust. MES rakke ja pudeleid hoidsid ühenduses tsirkulatsioonipumbad. Pudelid olid suletud ning pudeli korkide kaudu ühendati pudeliga argooniga täidetud õhupallid, vältimaks hapniku sattumist süsteemi. Tsirkulatsioonipumpade kiirus seati umbes 16 ml/minutis. Katsete vahepeal toideti iga kahe päeva tagant MES rakke toitelahusega.

Katse kestis korraga vahemikus 20–24 tundi, mille jooksul rakendati ühele MES rakule potentsiaali. Esiõõtsed mõõtmised veebruarist märtsini teostati iga katse alguses (kui rakkudesse oli lisatud toitelahus ning lastud sellele u 5 minutit ringleda) ning nendele järgnevatel tundidel 3 ± 1 h, 6 ± 1 h, 8 ± 1 h ning tundidel 20 ± 1 h, 24 ± 1 h. Alates kuuendast katsenädalast hakati katseid teostama selliselt, et esimene proov võeti katse alguses (0h), seejärel järgmisel päeval tundidel 16 ± 1 h, 18 ± 1 h, 20 ± 1 h). Iga katse käigus võeti iga raku katoodikambrist proovi 10 ml. Katse jooksul võeti seega kokku 4–6 proovi.



Joonis 7. MES rakud katse käigus.

2.5. Analüütilised vahendid ja meetodid

NH_4^+ -N mõõtmisteks kasutati Hach Lange DR 2800 spektrofotomeetrit. Katse viidi läbi Nessleri meetodit kasutades. Kõigepealt tsentrifugeeriti proovi 2 minutit. Tsentrifuug töötab pööratel 4000 pöört minutis, et eraldada vedel ja tahke faas. Seejärel võeti 1 ml tsentrifugeeritud

lahust ja viidi see 25 ml suurusesse mõõtekolbi. Mõõtekolb täideti Milli-Q veega umbes poole kolvini. Järgmisena lisati 3 tilka mineraalstabilisaatorit mõõtekolbi. Seejärel 2 tilka polüvinüülalkoholi. Järgnevalt täideti mõõtekolb Milli-Q veega kuni tähiseni. Seejärel lisati 1 ml Nessleri reagenti (0,09 mol/l kaalium-tetraiodomerkuraati(II) ($K_2[HgI_4]$) 2,5 mol/l kaaliumhüdroksiidis (KOH)). Oodati 2 minutit, et proov värvuks kollaseks. Peale kahe minuti möödumist mõõdeti proov koheselt. Spektrofotomeetri näit korrutati lahjenduse kordajaga (25x), et saada NH_4^+ -N kontsentratsioon.

NO_2^- -N ja NO_3^- -N mõõtmisteks olid kasutusel Metrohm 930 Compact IC Flex ionkromatograaf varustatud Metrohm 919 IC Autosampler plusiga. Kõigepealt tsentrifugiti proovi 2 minutit. Tsentrifuug töötas pöoretel 4000 pöoret minutis, et eraldada vedel ja tahke faas. Seejärel võeti 0,4 ml tsentrifuugitud lahust ja viidi see 25 ml suurusesse mõõtekolbi. Mõõtekolb täideti Milli-Q veega tähiseni, suleti korgiga ning raputati proovi ühtlustamiseks. Proov kanti ümber 10 ml mahtu ja asetati IC Autosampler Plus-i. IC tarkvara arvutas lahjendusastmeks 62,5 korda, et saada NO_2^- -N ja NO_3^- -N kontsentratsioonid.

Süsteemile vajalikku potentsiaali rakendati IVIUM Compactstat.e potentsiostaadiga. Proovide ettevalmistamiseks kasutati Eppendorfi Minispin mikrotsentrifuugi. pH mõõtmisel oli kasutusel Jenway 3520 pH-meeter. Potentsiaali mõõdeti võrreldes standardelektroodiga (SHE).

2.6. Arvutused

NH_4^+ -N, NO_2^- -N, NO_3^- -N ja kogulämmastiku (TN) ärastuse kiiruse arvutamisel lähtuti võrrandist (7) ja kiiruse ühikuks oli $mg\ N/m^2/d$. Võrrandina (võrrand 7) väljendub see kujul:

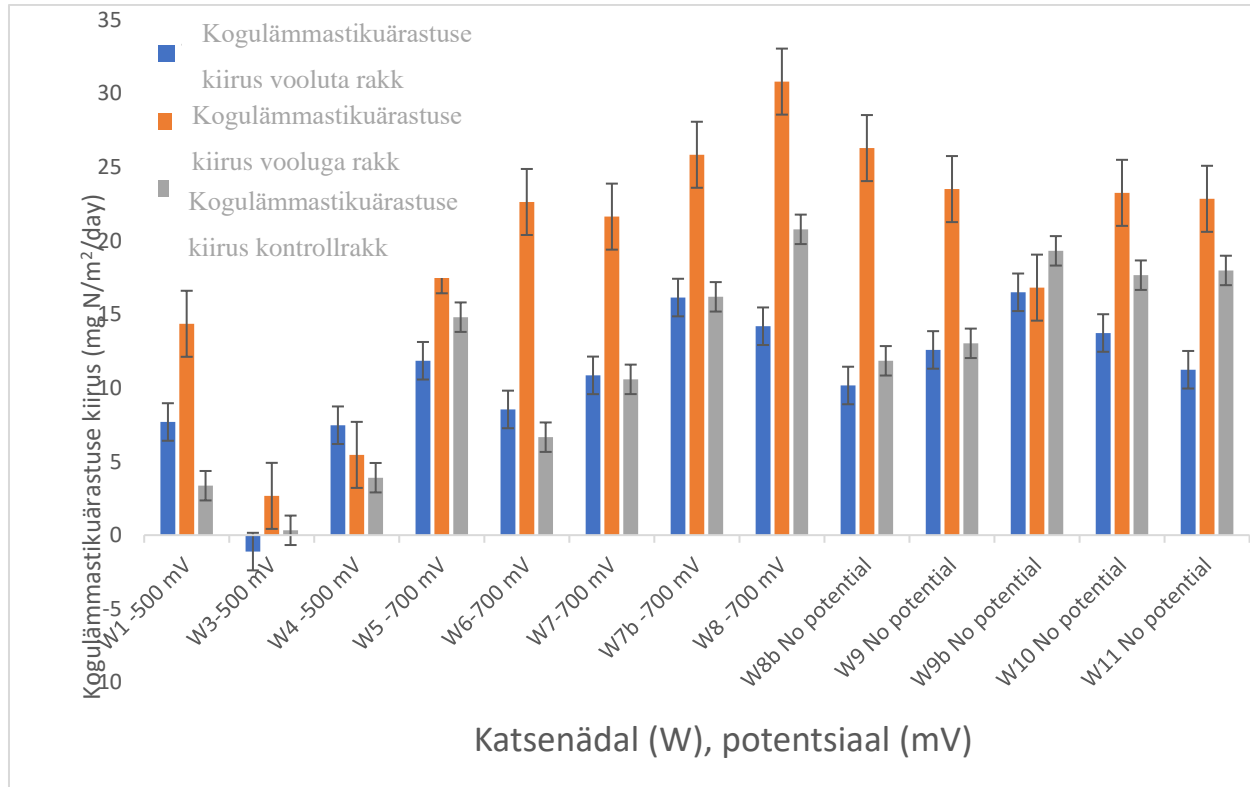
$$7) \text{ Ärastuskiirus} = \frac{C(\text{algne}) - C(\text{lõpp})}{\frac{S(\text{elektrood})}{t}}$$

C tähistab kontsentratsiooni (vastavalt alg- ja lõppkontsentratsioon $mg\ N\ L^{-1}$). S (elektrood) on elektroodi pindala katoodikambris (m^2) ning t on aeg, mis kulus katse sooritamiseks.

3. TULEMUSED

3.1. Katsete koondtulemused

Katsete kogulämmastiku ärastuskiiruste koondtulemused on näha Joonisel 8.

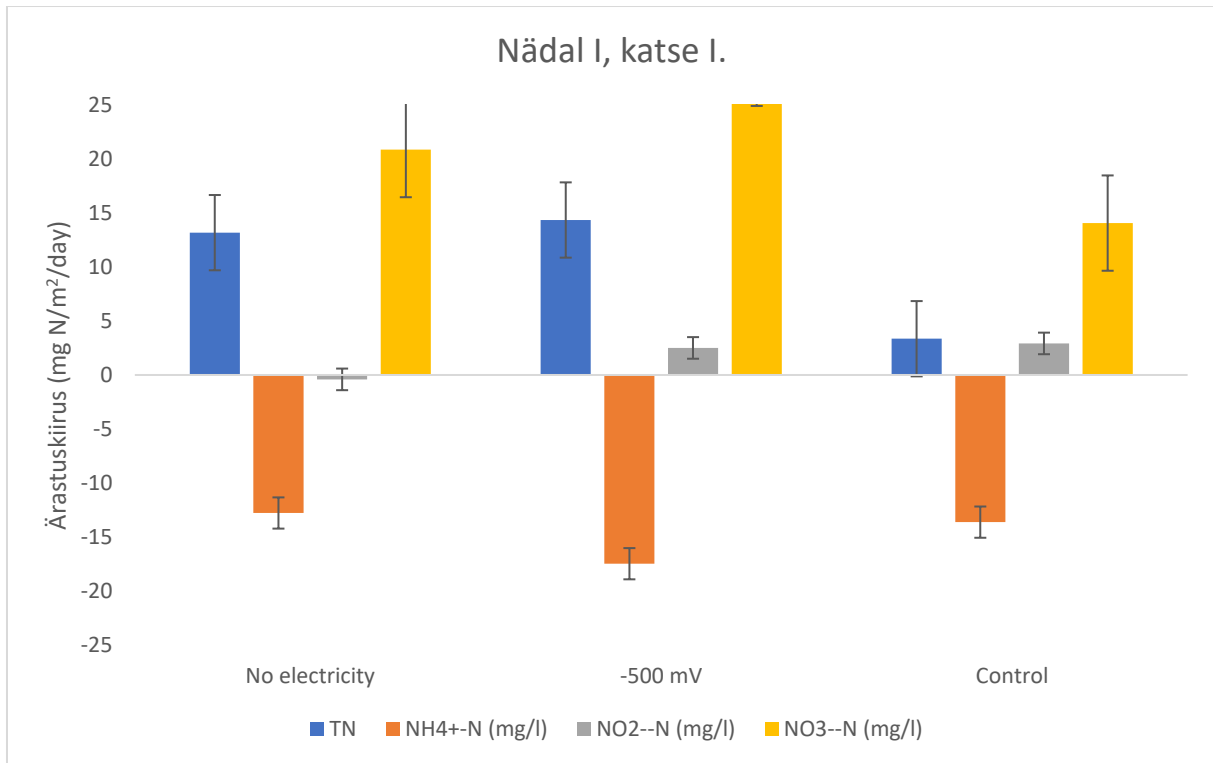


Joonis 8. Katsete koondtulemused. W-tähistab katsenädalat. No potential tähendab potentsiaalita katset. W9 puhul rakendati -700 mV esimesele MESile.

