

**TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL**

**KEEMIASTEHNIKA INSTITUUT**

**KEEMIASTEHNIKA ÕPPETOOL**

**FOTOKATALÜÜTILISELT TÖÖDELDUD  
ANTIBIOOTIKUMI SISALDAVA REOVEE  
AEROOBSE BIOOKSÜDATSIOONI UURIMINE**

**Magistritöö**

**Anastasia Laidna**

Juhendajad: Natalja Pronina, keemiatehnika õppetool, doktorant

Inna Kamenev keemiatehnika õppetool, dotsent

Keemia- ja keskkonnakaitse tehnoloogia õppekava KAKM02

2016

## **AUTORIDEKLARATSIOON**

Deklareerin, et käesolev bakalauresusetöö, mis on minu iseseisva töö tulemus, on esitatud Tallinna Tehnikaülikooli bakalaureusekraadi taotlemiseks ja et selle alusel ei ole varem taotletud akadeemilist kraadi.

Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud või (avaldamata tööde korral) toodud autorlus välja põhitekstis.

Anastasia Laidna

# Sisukord

Tähiste ja lühendite loetelu.....	5
Sissejuhatus .....	6
1 Kirjandusülevaade .....	7
1.1 Ravimite leidumine looduskeskkonnas ja sellega kaasnevad ohud .....	7
1.2 Doksütsükliini omadused ja toime .....	10
1.3 Antibiootikumide sisaldava reovee puhastusmeetodid .....	12
1.3.1 Aktiivmudaprotsess .....	12
1.3.1.1 Aktiivmudaprotsessi mehhanism ja seda mõjutavad faktorid.....	12
1.3.1.2 Antibiootikumide saatus aktiivmuda protsessi käigus .....	18
1.3.1.3 Aktiivmudaprotsessi eelised ja puudused .....	19
1.3.2 Kombineeritud süsteemid.....	20
1.3.2.1 Fenton- ja foto-Fenton-protsessi kombineerimine aktiivmudaprotsessiga	21
1.3.2.2 Osoonimise ja aktiivmudaprotsessi kombineerimine .....	22
1.3.2.3 Fotokatalüüsi ja bioloogiliste puhastusmeetodite kombineerimine .....	22
2 Eksperimentaalne osa .....	26
2.1 Katsete meetodika .....	26
2.1.1 Katseseadmed .....	26
2.1.2 Katse käik .....	29
2.1.3 Kasutatud reaktiivid .....	30
2.1.4 Analüüsimeetodika.....	31
2.1.4.1 Analüüsiseadmed .....	31
2.1.4.2 Doksütsükliini kontsentratsiooni määramine.....	32
2.1.4.3 Reovee ja aktiivmuda analüüs.....	34
2.2 Tulemused ja arutelu .....	35
2.2.1 Katse A tulemused.....	35
2.2.2 Katse B tulemused.....	42

Kokkuvõte .....	47
Summary .....	49
Kasutatud kirjandus .....	50

## Tähiste ja lühendite loetelu

<b>ABO</b>	Aeroobne biooksüdatsioon
<b>AOP</b>	Täiustatud oksüdatsiooniprotsessid (inglise k <i>advanced oxidation process</i> )
<b>AS</b>	Aktiivmuda (inglise k <i>activated sludge</i> )
<b>BHT</b>	Biokeemiline hapnikutarve
<b>CSTR</b>	Pidev segureaktor (inglise k <i>continuous stirred-tank reactor</i> )
<b>DOX</b>	Doksütsükliin
<b>FKO</b>	Fotokatalüütiline oksüdatsioon
<b>F/M</b>	Mudakoormus (inglise k <i>food to microbes ratio</i> )
<b>HRT</b>	Hüdrauliline viibimisaeg (inglise k <i>hydraulic retention time</i> )
<b>KHT</b>	Keemiline hapnikutarve
<b>KR</b>	Kombineeritud protsessi reaktor, milles puhastati fotokatalüütiliselt töödeldud mudelreovett
<b>LOS</b>	Lahustunud orgaaniline süsinik
<b>MBR</b>	Membraanbioreaktor
<b>MLSS</b>	Kuivjääk, tahkeainete kontsentratsioon (inglise k <i>mixed liquor suspended solids</i> )
<b>MLVSS</b>	Kuumutusjääk (inglise k <i>mixed liquor volatile suspended solids</i> )
<b>MR</b>	Mudelreovesi, mis ei sisalda antibiootikumi
<b>MR<sub>DOX</sub></b>	Mudelreovesi, mis sisaldab doksütsükliini
<b>OUR</b>	Mikroorganismide hapnikutarbimise kiirus (inglise k <i>oxygen uptake rate</i> )
<b>PDA</b>	Fotodiodrivi (inglise k <i>photodiode array</i> )
<b>SBR</b>	Annuspuhasti, perioodiline reaktor (inglise k <i>sequencing batch reactor</i> )
<b>SIM</b>	Valitud ionide seire (inglise k <i>selected ion monitoring</i> )
<b>sOUR</b>	Mikroorganismide hapnikutarbimise erikiirus (inglise k <i>specific oxygen uptake rate</i> )
<b>SPE</b>	Tahkefaasekstraktsioon (inglise k <i>solid phase extraction</i> )
<b>SRT</b>	Tahkiste viibeaeg (inglise k <i>solid retention time</i> )
<b>SV</b>	Muda maht (inglise k <i>sludge volume</i> )
<b>SVI</b>	Aktiivmuda mahuindeks (inglise k <i>sludge volume index</i> )
<b>TOC</b>	Üldine orgaaniline süsinik (inglise k <i>total organic carbon</i> )
<b>UV</b>	Ultraviolet (inglise k <i>ultraviolet</i> )
<b>VR</b>	Võrdlusreaktor, milles puhastati fotokatalüütiliselt töötlemata mudelreovett