Koondtulemuste graafik (Joonis 8) toob esile, et muutused ärastuskiirustes on näha alates hetkest, mil süsteemile hakati rakendama potentsiaali -700 mV ning et ärastuskiirus on jätkuvalt suurim selles BESis, millele pidevalt potentsiaali rakendati, ka siis, kui potentsiaal sealt eemaldati. Täpsemalt on tulemused lahti seletatud järgnevatel alapeatükkides.

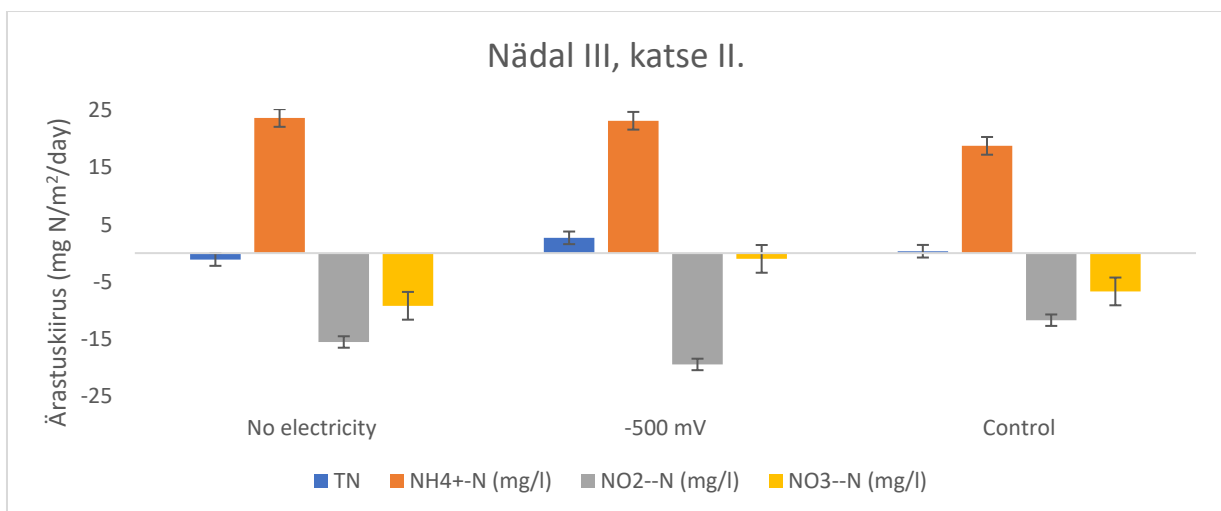
3.2. Esimesed kolm katset

Kolm esimest katset viidi läbi veebruaris ja märtsis 2019. Sellel ajal oli ühel MES rakul potentsiaal -500 mV. Mõõtmised teostati katse alguses ning nendele järgnevatel tundidel 3 ± 1 h, 6 ± 1 h, 8 ± 1 h ning tundidel 20 ± 1 h, 24 ± 1 h (vt Jooniseid 9, 10, 11). Ärastuskiirused joonistel esitatud keskmistena. Joonistel *No electricity* tähendab ilma pingeta rakku ning *Control* on kontrollrakk.



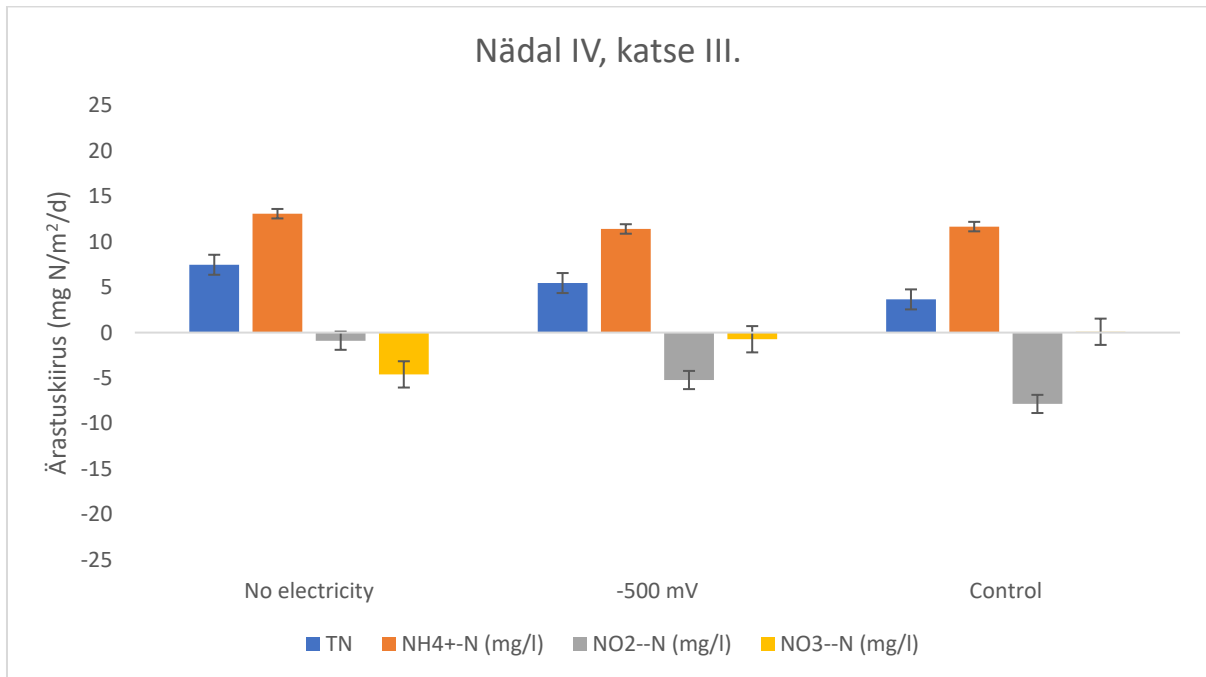
Joonis 9. I katse elektrodipotentsiaal -500 mV juures võrdluses vooluta rakkudega.

Esimesel katsel (vt Joonis 9) oli kogulämmastiku ärastuskiirus (TN) suurim potentsiaaliga MESis, ulatudes üle 14 mg N/m²/d. Ilma vooluta biomassiga MESis oli kogulämmastiku ärastuskiirus 13 mg N/m²/d ja kontrollrakus 3 mg N/m²/d. Esimese katse puhul ei tule veel esile potentsiaaliga ja potentsiaalita MESi erinevus. On näha lämmastikvormide muutumist ühest teiseks, mis näitab, et esialgses katses lämmastikuärastus anammox protsessiga alles harjub rakendatud potentsiaaliga ja vastavad ensüümide rajad pole veel aktiveerunud. Kogulämmastiku ärastus on kõikides MESides sarnane, 23±2 mg N L⁻¹. Kogulämmastiku ärastus saadud alg- ja lõppkontsentratsioonide lahutamisel.



Joonis 10. II katse -500 mV juures.

II katsel (vt Joonis 10) on kogulämmastiku ärastuskiirus suurim potentsiaaliga MESis, keskmiselt üle 2 mg N/m²/d. Võrreldes esimese katsega on see väiksem tulemus. See võib olla tingitud asjaolust, et vahepeal jäi katsetel üks nädal vahet ning sellel ajal potentsiaali MESile ei rakendatud. Süsteemides on toimunud NH₄⁺-N ärastus ning tekkinud juurde NO₂⁻-N ja NO₃⁻-N. Kogulämmastikku on pigem tekkinud juurde, muundudes ühest lämmastikvormist teise.



Joonis 11. III katse -500 mV juures.

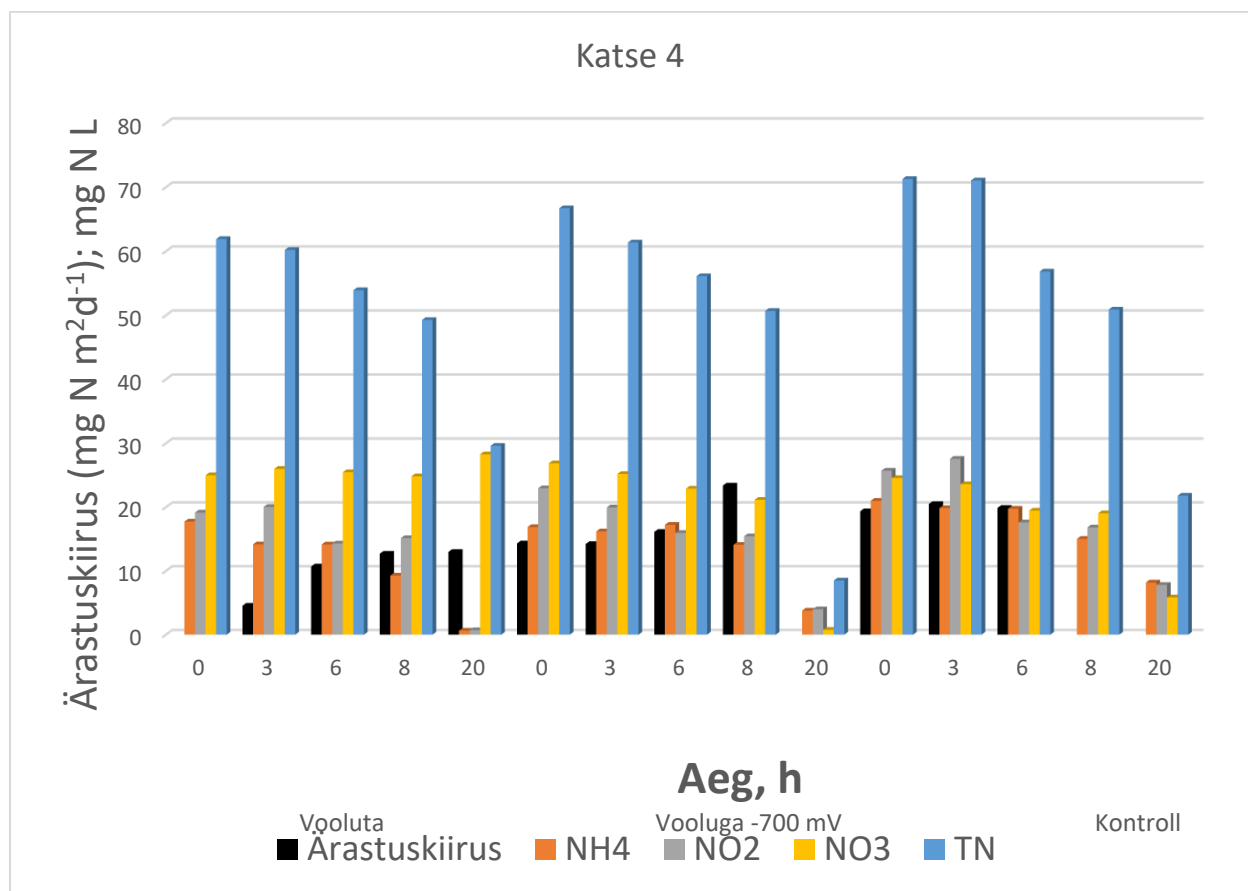
Kolmanda katse puhul (vt Joonis 11) on kiireim kogulämmastiku ärastus toimunud esimeses MESis, kus on biomass elektrivooluga harjutatud, aga potentsiaali sellele ei rakendata. Ärastuskiirus üle 7 mg N/m²/d. Kõikides MESides on toimunud NH₄⁺-N ärastus. Esimeses kahes rakus on katse lõpphetkeks ka NO₂⁻-N kontsentratsioon jõudnud 0 mg/l ning tekkinud juurde NO₃⁻-N, viidates anammox protsessi toimumisele. Kogulämmastiku ärastus on kahes esimeses biomassiga MESis sarnane, 18±3 mg N L⁻¹. Kontrollrakus on kogulämmastiku osakaal suurenenud, muundudes ühest lämmastikvormist teise.

Esimese kolme katsega -500 mV juures saavutati kõige suurem ärastuskiirus esimesel katsel, kus -500 mV potentsiaaliga MESis ärastati keskmiselt 14 mg N/m²/d. See on üle 4x suurem, kui sama katse kontrollrakus. Kolmandal nädalal on nii potentsiaalita kui potentsiaaliga MESis näha NH₄⁺-N ärastust ammoniumi täieliku tarbimisega. Märgatavalt langes ka NO₂⁻-N kontsentratsioon, kuigi esialgu selle kontsentratsioon suurenes, mistõttu on keskmine NO₂⁻-N ärastuskiirus ikkagi negatiivne. Tekkis juurde NO₃⁻-N. See viitab selgelt anammox bakterite

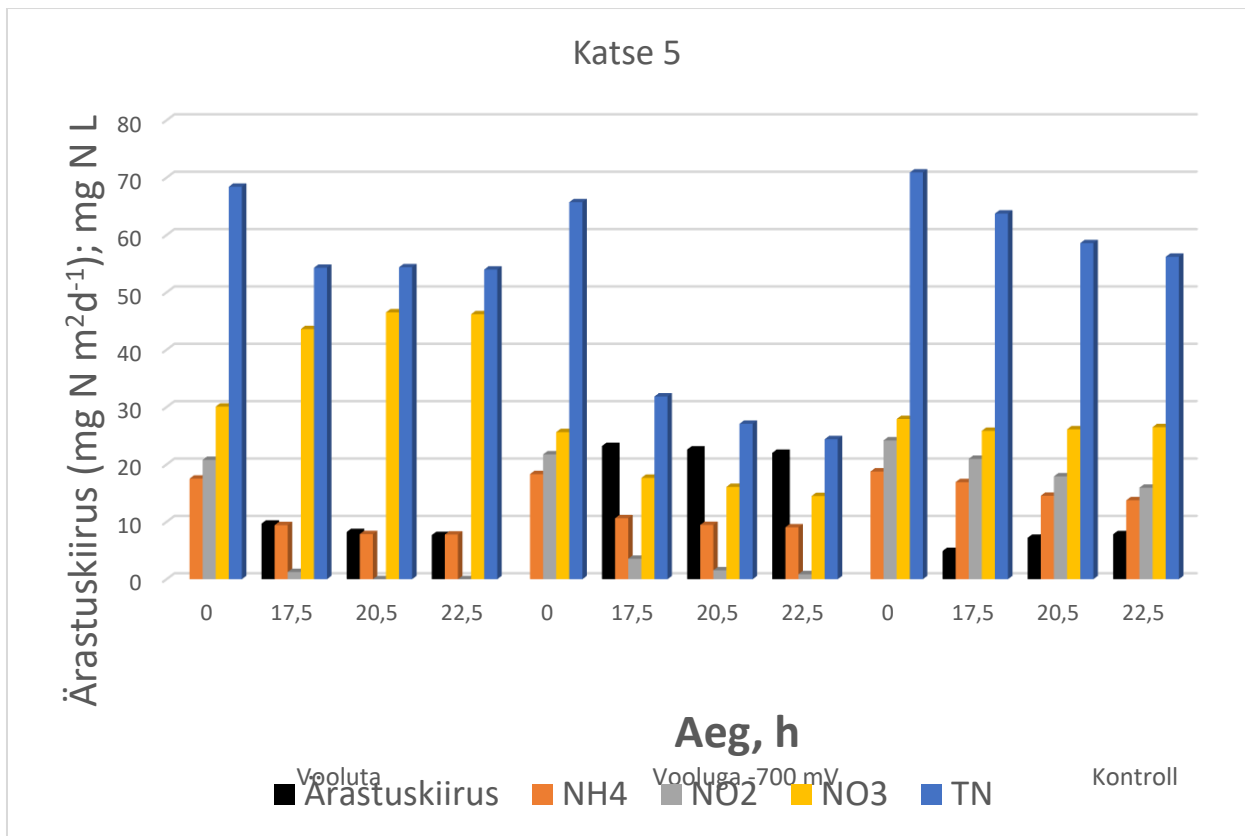
toimimisele. Küll aga ei tule -500 mV juures välja erisus potentsiaalita ja potentsiaaliga MESi vahel, mistõttu edasised mõõtmised teostati juba -700 mV-ga.

3.3. Katse proovivõtmise kellaegade vahetus

Alates viiendast katses hakati proovivõtmisi teostama katse alguses ning seejärel tundidel 16±1h, 18±1h, 20±1h. See muutus viidi sisse, kuna varasemate proovivõtmiste kellaegade puhul ei tulnud selgelt esile, millal lämmastikvormide muutused toimuma hakkavad. Muudetud proovivõtmise kellaajad näitavad seda selgemalt. Samuti sooviti näha ka katse lõpukellaegadel toimuvad muutused. Lämmastikvormide ja kogulämmastiku ärastuskiiruse muutused proovivõtmise erinevatel kellaegadel toodud Joonistel 12 ja 13.

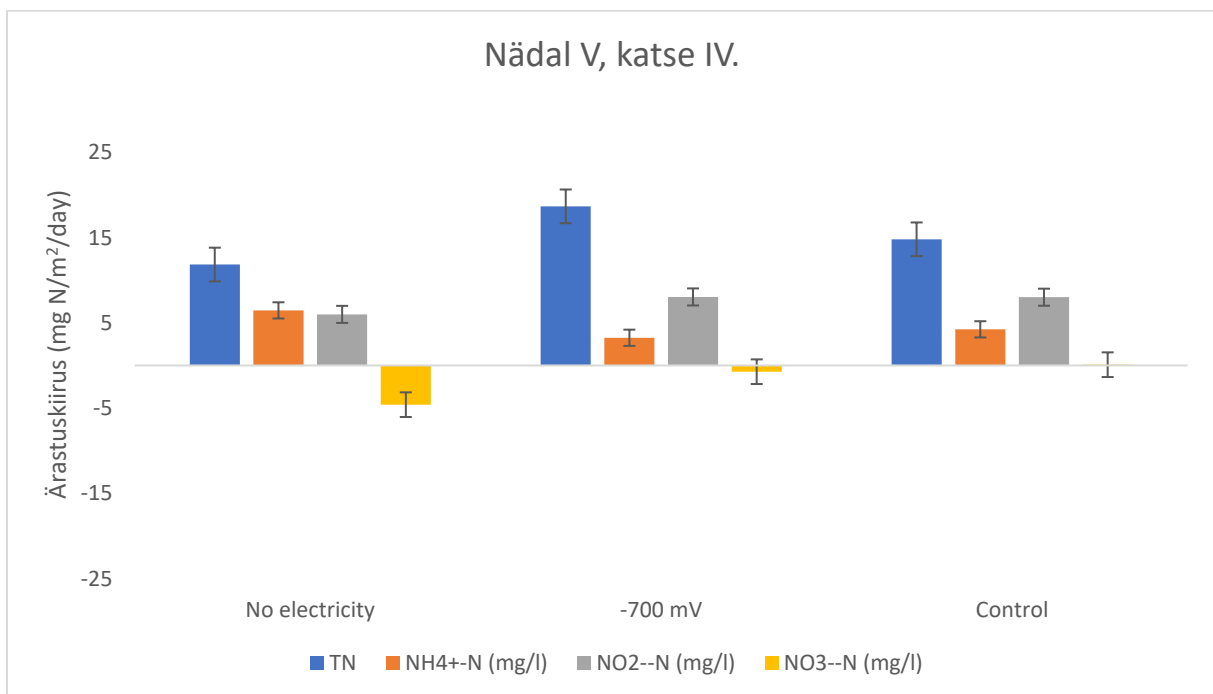


Joonis 12. Proovivõtmise ajad tundides algustundidel ja lõpus.



Joonis 13. Proovivõtmise ajad tundides algustunnil ja lõputundidel.