## Sissejuhatus

Tänapäeval tarbitakse antibiootikume suurtes kogustes kogu maailmas ja eriti arenenud riikides. Tetratsükliinid avastati 1940. aastatel ja meditsiinis hakati neid kasutama 1960. aastatel. Tetratsükliinid on üks peamine antibiootikumide rühm, mida kasutatakse inimeste ja loomade ravimiseks. Kuna need antibiootikumid on väga laialdaselt kasutatavad, siis võivad nad sattuda veekeskkonda erinevatest allikatest, näiteks, olmereoveest, farmaatsiatööstuse reoveest jne. Antibiootikumide esinemisega vees võivad kaasnedä tõsised keskkonnaprobleemid. Seega pööratakse käesoleval ajal suurt tähelepanu antibiootikumide kõrvaldamisele veest.

Klassikalised reoveepuhastusjaamad pole võimelised antibiootikume täielikult lagundama ja nad võivad heitveega sattuda looduskeskkonda. Näiteks doksütsükliin, mis kuulub tetratsükliinide rühma, on raskesti biolagundatav ja lisaks adsorbeerub kergesti aktiivmudale ning võib sattuda reoveesetega või sellest toodetud kompostiga looduskeskkonda. Seega tuleb kasutada alternatiivseid meetodeid antibiootikumide lagundamiseks või kõrvaldamiseks reoveest. Tänapäeval uuritakse võimalusi raskestilagundavaid aineid, sealhulgas ka antibiootikume, sisaldava reovee puhastamiseks kasutades süvaoksüdatsioonimeetodeid ning nende kombinatsioone bioloogiliste puhastusprotsessidega.

Käesolev magistr töö teostati ETF grandiprojekti ETF8978 „Toksiliste keskkonnaohtlike ainete lagundamine vees fotokatalüüsi ja bioloogilise oksüdatsiooni kombineerimisel ning õhus fotokatalüüsiga“ raames TTÜ keemiatehnika instituudis.

**Käesoleva magistr töö põhieesmärk oli uurida fotokatalüüsi ja aktiivmudaprotsessi kombineerimise võimalikkust ning nende protsesside efektiivsust doksütsükliini sisaldava vee puhastamiseks.**

# 1 Kirjandusülevaade

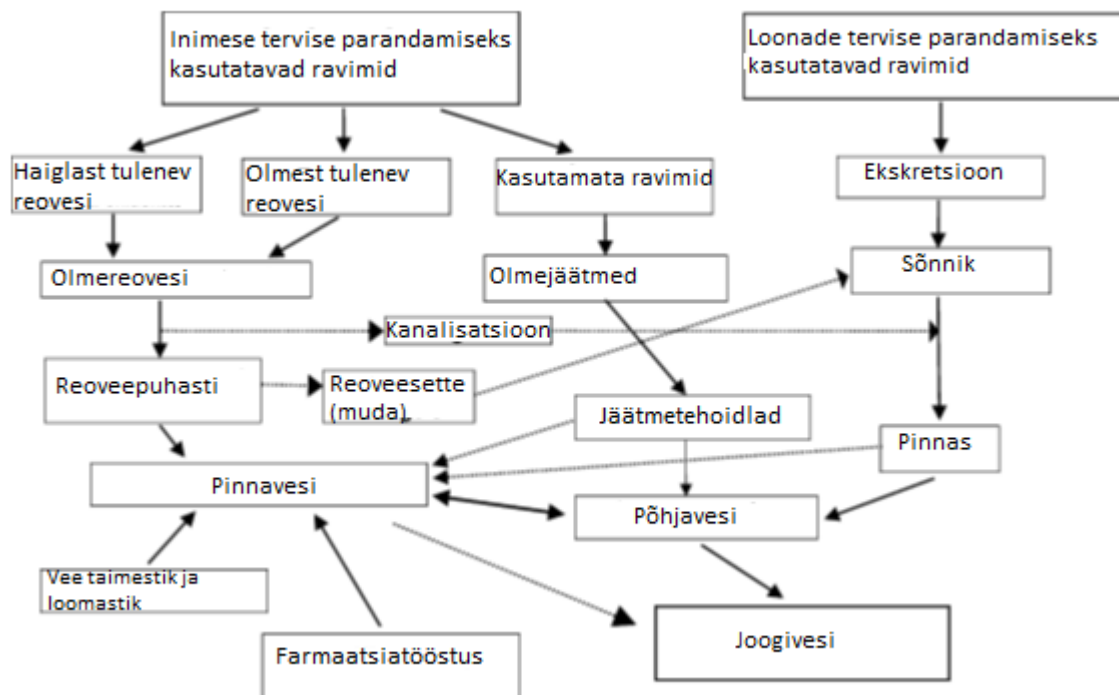
Inimese elu ja tervis on otseselt seotud puhta veega. Nüüdisajal kasutatakse vett suurtes mahtudes nii olmes kui ka kõikides tööstusharudes. Kuna varud on piiratud, tuleb reovett puhastada, et oleks võimalus seda taaskasutada ning vältida saasteainete levi looduskeskkonda.

Olmereovees leidub orgaanilisi kui ka anorgaanilisi aineid. Orgaanilised ained on süsivesinikud, rasvad, õlid, pestitsiidid, fenoolid, pindaktiivsed ained. Anorgaanilised on liiv, savi, raskmetallid (Web1). Olmereovees leidub ka farmaatsiapreparaate, näiteks hormoonravimeid ja antibiootikume. Tööstusreovee omadused sõltuvad põhiliselt tööstusharu iseloomust ning konkreetsest tootmisprotsessist (Web3). Olmereovee puhastamiseks sobib hästi selline bioloogiline puhastusmeetod nagu aktiivmudaprotsess, mille käigus kõrvaldatakse suurem osa reostusest, kuid paljusid mikrosaasteaineid ja farmaatsiapreparaate (sealhulgas antibiootikume) on raske kõrvaldada reoveest kasutades ainult aktiivmudaprotsessi. Ka tööstusreovee puhastamiseks saab kasutada olmereoveepuhastit. Kui reoveepuhastusjaam on korralikult projekteeritud ja töötab stabiilselt, siis saab kõrvaldada suurema osa tööstuslikust reostusest, välja arvatud sellised toksilised ühendid nagu tsüaniidid, fenoolid, raskmetallid ning farmaatsiatööstuse reoveest pärit ravimite jt saasteainete jäägid, mis on halvasti biolagundatavad ja inhibeerivad aktiivmuda (Kiely, 1997). Sellest tulenevalt on sageli vaja rakendada süvapuhastuseks kaasaegseid meetodeid.

Kirjandusülevaades käsitletakse ravimite leidumist looduskeskkonnas, doksütsükliini omadusi ja toimet, klassikalise aktiivmudaprotsessi rakendamist antibiootikumi sisaldava reovee puhastamiseks, süvaoksüdatsioonimeetodite ja nende bioloogiliste puhastusprotsesside kombinatsioonide sobivust antibiootikumi sisaldava reovee puhastamiseks.

## 1.1 Ravimite leidumine looduskeskkonnas ja sellega kaasnevad ohud

Ravimeid on edukalt kasutatud inimeste ja kariloomade haiguste ravimiseks. Inimene kasutab farmaatsiatooteid isikliku tervise heaks ning karjakasvatustes kasutatakse ravimeid, et kiirendada kariloomade kasvu või parandada nende tervist. Ravimid sattuvad veekeskkonda erinevatest allikatest ning Joonisel 1 esitatud skeemil on näidatud ravimite looduskeskkonda sattumise võimalikud teed.



**Joonis 1. Farmaatsiatoodete allikad ja levimine looduskeskkonda (Heberer, 2002)**

Tavaliselt on ravimite sattumine veekeskkonda tingitud sellest, et osa ravimitest peale tarbimist inimeste ja loomade poolt erituvad nende organismidest aktiivsel või isegi muutumatul kujul. Kodumajapidamistest ja haiglatest satuvad ravimijäägid reoveepuhastusjäama, kus aktiivmudaprotsessi käigus kõiki jääke ei lagundata. Ravimid võivad keskkonda sattuda ka hooletuse tõttu nende tootmisel, käitlemisel, hoiustamisel. Samuti satuvad ravimid kanalisatsiooni ja keskkonda teadmatusel, et ravimeid ei tohi visata kraanikausi, WC-potti või prügikasti. Prügikasti ravimeid ei tohi visata, kuna ravimijäägid võivad sattuda prügilala nõrgvee kaudu põhjavette (Heberer, 2002).

Üheks ravimite rühmaks on antibiootikumid ehk antimikroobsed preparaadid, mis toimivad mikroobe hävitavalt. Andmed antimikroobsete ravimite tootmise kohta USA-s näitavad, et nende toodang on suurenenud 400 tonnist 1950. aastal rohkem kui 15800 tonnini 1990. aastal (Kim jt, 2006). Antimikroobsed preparaadid on kõikidele kättesaadavad ja selle tagajärjel leidub antibiootikume pinnavees, põhjavees, olmereoves, tööstusreoves ja nende jälgi võib leida ka joogives (Elmolla ja Chaudhuri, 2011). 2002. aastal viis USA-s läbi uuringu USA Geoloogiakeskus. Selle uuringu käigus testiti 139 veeproovi erinevatest veekogudest ning antibiootikumide jäägid leiti 48% veekogudest. Uuring näitas, et kõrgeima kontsentratsiooniga olid vees kolm antibiootikumi: sulfametoksasool - 1,9 µg/kg, erütromütsiin - 1,7 µg/kg ja



linkomütsiinil - 0,73 µg/kg. Antibiootikumide jääke leiti ka pinnases ja setteproovides. Nii näiteks, oli erütromütsiini ja tetratsükliini sisaldus setteproovides vahemikus 82 – 128 µg/kg (Web17). Kim ja Carlson (2007) leidsid pinnases tetratsükliini jääke vahemikus 2,1 – 24,3 µg/kg. Antibiootikumide jääke leiti ka vedelsõnnikus. Hu ja Coats (2009) leidsid sõnnikus sulfamiidi kontsentratsiooniga 20 mg/kg, salinomütsiini 11 mg/kg ja tiamuliini 43 mg/kg. Samuti leiti USA-s antibiootikumide jääke põhja- ja pinnavees. Nii näiteks, põhjavees oli 400 ng/l tetratsükliini, pinnavees oli selle kontsentratsioon 0,11 µg/l (Web12; Lindsey jt, 2001)

Antibiootikumide olemasolu tõttu keskkonnas võivad tekkida teatud ohtud. Näiteks, suur osa antibiootikumidest on laia toimespektriga preparaadid ja seetõttu on antibiootikumidel selektiivne mõju pinnases olevatele mikroorganismidele (seentest kuni bakteriteni), mille tulemusena pinnase mikroorganismide mitmekesisus võib muutuda (Ding ja He, 2010). Antibiootikumide jäägid näiteks mõjuvad ammoniaaki oksüdeerivatele bakteritele. 1960. aastatel tehti kindlaks, et streptomütsiin kontsentratsiooniga 400 mg/l mõjutab nitrifikatsiooniprotsessi, inhibeerides ammoniaagi oksüdeerimist aktiivmudaprotsessi käigus (Ding ja He, 2010).