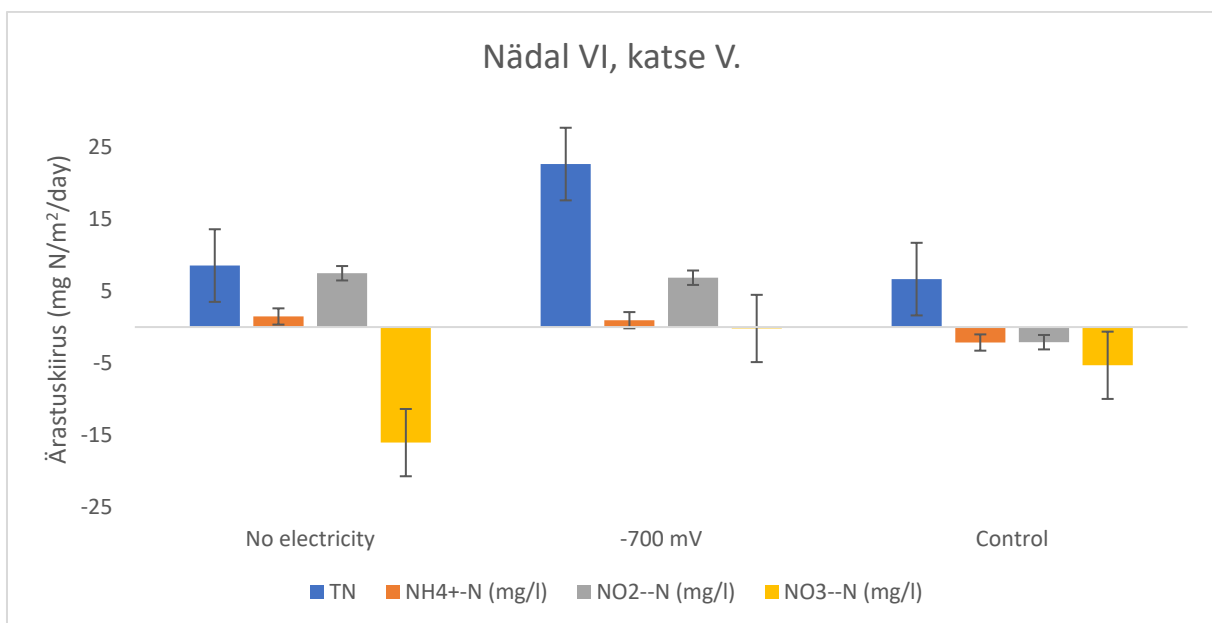
3.4. Katsed nädalatel viis kuni kaheksa



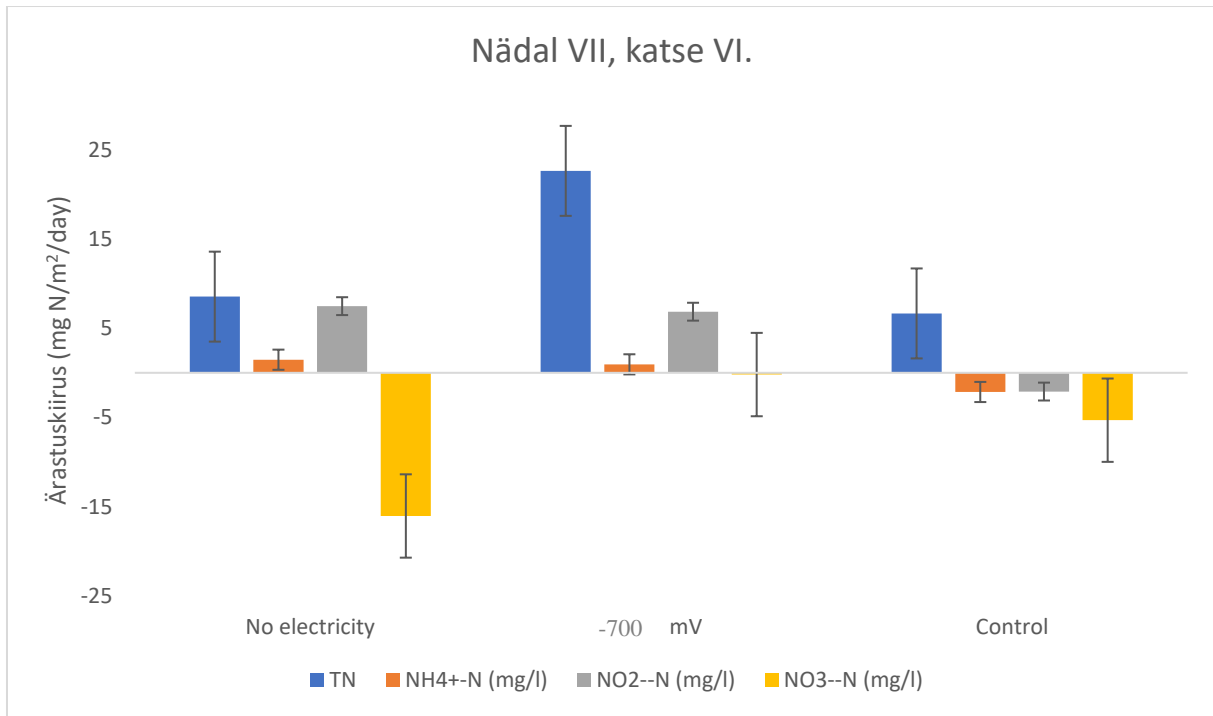
Joonis 14. MESile rakendatav potentsiaal -700 mV võrrelduna kontrollrakuga ja vooluga harjutatud, kuid selles katses potentsiaali mitte rakendatud rakuga.

Alates neljandast katsest rakendati süsteemile potentsiaali -700 mV (vt Joonis 14). Peale nädalast süsteemi harjutamist -700 mV on kahe esimese MES raku erisus juba rohkem nähtavam kui -500 mV puhul. -700 mV juures on ärastuskiirus 18 mg N/m²/d. Potentsiaalita raku on see 11 mg N/m²/d ja kontrollraku 14 mg N/m²/d. On näha NO₂⁻-N ja NH₄⁺-N vähenemist biomassiga rakkudes ning NO₃⁻-N teket, viidates anammox protsessi toimumisele. Kogulämmastiku ärastus on suurim potentsiaaliga MESis. Kogulämmastiku ärastus on 58 mg N L⁻¹. Peaaegu kõik lämmastikvormid on katse lõpuhetkeks ärastatud täielikult, saavutades ärastusprotsendiks 87%. Sellise kõrge ärastuseni võis viia üleminek -500 mV-lt -700 mV-le. Potentsiaalita biomassiga MESis on kogulämmastiku ärastus 32 mg N L⁻¹ ning kontrollraku 49 mg N L⁻¹. Potentsiaalita biomassiga MESi ja kontroll MESi erisus võib tulla sisse sellest, et kontrollraku on olemas bakterid ärastavad lämmastikühendeid erinevate protsesside kaudu.

Viiendal katsel (vt Joonis 15) on ärastuskiirus kogulämmastikul tõusnud -700 mV MESis 22 mg N/m²/d. Potentsiaalita biomassiga MESis on see 8 mg N/m²/d ning kontrollraku 6 mg N/m²/d. Seega -700 mV MESi ärastuskiirus on peaaegu 3x kiirem kui ainult biomassiga MES raku ning üle 3x kiirem kui kontrollraku. On vähenenud nitraadi NO₃⁻-N osakaal -700 mV MES raku, viidates selle muutumisele N₂ks. Biomassiga potentsiaalita MESi ja kontrollraku protsessides on näha erinevust. Biomassiga potentsiaalita raku on toimunud NO₂⁻-N ja NH₄⁺-N ärastus ning NO₃⁻-N teke, viidates anammox protsessi toimumisele. Kontrollraku on ärastuskiirused väiksemad ning seetõttu negatiivse väärtusega. Jätakuvalt on kogulämmastiku ärastus suurim potentsiaaliga MESis, 41 mg N L⁻¹. Potentsiaalita biomassiga MESis ja kontrollraku on see 14 mg N L⁻¹.

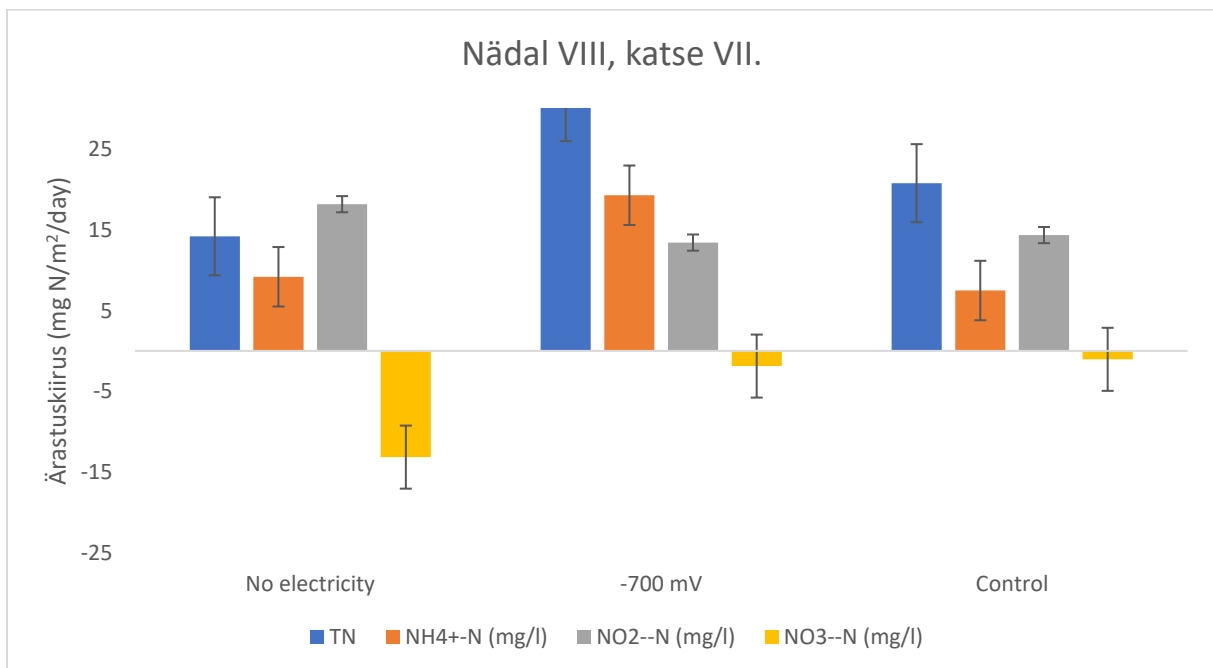


Joonis 15. Katse V -700 mV.



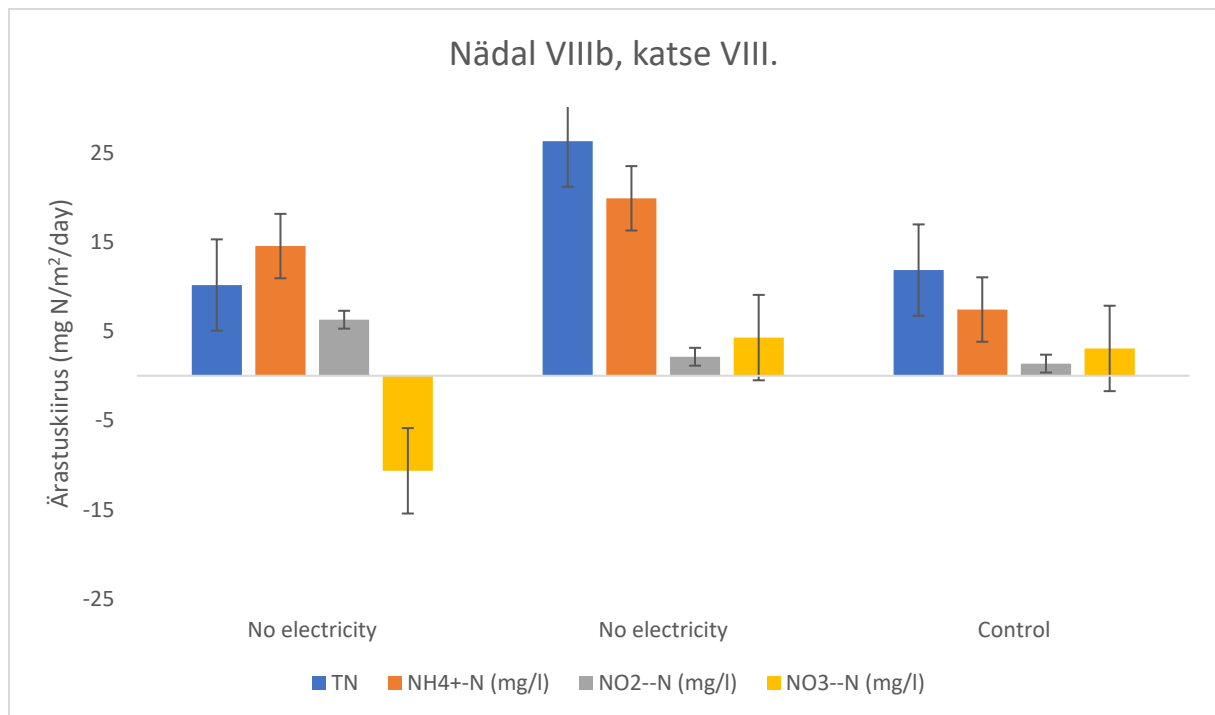
Joonis 16. Katse VI -700 mV.

VII nädalal toimunud katseid (vt Joonis 16) iseloomustab kogulämmastiku ärastuskiirus -700 mV rakus 21 mg N/m²/d. Kahes ülejäänus rakus on see 10 mg N/m²/d. Kogulämmastiku ärastus potentsiaaliga rakus on 2x kiirem kui ülejäänud rakkudes. Samamoodi võib näha, et potentsiaaliga süsteemis on toimunud NO₃⁻-N ärastus. Kogulämmastiku ärastus on suurim potentsiaaliga MESis, 42 mg N L⁻¹. Potentsiaalita biomassiga MESis ja kontrollrakus on see 22±1 mg N L⁻¹.



Joonis 17. Katse VII -700 mV.

VIII nädala katses (vt Joonis 17) on näha, et süsteemid on harjunud olemasoleva keskkonnaga ning kogulämmastiku ärastus -700 mV MESis on siiani suurim: 30 mg N/m²/d. Potentsiaalita MESis on kogulämmastiku ärastuskiirus 14 mg N/m²/d ja kontrollrakus 20 mg N/m²/d. Seega on potentsiaaliga MESi ärastuskiirus 2x kiirem kui vaid biomassiga MESil ning 1,5x kiirem kui kontrollrakus. NO₂⁻-N ja NH₄⁺-N osakaal on vähenenud kõige rohkem potentsiaaliga MESis ning tekkinud NO₃⁻-N kogus viitab anammox protsessi toimumisele. Kogulämmastiku ärastus on suurim potentsiaaliga MESis, 51 mg N L⁻¹. Potentsiaalita biomassiga MESis on see 26 mg N L⁻¹ ja kontrollrakus 36 mg N L⁻¹. See, et kogulämmastiku ärastuskiirus iga katsenädalaga suureneb, näitab seda, et anammox bakterid vajavad kohanemiseks aega. Mida pikemalt saavad anammox bakterid kohaneda ja harjuda, seda paremaid ja kiiremaid tulemusi võib oodata. Iga nädalaga on suurenenud ka kogulämmastiku ärastus, enim potentsiaaliga MESis, kinnitades samuti anammox bakterite aeglast kohanemist.



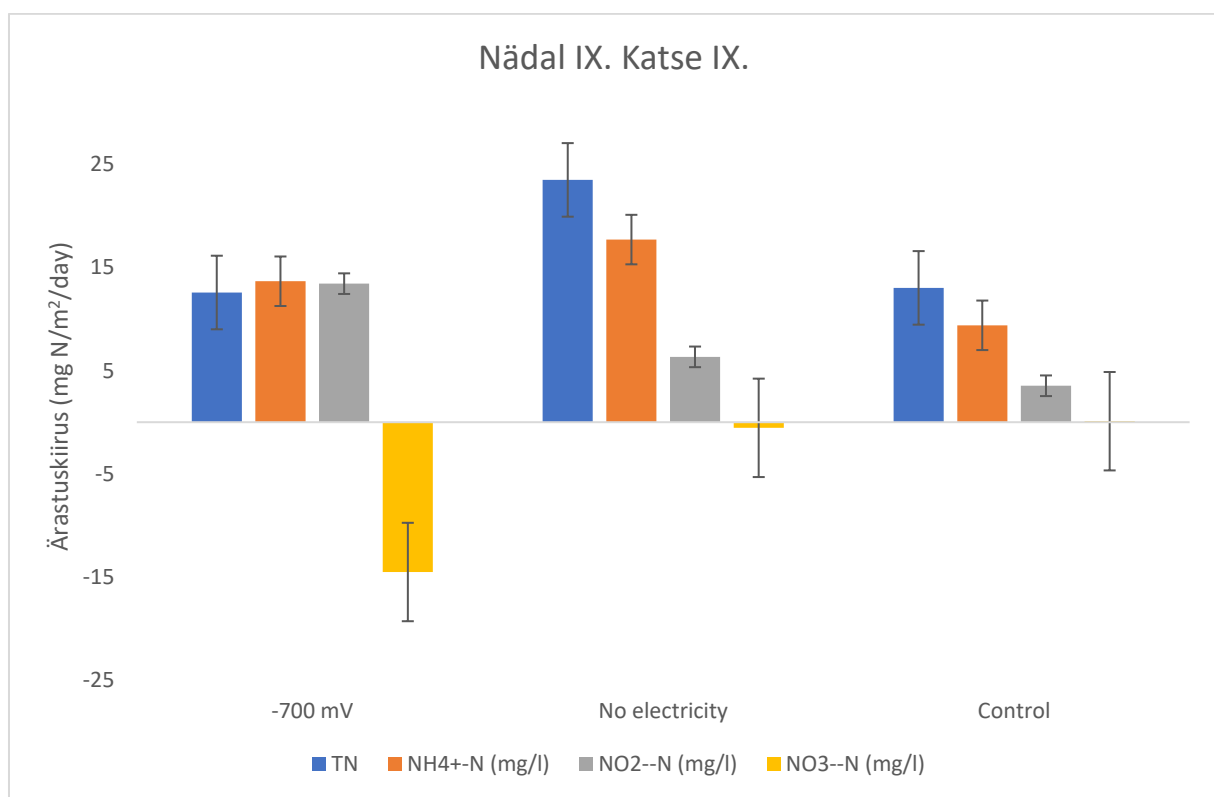
Joonis 18. Katse VIIIb ilma potentsiaalita.

Katse VIIIb puhul (vt Joonis 18) on tegemist kontrollkatsega, kus kummalegi biomassiga MESile ei rakendatud potentsiaali. Potentsiaali mõju bakteritele on aga püsiv, sest ka ilma potentsiaali rakendamata on teises MES rakus kogulämmastiku ärastuskiirus kõige suurem: 26 mg N/m²/d. Pidevalt potentsiaalita olnud MESis on kogulämmastiku ärastuskiirus 10 mg N/m²/d ja kontrollrakus 11 mg N/m²/d. Seega on ärastuskiirus teises rakus ikkagi poole suurem. Kogulämmastiku ärastus on suurim varasemalt potentsiaaliga olnud MESis, 46 mg N L⁻¹.

Pidevalt potentsiaalita biomassiga MESis on see 12 mg N L^{-1} ja kontrollrakus 23 mg N L^{-1} . See näitab jällegi, et anammox bakterid on aeglased kohanejad ning muutused anammox bakteritega keskkondades võtavad aega. Peale seda katset tuli biomass teiselt rakult ehk -700 mV raku elektrodilt lahti, mistõttu edasi rakendatakse potentsiaali esimesele MESile.

3.5. Lahti tulnud biomass ja sellele järgnev

Alates 11.04.2019 rakendati potentsiaali esimesele MESile ehk sellele, kus varem oli vaid biomass. Selliselt viidi läbi üks katse. Katse tulemused on näha Joonisel 19. Peale seda eemaldati potentsiaal kõikidelt MESidelt ja viidi läbi kolm katset, jälgimaks süsteemide taastumist ja muutuseid ärastuskiirustes.



Joonis 19. Katse IX, potentsiaal esimesel MESil.

Esialgu veel ei anna potentsiaali rakendamine esimesele biomassile tulemust. Jätakuvalt on teine MES rakk kõige kiirema kogulämmastiku ärastuskiirusega. Lämmastikuärastuse kiirused vastavalt $23 \text{ mg N/m}^2/\text{d}$ potentsiaalita MESis (varasemalt rakendatud sellele -700 mV), $12 \text{ mg N/m}^2/\text{d}$ potentsiaaliga MESis ja $13 \text{ mg N/m}^2/\text{d}$ kontrollrakus. Kogulämmastiku ärastus on suurim varasemalt potentsiaaliga olnud MESis, 40 mg N L^{-1} . Pidevalt potentsiaalita, kuid selles katses -700 mV potentsiaaliga opereeritud biomassiga MESis on see 19 mg N L^{-1} ja kontrollrakus 22 mg N L^{-1} .

Järgnevatel katsenädalalatel toimunud katsetel eemaldati potentsiaal kõikidelt rakkudelt, laskmaks süsteemidel taastuda. Viimase katse tulemused näitavad veel selgelt selles MESis kiiremat lämmastikuärastust, mis katsete jooksul pidevalt potentsiaali all oli. Ärastuskiirus selles 23 mg N/m²/d. MESis, mis oli pidevalt potentsiaalita, 11 mg N/m²/d ja 18 mg N/m²/d kontrollrakus. Kogulämmastiku ärastus on suurim varasemalt potentsiaaliga olnud MESis 34 mg N L⁻¹. Pidevalt potentsiaalita biomassiga MESis on see 11 mg N L⁻¹ ja kontrollrakus 32 mg N L⁻¹.

Muutused ärastuskiirustes on näha alates hetkest, mil süsteemile hakati rakendama potentsiaali -700 mV. Kuigi on leitud (Gregoire *et al.* 2014, Ding *et al.* 2018), et lämmastiku ärastuskiirused on kõige suuremad -400 mV kuni -500 mV potentsiaali juures ning seetõttu alustati ka selles töös kõigepealt -500 mV potentsiaaliga, siis võib eeldada, et selles magistritöös saavutatud tulemused tulenevad asjaolust, et süsteemid olid eelnevalt pikalt harjunud potentsiaali all elama. Ka Nava (2020) leidis, et kogulämmastiku ärastuskiirus on suurim -500 mV juures, ulatudes kuni 6,5 mg N/m²/day ning et -700 mV on pigem pärssivaks potentsiaaliks. Selline erisus võrreldes käesoleva uuringuga võib olla tingitud Nava (2020) katseperioodi lühemast pikkusest ning süsteemide väiksemast harjutatusest potentsiaaliga. Seega selle töö katsetingimustest lähtuvalt on -700 mV anammox bakteritele ärastust kiirendavaks potentsiaaliks. Mida pikemalt süsteemile potentsiaali tõstmist rakendada, seda paremaks lähevad tulemused ehk seda kiiremaks läheb kogulämmastiku ärastuskiirus aga ka kogulämmastiku ärastus, sest anammox bakterid harjuvad keskkonnaga järjest paremini. Selles uuringus leitud ärastuskiirused potentsiaalita biomassiga rakus on väiksemad kui varasemalt leitud anammox protsessil põhinevad ärastuskiirused (Szatkowska *et al.* 2007; Regmi *et al.* 2015), mis võib olla tingitud varasemate katsete pikemast, üle aasta kestvast katseperioodist viidates jällegi sellele, et anammox bakterid on aeglaselt kohanejad.