Antibiootikumide olemasolu tõttu looduslikus keskkonnas võivad välja areneda antibiootikumidele resistentsed bakterid. Sama tulemus võib olla ka antibiootikumide korduval, varel ja põhjendamatul tarbimisel. Antibiootikumiresistentsus on bakterite omadus mitte alluda antibiootikumide toimele. Bakterid, millel on kujunenud antibiootikumiresistentsus, ei allu organismi sattudes enam ravile antibiootikumidega ning jätkavad paljunemist organismis vaatamata sellele, et inimene tarvitab antibiootikumi (Web14).

Näiteks koolera on arengumaades laialt levinud (esineb eriti pärast loodusõnnetusi) ja viimastel aastatel on teateid ravimresistentsete patogeentüvede tekkimisest Indias, Hiinas ja ka Haiitil. (Keen ja Patrick, 2005)

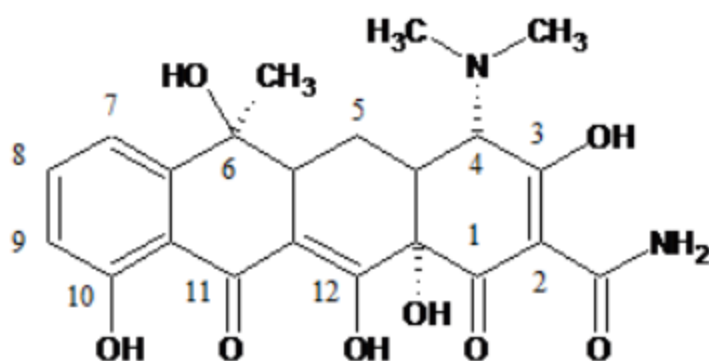
Siiski ainult mõned patogeendid tüved osutuvad ohtlikult ravimresistentseteks, nad on saanud nimeetuske „*superbug*“. *Superbugid* annab olulise panuse antibiootikumide ökoloogilisele jalajäljele looduskeskkonnas, kuna nende tõttu on vaja suuremaid antibiootikumide doose infektsiooni ravimiseks ja tõuseb ka ravi maksumus. *Mycobacterium tuberculosis* ja *Streptococcus pneumoniae* patogeentide resistentsus on andnud alust murettekitavaks stsenaariumiks, mille järgi antibiootikumide, mida varem kasutati edukalt infektsioonide ravimiseks, tõhusus väheneb aja jooksul. Haiglates võib mõnedel patogeentidel nagu

*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Enterococcus faecium* sageli tekkida ravimresistsensus ja neid on leitud reoveepuhastusjaamades, kuhu juhiti haiglast tulevat reovett. (Keen ja Patrick, 2005)

## 1.2 Doksütsükliini omadused ja toime

Doksütsükliin (DOX) kuulub tetratsükliinide rühma ja seda võeti meditsiinis kasutusele aastal 1967. Tetratsükliinid said sellise nime, kuna omavad nelja süsivesinikutsükli. DOX on poolsünteetiline laia toimespektriga antibiootikum, mis aeglustab bakterite kasvu (Web4; Nelson ja Levy, 2011)

Doksütsükliini ( $C_{22}H_{24}N_2O_8$ ) molekul saadi sünteetisel teel oksütetratsükliinist. DOX molaarmass on 444 g/mol, ta dissotsiatsioonikonstandid ( $pK_a$ ) on järgmised:  $pK_{a1}$  on 3,3;  $pK_{a2}$  on 7,8 ja  $pK_{a3}$  on 9,6 (Pamreddy jt, 2013). DOX on kollane kristalline pulber, mis lahustub hästi vees ja alkoholides, nt metanoolis (Web11). Allpool toodud Joonisel 2 on esitatud doksütsükliini keemiline struktuur.



**Joonis 2. Doksütsükliini stukturi skeem (Kogawa ja Nunes Salgado, 2012)**

Mõned muudatused tetratsükliinide struktuuris võivad mõjutada antimikroobset toimet. Näiteks, iga muutus C=O (1) ja C-OH (3) sidemete juures muudab keemilise ühendi mitteaktiivseks. Side C-CONH<sub>2</sub> (2) säilitab molekuli nõrga aktiivsuse, C-N(CH<sub>3</sub>)- sidemel on oluline antimikroobne toime. Funktsionaalrühmade OH-, CH<sub>2</sub> eemaldamine struktuurist 6 muudab ühendi stabiilsemaks. Cl- või CH<sub>3</sub>- esinemine struktuuris 9 vähendab molekuli aktiivsust (Kogawa ja Nunes Salgado, 2012)

Katseloomade uurimisel leiti, et doksütsükliini saab kasutada ka veterinaarmeditsiinis. Keskmise letaalne doos (LD<sub>50</sub>) koerte testitamisel oli > 500 mg/kg ning hiirtel testitamisel oli see 1890 mg/kg (Web18).

DOX kliinilised katsetused on kinnitanud selle antibiootikumi efektiivsust erinevate nakkushaiguste ravis (Riond ja Riviere, 1988). DOX kasutatakse tihti, kui tegemist on järgmistega nakkushaigustega: bakteriaalne kopsupõletik, akne, klamüüdia infektsioonid, varane Lyme'i tõbi, koolera ja süüfilis. Teda võib kasutada isegi malaaria ravimiseks (Web4). DOX kasutatakse ka leptospiroosi ja antraksi (põhjustab *Bacillus anthracis*) raviks ja profülaktikaks (Web5, Nadelman jt, 1992).