Katse korratavusel peab kindlasti arvesse võtma seda, et esialgselt olid süsteemidel poolused vahetuses ehk rakendati negatiivset potentsiaali anoodile ning süsteemi sai harjutatud peaaegu 4 kuud potentsiaali all olemisega. See võis tagada katsete hetkeks anammox bakterite piisava harjutatuse potentsiaaliga. Edaspidiseks uurimiseks tuleb arvestada ka seda, et anammox bakterid paljunevad aeglaselt, seega on selline pikem periood vajalik ka edaspidisteks uurimisteks.

3.6. Bakterid

Bakterite rohkust MESides näitab läbiviidud 16S rRNA analüüs (vt Lisa 1, Lisa 2, Lisa 3). Kuigi eraldi mõõtmisi anoodikambritest ei teostatud, siis viidi läbi 16S rRNA järjestuse analüüs ka selle MESi anoodikambris, millele rakendati potentsiaali. Anoodi inokuleerimisel oli kõige suurem osakaal sugukonna *Brocadiaceae* esindajatel. Tegemist on ammooniumi oksüdeerivate bakteritega. Potentsiaaliga MESi anoodil samuti sugukonna *Brocadiaceae* esindajatel suurim osakaal, kuigi võrreldes anoodi inokuleerimisega, on nende osakaal üle viie korra vähenenud. Umbes kuus korda on vähenenud inokuleerimisega võrreldes ka *Candidatus Brocadia* esindajad, kuhu alla kuulub ka *Candidatus Brocadia anammoxidan* (vt Lisa 1).

Võrreldes inokuleeritud biomassiga on kõikide MESide katoodikambrites näha *Pseudomonas* bakterite osakaalu kasvu. Tegemist on denitrifitseerivate bakteritega, kes muudavad nitraadi õhulämmastikuks. Umbes viis korda on suurenenud *Nitrosomonas mobilis* liigi osakaal potentsiaaliga MESi katoodil. Selle bakteri abil muudetakse ammoonium nitritiks. Potentsiaaliga MESi katoodil on võrreldes inokuleeritud biomassiga *Candidatus Brocadia* (sh *Candidatus Brocadia anammoxidan*) esindajate osakaal suurenenud. Nende puhul on tegemist anammoxi läbiviivate bakteritega. Ka potentsiaalita biomassiga MESis on *Candidatus Brocadia* esindajate osakaal suurenenud, kuid mitte nii suures ulatuses, kui potentsiaaliga MESis, viidates sellele, et potentsiaali all paljunesid anammox bakterid edukamalt. *Candidatus Kuenenia* osakaal, samuti anammox bakteri osakaal, oli sarnane kõikides MESides (vt Lisa 2 ja Lisa 3).

KOKKUVÕTE

Selle magistritöö käigus uuritud anammox protsessil põhinevad bioelektrokeemilised süsteemid näitasid, et need on perspektiivikad ning edasist uurimist väärivad süsteemid. Olles harjunud pinge all elama, suutsid anammox bakterid uuritavas BESis ärastada anorgaanilist lämmastikku. Esimesel kolmel katsel katoodile rakendatav -500 mV ei andnud märgatavaid kogulämmastiku ärastuskiiruseid ega soovitud erisusi erinevate BESide vahel. Märgatavad erisused tekkisid -700 mV juures ning paranesid iga katsega. Esimesel -700 mV potentsiaalil läbiviidud katse andis kogulämmastiku ärastuskiiruseks 18 mg N/m²/d, olles üle 1,5x kiirem kui potentsiaalita rakus ning peaaegu 1,5x kiirem kui kontrollrakus. Viimasel katsel enne biomassi lahtitulekut saavutati kogulämmastiku ärastuskiiruseks juba kuni 30 mg N/m²/d. See on 2x kiirem kui vaid biomassiga MESil ning 1,5x kiirem kui kontrollrakus. Ka kogulämmastiku ärastus suurenes potentsiaaliga MESis katsete vältel, ulatudes kuni 58 mg N L⁻¹.

Kogulämmastiku ärastuskiirus jääb teises MESis, kus katsete jooksul rakendatud pidevalt potentsiaali, kõige kõrgemaks ka peale seda, kui biomass sealt lahti tuleb ning pinget hakatakse rakendama esimesele, varasemalt vaid biomassiga olnud rakule. Esimesel katsel on ärastuskiirus 23 mg N/m²/d potentsiaalita MESis (varasemalt rakendatud sellele -700 mV), olles nii peaaegu 2x kiirem kui potentsiaaliga MESis ja kontrollrakus. Ka potentsiaali eemaldamisel jääb ärastuskiirus kõige kiiremaks just selles MESis, kus pidevalt katsete jooksul rakendatud potentsiaali. Kogulämmastiku ärastuskiirus peale kolme katset ilma potentsiaali rakendamata on suurim MESis, kus varasemalt oli potentsiaal. Ärastuskiirus selles 23 mg N/m²/d, pidevalt potentsiaalita olnud MESist on see üle 2x kiirem ja peaaegu 1,5x kiirem kui kontrollrakus.

Võrreldes inokuleerimisega suurenes anammox bakterite *Candidatus Brocadia* (sh *Candidatus Brocadia anammoxidan*) osakaal BESides katsenädalate jooksul. Potentsiaalita biomassiga MESis on *Candidatus Brocadia* esindajate osakaal suurenenud, kuid mitte nii suures ulatuses, kui potentsiaaliga MESis, viidates sellele, et potentsiaali all paljunesid anammox bakterid edukamalt. Järelikult soosib -700 mV potentsiaaliga rakendatud keskkond anammox bakterite paljunemist. Samas kinnitas töö, et anammox bakterid on aeglased kohanejad. Iga katsenädalaga paranevad ärastuskiirused viitavadki sellele, et bakterid vajavad keskkonnaga kohanemiseks ja paljunemiseks piisavalt aega. Samuti näitab seda asjaolu, et ka potentsiaali eemaldamisel on kogulämmastiku ärastuskiirus suurim selles MESis, kus varasemalt pidevalt potentsiaali rakendatud.

Kuigi samal põhimõttel toimivat süsteemi on uuritud ennegi (Nava 2020), siis kindlasti annaks edasised uurimised rohkem andmeid, mis võimaldaks teha paremaid järeldusi. Traditsiooniline reoveepuhastus on väga kulukas ja aeganõudev protsess ning selle töö uurimisteema edasiarendamine võib muuta reoveepuhastust kiiremaks ja kaasaegsemaks. Selle töö uurimiseesmärk oli teada saada, kuidas elektriline potentsiaal mõjutab lämmastiku ärastuskiirust. On näha, et potentsiaaliga BESis on lämmastiku ärastuskiirus enamasti 2x kiirem kui tavalises, lihtsalt anammox protsessil põhinevas süsteemis. Seega võiks kindlasti uurida edasi, kas selliselt on võimalik saada ka suuremaid ärastuskiiruseid suures mahus süsteemides.

VIIDATUD ALLIKATE LOETELU

Ahn, Y-H. (2006) Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry* Vol 41, Issue 8, pp. 1709–1721. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.033>.

Bajracharya, S., Sharma, M., Mohanakrishna, G., Benneton, X. D., Strik, D. P. B. T. B., Sarma, P. M. & Pant, D. (2016) An overview on emerging bioelectrochemical systems (BESs): Technology for sustainable electricity, waste remediation, resource recovery, chemical production and beyond. *Renewable Energy*, vol. 98, pp. 153–170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.002>.

Cho, S., Kambey, C. & Nguyen, V. K. (2020) Performance of Anammox Processes for Wastewater Treatment: A Critical Review on Effects of Operational Conditions and Environmental Stresses. *Water*, vol. 12, 1. DOI:10.3390/w12010020.

Ding, A., Zhao, D., Ding, F., Du, S., Lu, H., Zhang, M. & Zheng, P. (2018) Effect of inocula on performance of bio-cathode denitrification and its microbial mechanism. *Chemical Engineering Journal*, Vol 343, pp. 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.02.119>.

Ding, W., Cheng, S., Yu, L. & Huang, H. (2017) Effective swine wastewater treatment by combining microbial fuel cells with flocculation. *Chemosphere*, vol. 182, pp. 567–573. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.006>.

Euroopa Komisjon. (2010) ELi nitraadidirektiiv; <https://ec.europa.eu/environment/pubs/pdf/factsheets/nitrates/et.pdf>.

European Commission. (2013) Bioelectrochemical systems. Wastewater treatment, bioenergy and valuable chemicals delivered by bacteria. *Science for Environment Policy*, Issue 5. https://ec.europa.eu/environment/integration/research/newsalert/pdf/FB5_en.pdf.

Fan, N.-S., Bai, Y.-H., Wu, J., Zhang, Q., Fu, J.-J., Zhou, W.-L. Huang, B.-C. & Jin, R.-C. (2020) A two-stage anammox process for the advanced treatment of highstrength ammonium wastewater: Microbial community and nitrogen transformation. *Journal of Cleaner Production*, vol. 261. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121148>.

Gregoire, K. P., Glaven, S. M., Hervey, J., Lin, B. & Tender, L. M. (2014) Enrichment of a High-Current Density Denitrifying Microbial Biocathode. *Journal of The Electrochemical Society*, 161, pp. 3049–3057. DOI:10.1149/2.0101413JES.

Hauck, M., Maalcke-Luesken, F. A., Jetten, M. S. M. & Huijbregts, M. A. J. (2016) Removing nitrogen from wastewater with side stream anammox: What are the trade-offs between environmental impacts? *Resources, Conservation and Recycling*, Volume 107, pp. 212–219, <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2015.11.019>.

Jourdin, L. & Burdyny, T. (2021) Microbial Electrosynthesis: Where Do We Go from Here? *Trends in Biotechnology*, vol. 39, issue 4, pp. 359–369. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.10.014>.

Junga, S., Leeb, J., Parkc, Y.-K. & Kwon, E. E. (2020) Bioelectrochemical systems for a circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, vol. 300, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122748>.

Kala, K. (2017) Peamiste Eestis kasutatavate reovee puhastustehnoloogiate tegelik ja arvutuslik elektri erikulu. Magistritöö. Tallinna Tehnikaülikool Tartu kolledž.

Kartal, B., Kuenen, J. G. & van Loosdrecht, M. C. M. (2010) Sewage Treatment with Anammox. *Science* 07, Vol 328, Issue 5979, pp. 702–703. DOI: 10.1126/science.1185941.

Keskkonnaminister. (2019a) Nõuded reovee puhastamise ning heit-, sademe-, kaevandus-, karjääri- ja jahutusvee suublasse juhtimise kohta, nõuetele vastavuse hindamise meetmed ning saasteainesisalduse piirväärtused. RT I, 12.11.2019, 6.

Keskkonnaminister. (2019b) Keskkonnaministri 08.11.2019 määrus nr 61 „Nõuded reovee puhastamise ning heit-, sademe-, kaevandus-, karjääri- ja jahutusvee suublasse juhtimise kohta, nõuetele vastavuse hindamise meetmed ning saasteainesisalduse piirväärtused“ Lisa 1.

Kokabian, B., Gude, V. G., Smith, R. & Brooks, J. P. (2018) Evaluation of anammox biocathode in microbial desalination and wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, Vol 342, pp. 410–419. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.02.088>.

Kuenen J. G. (2008) Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology*, vol 6, pp. 320–326.

Kõrgmaa, V., Tenno, T., Gross, M., Kriipsalu, M., Kivirüüt, A., Maastik, A., Tamm, P., Värk, V., Karabelnik, K. & Terase, H. (2016). Juhend reoveepuhasti rajamiseks või ümberehitamise korraldamiseks. Eesti Keskkonnauuringute Keskus OÜ, Kesklabor, Tallinn.

Laureni, M., Weissbrodt, D. G., Szivak, I., Robin, O., Nielsen, J. L., Morgenroth, E. & Joss, A. (2015) Activity and growth of anammox biomass on aerobically pre-treated municipal

wastewater. *Water Research*, vol. 80, pp. 325–336.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.04.026>.

Li, J., Peng, Y., Gao, R., Yang, L., Deng, L., Zhao, Q., Liu, Q., Li, X., Zhang, Q. & Zhang, L. (2021) Highly enriched anammox within anoxic biofilms by reducing suspended sludge biomass in a real-sewage A²/O process. *Water Research*, vol. 194.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116906>.

Mandel, A., Zekker, I., Jaagura, M. & Tenno, T. (2019) Enhancement of anoxic phosphorus uptake of denitrifying phosphorus removal process by biomass adaption. *International Journal of Environmental Science and Technology* <https://doi.org/10.1007/s13762-018-02194-2>.

Meng, H., Yang, Y-C., Lin, J-G., Denecke, M. & Gu, J-D. (2017) Occurrence of anammox bacteria in a traditional full-scale wastewater treatment plant and successful inoculation for new establishment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 120, pp. 224–231.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.022>.

Mulder, A. (1989) Anoxic ammonia oxidation. European Patent Office—EP 0327184 A1, 2 February 1989. <https://data.epo.org/publication-server/rest/v1.0/publication-dates/19890809/patents/EP0327184NWA1/document.html>.

Nava, A. I. M. (2020) Nitrogen removal in anaerobic ammonium oxidation process-based bioelectrochemical system. Master's Thesis. University of Tartu.

Noori, T. M., Mohan, S. V. & Min, B. (2021) Microbial electrosynthesis of multi-carbon volatile fatty acids under the influence of different imposed potentials. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, vol. 45. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2021.101118>.

Osset-Álvarez, M., Rovira-Alsina, L., Pous, N., Blasco-Gómez, R., Colprim, J., Balaguer, M. D. & Puig, S. (2019) Niches for bioelectrochemical systems on the recovery of water, carbon and nitrogen in wastewater treatment plants. *Biomass and Bioenergy*, vol. 130.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105380>.

Pant, D., Singh, A., Van Bogaert, G., Olsen, S. I., Nigam, P. S., Diels, L. & Vanbroekhoven, K. (2012) Bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy production and product recovery from organic wastes and industrial wastewaters. *RSC Advances*, vol. 2, pp 1248–1263.
<https://doi.org/10.1039/C1RA00839K>.

Rabaey, K. & Rozendal, R. A. (2010) Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, pp. 706–716. DOI: 10.1038/nrmicro2422.

Regmi, P., Holgate, B., Miller, M. W., Park, H., Chandran, K., Wett, B., Murthy, S. & Bott, C. B. (2015) Nitrogen polishing in a fully anoxic anammox MBBR treating mainstream nitrification-denitrification effluent. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 113, Issue 3, pp. 635–642. <https://doi-org.ezproxy.utlib.ut.ee/10.1002/bit.25826>.

Rodriguez Arredondo, M., Kuntke, P., Jeremiase, A. W., Sleutels, T. H. J. A., Buisman, C. J. N. & ter Heijne A. (2014) Bioelectrochemical systems for nitrogen removal and recovery from wastewater. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2015, 1, 22–33. <https://doi.org/10.1039/C4EW00066H>.

San-Martín, M. I., Mateos, R., Carracedo, B., Escapa, A. & Morán, A. (2018) Pilot-scale bioelectrochemical system for simultaneous nitrogen and carbon removal in urban wastewater treatment plants. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 126 No. 6, pp. 758–763. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.06.008>.

Schalk, J., Oustad, H., Kuenen J. G. & Jetten, M. S. M. (1998) The anaerobic oxidation of hydrazine: a novel reaction in microbial nitrogen metabolism. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 158, Issue 1, pp. 61–67, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12801.x>.

Shaw, D. R., Ali, M., Katuri, K. P., Gralnick, J. A., Reimann, J., Mesman, R., van Niftrik, L., Jetten, M. S. M. & Saikaly, P. E. (2020) Extracellular electron transfer-dependent anaerobic oxidation of ammonium by anammox bacteria. *Nature Communications*, vol. 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16016-y>.

Sinninghe-Damste, J. S., Strous, M., W. Rijpstra, W. I. C., Hopmans, E. C., Genevasen, J. A. J., van Duin, A. C. T., van Niftrik, L. A. & Jetten, M. S. M. (2002) Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature*, vol. 419. pp. 708–712. <https://doi-org.ezproxy.utlib.ut.ee/10.1038/nature01128>.

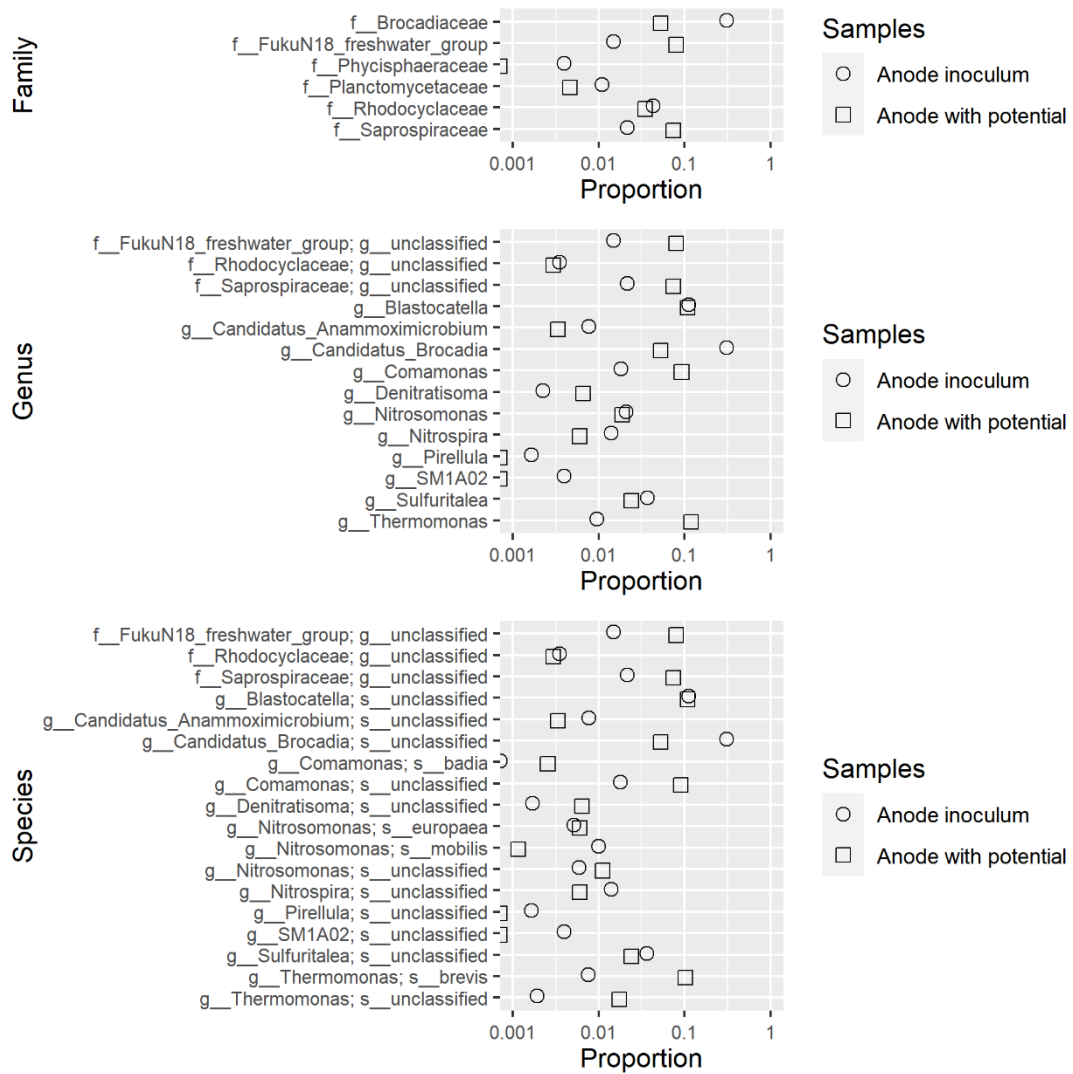
Szatkowska, B., Cema, G., Plaza, E., Trela, J. & Hultman, B. (2007). A one-stage system with partial nitrification and Anammox processes in the moving-bed biofilm reactor. *Water science and technology*, Vol. 55, pp. 19–26. DOI: 10.2166/wst.2007.237.

Sun, J., Cao, H. & Wang, Z. (2020) Progress in Nitrogen Removal in Bioelectrochemical Systems. *Processes*, vol. 8, issue 7, 831. <https://doi.org/10.3390/pr8070831>.