Ravimise käigus rohkem kui 70% tetratsükliinist eritatakse ja vabastatakse organismist aktiivsel kujul keskkonda uriini ja väljaheitega. Tetratsükliinide väga hüdrofiilsed omadused ja madal lenduvus on toonud kaasa nende püsivuse veekeskkonnas (Daghir ja Drogui, 2013). DOX pooletuaeg ehk aeg, mille jooksul ravimi kontsentratsioon langeb 50% võrra on 18-22 tundi organismis, aga looduskeskkonnas säilivad tetratsükliinid kauem (Web11). Tetratsükliinide pooletuaeg looduskeskkonnas võib olla 100 päeva, kuid see väärtus võib varieeruda. Tetratsükliini ja doksütsükliini pooletuaeg sõnnikus on vastavalt 37-77 ja 53-77 päeva (Masse jt, 2014). Eesti Maailikooli, Tartu Ülikooli ja Tallinna Tehnikaülikooli teadlased uurisid Eestis ravimijääkide sisaldust reoveesetetes ja kompostis. Katse käigus uuriti ravimeid, mis säilivad keskkonnas pika aja jooksul ja võivad sattuda mulla kaudu toidutaimedesse. Tehti kindlaks, et tetratsükliinid ei lagune mullas seitsme kuu jooksul pärast selle sõnnikuga väetamist (Web13).

DOX esinemisega looduskeskkonnas kaasneb bakterite resistentsus. *Staphylococcus aureus* on resistentne DOX vastu (Web18). Reoveepuhastusjaama reoveesetet ja sõnnikut, mis võivad sisaldada antibiootikumide jääke, kasutatakse haljastuses ning see on bakterite üha suureneva ravimiresistentsuse põhjusi (Web13). 1970. – 2008. a viidi Hollandis läbi uuring, mis näitas, et mullabakterite hulgas on suurenenud tetratsükliiniresistentsusgeeni esinemissagedus umbes 15 korda ja selle põhjuseks on sõnniku ja reovesete kasutamine väetamisel (Kim jt, 2007). Sellest tulenevalt, on oluline antibiootikumite kõrvaldamine reoveest, et vältida nende jääkide sattumist looduskeskkonda.

### **1.3 Antibiootikume sisaldava reovee puhastusmeetodid**

Traditsiooniliselt kasutatakse olme- ja tööstusreovee puhastamiseks aeroobset biopuhastust (aktiivmudaprotsessi). Kuid reovees sisalduvad tetratsükliinid adsorbeeruvad kergesti settele ning moodustavad kaltsiumi- ja teiste sarnaste ionidega moodustavad stabiilseid ühendeid (Cetecioglu jt, 2014). Selle tagajärjena tetratsükliinid ei lagune reoveepuhastusjaamades ja heitvees on leitud tetratsükliine erinevate kontsentratsioonidega. Nii näiteks, leiti Kanada reoveepuhastusjaama heitvees tetratsükliin ja doksütsükliin kontsentratsiooniga vastavalt 0,977 ja 0,046 µg/l (Miao jt, 2004). Rootsi reoveejaama heitveest leiti doksütsükliini kontsentratsioonivahemikus 0,072 kuni 0,915 µg/l (Lindberg jt, 2005). Seoses sellega on oluline leida optimaale meetod või meetodite kombinatsioon, millega saab kõrvaldada antibiootikumi reoveest.

Selline meetod nagu kloorimine ei sobi antibiootikume sisaldava reovee puhastamiseks, kuna kloor ei lagunda antibiootikume ning kloorimine võib põhjustada uute toksiliste vaheproduktide teket (Web6). Samuti ei sobi DOX kõrvaldamiseks sellised protsessid nagu adsorptsioon, õhkstripping ja pöördosmoos (Elmolla ja Chaudhuri, 2011).

Tänapäeval uuritakse süvaoksüdatsiooniprotsesside sobivust antibiootikume sisaldava reovee puhastamiseks. Käesoleva töö eesmärgiks on uurida kombineeritud protsessi aeroobne biooksüdatsioon (aktiivmudaprotsess) koos fotokatalüütilise oksüdatsiooniga. Seoses sellega on antud peatükis esitatud ülevaade aktiivmudaprotsessi ja fotokatalüütilise oksüdatsiooni põhimõtetest ning mõjust tetratsükliinirühma antibiootikumidele.

#### **1.3.1 Aktiivmudaprotsess**

Aktiivmudaprotsess on bioloogiline puhastusmeetod, mis on kõige levinum reovee puhastuse viis. Selline protsess sobib hästi olme- ning tööstusreovee puhastamiseks. Aktiivmudaprotsessi käigus toimib samaaegselt kolm mehhanismi: biooksüdatsioon (bioloogiliselt lagundatav orgaaniline aine hüdrolüüsitatakse ja muudetakse biolagundatavaks lahustuvaks orgaaniliseks aineks ning see tarbitakse biomassis olevate mikroorganismide poolt), õhkstripping (aktiivmuda aereerimisel satuvad õhku lenduvad orgaanilised ühendid ühendid ja orgaanika lagunemisel tekkinud CO<sub>2</sub>) ja toimub ka saasteainete (pestitsiidid, raskmetallid, ravimid) adsorptsioon aktiivmudale. (Kiely, 1997).