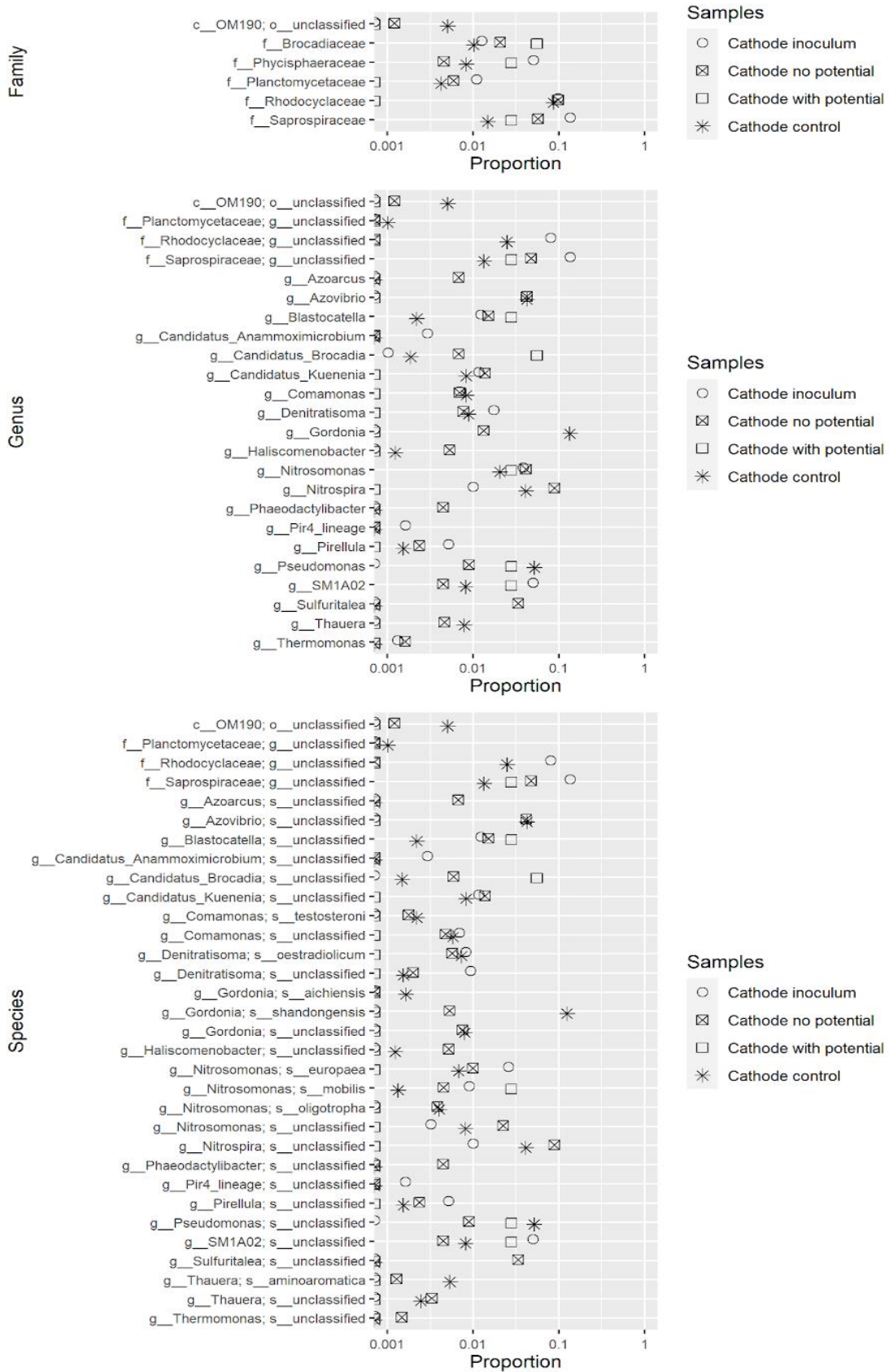
- Zekker, I., Bhowmick, G. D., Priks, H., Nath, D., Rikmann, E., Jaagura, M., Tenno, T., Tämm, K. & Ghangrekar, M. M. (2020) ANAMMOX-denitrification biomass in microbial fuel cell to enhance the electricity generation and nitrogen removal efficiency. *Biodegradation* (2020) 31:249–264 [https://doi.org/10.1007/s10532-020-09907-w\(0123456789\(\),-volV\)\(012345678](https://doi.org/10.1007/s10532-020-09907-w(0123456789(),-volV)(012345678).
- Zekker, I., Kivirüüt, A., Rikmann, E., Mandel, A., Jaagura, M., Tenno, T., Artemchuk, O., Rubin, S. & Tenno, T. (2019) Enhanced efficiency of nitrating-anammox SBR achieved at low decrease rates of oxidation-reduction potential. *Environmental engineering science*. <https://doi.org/10.1089/ees.2018.0225>.
- Zekker, I., Rikmann, E., Tenno, T., Loorits, L., Kroon, K., Fritze, H., Tuomivirta, T., Vabamäe, P., Raudkivi, M., Mandel, A., Rubin, S. S. C. D. C. & Tenno, T. (2015) Nitric oxide for anammox recovery in a nitrite-inhibited deammonification system. *Environmental Technology*, vol. 36, issue 19, pp. 2477–2487. <https://doi-org.ezproxy.utlib.ut.ee/10.1080/09593330.2015.1034791>.
- Zou, R., Hasanzadeh, A., Khataee, A., Yang, X., Xu, M., Andelidaki, I. & Zhang, Y. (2021) Scaling-up of microbial electrosynthesis with multiple electrodes for *in situ* production of hydrogen peroxide. *iScience*, vol. 24, issue 2. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102094>.
- Tamm, T. (2015) Projekti Quantum SpinOff õppemoodul: mikrobioloogiline kütuselement. Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituut.
- van Loosdrecht, M. C. M. (2008). Innovative nitrogen removal. In M. Henze, MCM. van Loosdrecht, GA. Ekama, & D. Brdjanovic (Eds.), *Biological wastewater treatment. Principles, modelling and design*, pp. 139–154.
- van Niftrik, L. & Jetten, M. S. M. (2012) Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria: Unique Microorganisms with Exceptional Properties. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 76 (3), pp. 585–596; DOI: 10.1128/MMBR.05025-1.
- Vilajeliu-Pons, A., Koch, C., Balaguer, M. D., Colprim, J., Harnisch, F. & Puig, S. (2018) Microbial electricity driven anoxic ammonium removal. *Water Research*, vol. 130, pp. 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.059>.
- Wang, H., Liu, Y., Du, H., Zhu, J., Peng, L., Yang, C. & Luo, F. (2021) Exploring the effect of voltage on biogas production performance and the methanogenic pathway of microbial electrosynthesis. *Biochemical Engineering Journal*, vol 171. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108028>.

Xin, J., Mingchao, M., Jun, L., Anhuai, L. & Zuoshen, Z. (2008) Bacterial Diversity of Active Sludge in Wastewater Treatment Plant. *Earth Science Frontiers* Volume 15, Issue 6, pp. 163–168. [https://doi.org/10.1016/S1872-5791\(09\)60015-4](https://doi.org/10.1016/S1872-5791(09)60015-4).

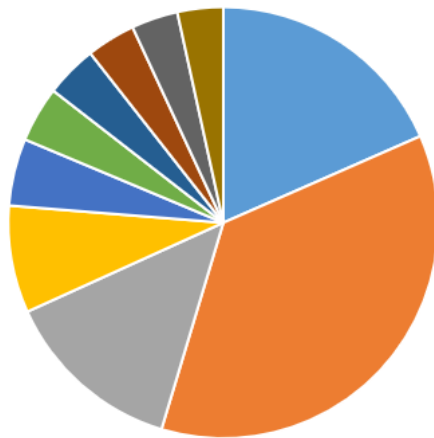
Lisa 1. 16S rRNA analüüs anoodikambris.



Lisa 2. 16S rRNA analüüs katoodikambrites.

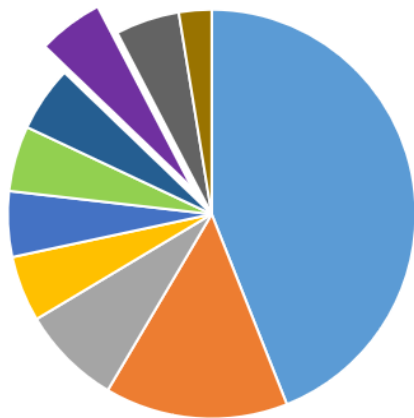


Lisa 3. 16S rRNA analüüs-osakaalud.



Inoculum Cathode

- d__Bacteria; p__Armatimonadetes; c__Planctomycetia; o__Planctomycetales; f__unclassified
- Other
- d__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Sphingobacteriia; o__Sphingobacteriales; f__Saprospiraceae; g__unclassified
- d__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Betaproteobacteria; o__Rhodocyclales; f__Rhodocyclaceae; g__Azoarcus_57% / Sulfititalea_11% / unclassified_10% / Ephemera_10% / Ferribacterium_3% / Azospira_3%
- d__Bacteria; p__Planctomycetes; c__Phycisphaerae; o__Phycisphaerales; f__Phycisphaeraceae; g__SM1A02; s__unclassified
- d__Bacteria; p__Deinococcus-Thermus; c__Deinococci; o__Deinococcales; f__Trueperaceae; g__Truepera; s__unclassified
- d__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Flavobacteriia; o__Flavobacteriales; f__Flavobacteriaceae; g__Flavobacterium; s__unclassified
- d__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidetes_VC2.1_Bac22; o__Planctomycetales; f__unclassified
- d__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Betaproteobacteria; o__Burkholderiales; f__Burkholderiaceae; g__Limnobacter; s__unclassified
- d__Bacteria; p__Chlorobi_77% / Gemmatimonadetes_7% / TM6_5% / Planctomycetes_1% / Armatimonadetes_1% / Gracilibacteria_1% / Parcubacteria_1%



MES Cathode

- Other
- d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Bacillaceae; g__Bacillus; s__niacini_30% / unclassified_19% / luciferensis_8% / drentensis_8% / bataviensis_5% / horikoshii_4% / firmus_3% / simplex_2% / novalis_2% / fumarioli_1% / licheniformis_1%
- d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Leuconostocaceae; g__Leuconostoc; s__lactis_34% / citreum_33% / garlicum_11% / mesenteroides_9% / palmae_5% / pseudomesenteroides_5%
- d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__unclassified_82% / [Eubacterium]_coprostanoligenes_group_4% / Ruminococcaceae_UCG-005_3% / Ruminococcaceae_UCG-014_2% / Ruminiclostridium_5_1%
- d__Bacteria; p__Chlorobi; c__Chlorobia; o__Chlorobiales; f__SJA-28; g__unclassified
- d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Fusicatenibacter; s__saccharivorans
- d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Lachnospiraceae_NC2004_group_78% / unclassified_8% / [Eubacterium]_oxidoreducens_group_2% / Lachnospiraceae_UCG-008_2% / [Ruminococcus]_gauvreauii_group_1%
- d__Bacteria; p__Planctomycetes; c__Planctomycetacia; o__Brocadiales; f__Brocadiaaceae; g__Candidatus_Brocadia; s__unclassified
- d__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Pseudomonadaceae; g__Pseudomonas; s__unclassified
- d__Bacteria; p__Acidobacteria; c__Blastocatellia; o__Subgroup_4; f__unclassified; g__Blastocatella; s__unclassified

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Triin Väisanen,

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

„Lämmastiku ärastuskiiruse uurimine anaeroobse ammooniumi oksüdeerimise (anammox) protsessil põhinevas bioelektrokeemilises süsteemis“,

mille juhendaja on Ivar Zekker,

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, alates 01.06.2024 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.

Triin Väisanen

01.06.2021

TÄNUSÕNAD

Suurimad tänusõnad mu juhendajale Ivarile, kes hoolimata mu pikaleveninud õpingutest aitas mind võiduka lõpuni.