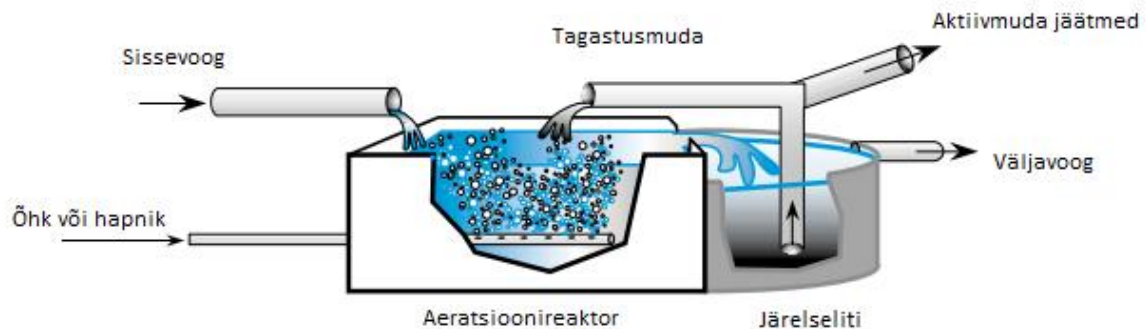
##### **1.3.1.1 Aktiivmudaprotsessi mehhanism ja seda mõjutavad faktorid**

Aktiivmudaprotsess põhineb mikroorganismide (bakterid, seened, algloomad) võimel lagundada ja kasutada ära substraadina (toitainena) vees sisalduvat orgaanilist ainet.

Puhastusprotsessis kasutatakse mikroorganisme, mis arenevad iseeneslikult ja moodustuvad flokke, mida nimetatakse aktiivmudaks. Mikroorganismid kasutavad elutegevuseks reovees olevat hapnikku ja orgaanilist ainet (Velner, 1998). Aktiivmudaprotsessi käigus muundavad mikroorganismid hapniku juuresolekul reovees oleva orgaanilise aine süsihappegaasiks, veeks ja tekib uus biomass. Seda protsessi kirjeldab reaktsioon (1) (Kiely, 1997):



Aktiivmudaprotsessi teostamiseks on olemas palju erinevaid seadmeid ja süsteeme. Joonisel 3 on toodud tüüpilise aktiivmudaprotsessi seadme skeem, mis koosneb aeratsioonireaktorist ja järelselitist.

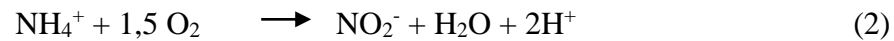


**Joonis 3. Tüüpilise reoveepuhasti skeem (Web10)**

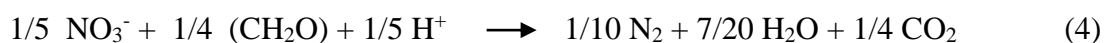
Kõige olulisem puhastusetapp toimub aeratsioonikambris. Siin toimub hapniku juuresolekul mikroorganismide abil bioloogiline puhastusprotsess s.t toimub aeroobne biooksidatsioon. Selles etapis toimub orgaanilise aine ja selliste toitainete nagu lämmastik ja fosfor kõrvaldamine reoveest. Toitained on vajalikud protsessis osalevate mikroorganismide elutegevuseks, kuid sattudes heitveega looduslikesse veekogudesse võivad nad põhjustada eutrofeerumist ehk muutuda rohketoidualiseks ning kinni kasvada. (Grady jt, 1998).

Toitainete kõrvaldamiseks kasutatakse aktiivmudaprotsessi, mis hõlmab aeroobset ja anaeroobset tsooni (Grady jt, 1998). See tähendab, et lämmastiku kõrvaldamine reoveest toimub kaheastmeliselt: esiteks toimub nitrifikatsioon ja siis järgneb denitrifikatsioon. Nitrifikatsiooniprotsess toimub aeroobses keskkonnas ja selles etapis oksüdeerub ammoniumioon nitritiooniks või nitraationiks. Protsess toimub nitrifitseerijate toimetel. Nitrifitseerijad sõltuvad temperatuurist, ammoniumlämmastiku kontsentratsioonist,

orgaanilisest substraadist ja pH-st (Kiely, 1997). Nitrifikatsiooni kulgemise mehhanismi illustreerivad reaktsioonid (2) ja (3) (Web19):



Denitrifikatsiooni käigus toimub redutseerimine vabaks lämmastikuks ja protsess toimub hapnikuvabas keskkonnas. Denitrifikatsiooni viivad läbi denitrifitseerijad, mis sõltuvad temperatuurist ja pH-st. Optimaalne pH on 7 (Kiely, 1997). Mikroorganismid saavad kasutada süsinikuallikana ka metanooli. Denitrifikatsiooni mehhanismi kirjeldab reaktsioon (4) (Web19):



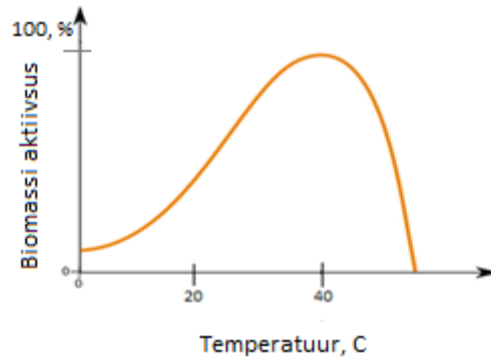
Puhastusprotsessi käigus lahustuv substraat muutub tahkeks biomassiks. Seda biomassi on võimalik eraldada viimases puhastusetapis s.o järelsetitamise käigus. Kui kõik puhastusetapid on läbitud suunatakse heitvesi suublasse. Bioloogilise puhastusprotsessi käigus tekib juurde aktiivmuda, mida tuleb eemaldada. Liigmuda tihendatakse, veetustatakse ning suunatakse kas ladustamisele või edasisele töötlusele. Töödeldud muda saab laotada põldudele, kuid mudas võivad sisalduda raskmetallid ja mikrosaasteained (sealhulgas antibiootikumid) ning see piirab seda kasutusviisi. Samuti saab tööteldud muda kasutatada haljastuseks (Velner, 1998).

### ***Aktiivmudaprotsessi mõjutavad tegurid***

Aktiivmudaprotsessi efektiivsust sõltub järgmistest teguritest:

- temperatuurist;
- toitainetest;
- pH-st;
- lahustunud hapnikust;
- hüdraulilisest viibest (inglise k *hydraulic retention time HRT*);
- tahkiste viibest (inglise k *hydraulic retention time SRT*);

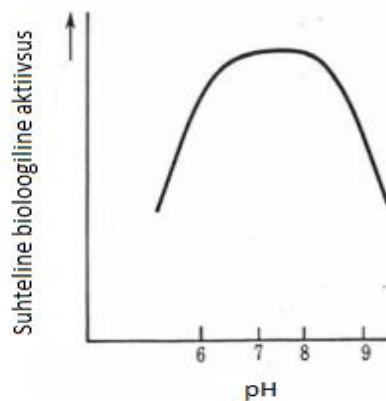
Puhastusprotsessi efektiivsus sõltub suurel määral reovee temperatuurist, kuna see mõjutab biomassi kasvu. On kindlaks tehtud, et kui temperatuur aeratsioonibasseinis langeb 10 °C võrra, siis biomassi aktiivsus võib väheneda kuni 50%-ni, see tähendab, et on proportsionaalne sõltuvus: reovee temperatuur langeb ja biomassi elutugevus aeglustub. Igal mikroorganismil on kindel temperatuurivahemik, milles ta areneb ja enamik mikroorganisme eelistab vahemikku 15-45 °C. Aktiivmudasüsteemi jaoks on optimaalne temperatuurivahemik 10-25 °C (Kiely, 1997; Web7). Joonisel 4 on toodud biomassi aktiivsuse ja temperatuuri sõltuvus.



**Joonis 4. Biomassi aktiivsuse ja temperatuuri sõltuvus (Web7)**

Aktiivmudaprotsessi jaoks on oluline, et reovesi sisaldaks toiteelemente. Protsessi soodsaimaks tingimuseks peetakse orgaanilise aine, lämmastiku- ja fosforisisalduse vahekorda  $BHT_5 : N : P = 100 : 5 : 1$  (Kiely, 1997; Velner, 1998)

Biomassi aktiivsus on seotud ka pH-ga. Joonisel 5 on näidatud, et biomassi aktiivsus on parim pH vahemikus 6,5 -8,5.



**Joonis 5. Biomassi aktiivsuse sõltuvus pH-st (Web7)**

Biomassi juurdekasv võib toimuda ka väljaspool nimetatud vahemikku, kuid seda vähesel määral. Madalate pH väärtuste korral võivad eelistatult areneda niitbakterid. Suurtes kogustes need bakterid pole biopuhastuses kasulikud, nad takistavad biomassi sadenemist ja sellest tuleneb, et puhastussüsteemi režiim muutub ja protsessi efektiivsus langeb. On kindlaks tehtud, et hapniku tarbimine on optimaalne pH vahemikus 7,0-7,4, seega aeratsioonibasseinis pH peab olema neutraalne (pH=7), kuna selle juures mikroorganismid saavad edukalt paljuneda (Web7).

Hapnik on vajalik aeroobsete mikroorganismidele elutegevuseks. Samas toimub aereerimisel ka muda segamine, et see ei settiks reaktori põhja ja protsessi efektiivsus ei langeks. Lisaks

sellele lahustunud hapniku üheks ülesandeks on niitbakterite kasvu kontroll. Madal lahustunud hapniku kontsentratsioon võib esile kutsuda niitbakterilise muda pundumise, mis omakorda tekitab muda settimisprobleeme. Aktiivmudaprotsessi jaoks vajalik lahustunud hapniku minimaalne kontsentratsioon on 2 mg/l (Kiely, 1997).

Hüdrauliline viibeaeg (HRT)  $\tau$  iseloomustab, kui kaua viibib reaktoris keskmiselt reovesi s.t see on selline aeg, mis on vajalik ühe reaktori mahu töötlemiseks (Kiely, 1997). HRT muutused võivad mõjuda bioloogilisele aktiivsusele. Nii näiteks, HRT vähenemine mõjutab nitrifikatsiooni negatiivselt ja samal ajal HRT suurenemine soodustab nitrifikatsiooni (Web20). Tahkiste viibeaeg reaktoris (SRT) on oluline aktiivmudasüsteemi tööparameeter. See parameeter näitab, kui kaua aktiivmuda on süsteemis. Tavaliselt väljendatakse SRT-d päevades (Web7).

Kim jt (2005) uurisid HRT ja SRT mõju tetratsükliinide kõrvaldamisele aktiivmudaprotsessis. Rajati kaks perioodilist reaktorit. Esimeses töödeldi reovett, milles tetratsükliini algkontsentratsioon oli 250  $\mu\text{g/l}$ , ning teises reaktoris töödeldi reovett, mis oli võetud reoveepuhastusjaamast ja mis sisaldas tetratsükliini vahemikus 0,1-0,6  $\mu\text{g/l}$ . Protsess oli jagatud kolmeks etapiks: esimeses oli HRT 24 tundi ja SRT 10 päeva, teises etapis olid HRT ja SRT väärtused vastavalt 7,4 tundi ja 10 päeva ning kolmandas etapis oli HRT 7,4 tundi ja SRT-d vähendati ja see oli 3 päeva. Katseliselt tehti kindlaks, et viimases etapis oli tetratsükliini kõrvaldamise efektiivsus kõige madalam  $78,4 \pm 7,1\%$ . Esimes ning teises etapis, kui SRT oli 10 päeva, oli antibiootikumi kõrvaldamise efektiivsus oli suurem vastavalt  $86,4 \pm 8,7\%$  ja  $85,1 \pm 5,4\%$  vastavalt.

Tulemuste põhjal võib teha järelduse, et SRT ja HRT parameetrid on olulised aktiivmudaprotsessi parameetrid ning neid tuleb korralikult reguleerida, et puhastusprotsessi efektiivsus ei väheneks. Samuti tuleb protsessi käigus kontrollida SVI, MLSS jne.

### ***Aktiivmuda mahuindeks SVI***

Reoveepuhastusjaamad kasutavad SVI (inglise k *sludge volume index*), et kontrollida aktiivmuda settivust. See parameeter võib näidata aktiivmudaprotsessis toimuvaid muutusi ja teades SVI näitajad, operaatorid saavad vältida probleeme. SVI näitab, kui selge vesi tuleb puhastist. SVI arvutatakse kasutades järgmist võrrandit: (Kiely, 1997; Grady jt, 1998)

$$SVI = \frac{SV}{MLSS} * 1000, ml/g \quad (1)$$



kus SV – on 1-liitrilises silindris 30 min jooksul settinud muda maht, ml/l, MLSS – aktiivmuda kontsentratsioon reaktoris, mg/l.

Mida väiksem on mudaindeks, seda paremini toimub muda settimine. Kui SVI on kõrge, siis võivad moodustada niitbakterid, mis takistavad puhastusprotsessi ja protsessi puhastusefektiivsus võib langeda. Tabelis 1 on esitatud aktiivmuda settimise iseloomustus erinevate SVI väärtuste juures.

**Tabel 1. SVI ja aktiivmuda settimise iseloomustus (Grady jt, 1998)**

SVI, ml/g	Muda settimine
<80	suurepärase
80-150	mõõdukas
>150	vaene

Tabelis antud andmed võib kasutada etalonina, kuid iga reoveepuhastusjaam töötab erinevalt, seega SVI, mille juures jaam töötab optimaalselt, võib ka erineda. Aga üldiselt on muda settivus parem, kui SVI väärtused on vahemikus 80-120 ml/g ja MLSS on vahemikus 2000-3500 mg/l (Kiely, 1997; Grady jt, 1998).

### **Mudakoormus**

Aktiivmudaprotsessi üheks oluliseks parameetriks on ka mudakoormus F/M (inglise k *food to microbes ratio*). See on aktiivmudaprotsessi siseneva substraadi (biolagundatavate orgaaniliste ainete) ja mikroorganismide suhe. Aktiivmudaprotsessi käigus toimub mikroorganismide juurdekasv ning nende lagunemine. Süsteem saavutab tasakaalu kui substraat ja mikroorganismide hulk, mis tarvitab seda substraati, on tasakaalus. Süsteem aga ei pruugi olla kogu aeg tasakaalus. Suurtel F/M väärtustel on bakterid on aktiivsed ja paljunevad kiiresti, samuti põhjustab kõrge mudakoormus halva muda settimist ja vee hägusust. Kui aga mudakoormus on madal, siis mikroorganismid on toidupuuduses ja nii nad saavad paremini toitu omandada. Madal F/M väärtus tähendab, et on palju mikroorganisme, kuid on vähe toitu ja mikroorganismid kaotavad liikumisvõime. (Kiely, 1997). Tabelis 2 on esitatud aktiivmudakoormuse iseloomutus sõltuvalt F/M väärtusest.

**Tabel 2. Aktiivmudapuhasti mudakoormuse iseloomustus (Kiely, 1997)**

F/M, (g BOD/g MLSS)*ööp	Aktiivmuda koormus
0,03-0,8	madal
0,8-2	normaalne
>2	kõrg

F/M väärtused võivad varieeruda sõltuvalt hooajast. Suvel F/M väärtused on tavaliselt kõrgem, talvel aga madalam. Mudakoormust saab arvutada kasutades järgmist võrrandit (Kiely, 1997):

$$F/M = \left( \frac{\text{kg BOD}_7/\text{m}^3}{\text{kg MLSS}/\text{m}^3} \right) / \text{ööpäev} \quad (2)$$

kus MLSS – aktiivmuda kontsentratsioon reaktoris, kg/m<sup>3</sup>, BOD<sub>7</sub> – biokeemiline hapnikutarve (BHT) 7 päeva jooksul, kg/m<sup>3</sup>

### 1.3.1.2 Antibiootikumide saatus aktiivmuda protsessi käigus

Antibiootikumide sisaldus vees võib väheneda biolagunemise ja adsorptsiooni protsesside käigus. Tänapäeval tegelevad paljud uurijad antibiootikumide kõrvaldamisega seotud probleemidega ja efektiivsema meetodi väljaselgitamisega. Perez jt. (2005) uurisid sulfaamiidide kõrvaldamise efektiivsust aktiivmuda protsessi käigus. Uuriti kolme antibiootikumi: sulfadimidiin, sulfametoksasool ja sulfadiasool. Antibiootikumide algkontsentratsioon oli 20 µg/l. Leiti, et 10 päeva jooksul biolagunemisprotsesside vähenes sulfadimidiini kontsentratsioon ~50%, sulfametoksasooli kontsentratsioon 75% ja sulfadiasooli kontsentratsioon 93% kaudu.

Li ja Zhang (2013) uurisid süstemaatiliselt tetratsükliinide kõrvaldamist erinevatest kanalisatsioonireovetest (magevesi, soolane reovesi) ja uuringud näitasid, et adsorptsioon on peamine tetratsükliinide kõrvaldamise mehhanism, samas biolagundamise efektiivsus on madal.

Samuti uurisid Kim jt. (2005) seda küsimust. Tulemused näitasid, et adsorptsioon on mehhanism, mille efektiivsus tetrasükliinide eemaldamisel on kõige parem. Tetrasükliinide adsorptsiooni uurimiseks kasutati kaht biomassi erinevate kontsentratsioonidega: 1000 ja 3600 mg/l. Leiti, et kui biomassi kontsentratsioon vees oli 1000 mg/l, siis ühe tunni jooksul kõrvaldati 75% tetrasükliinidest (algkontsentratsioon oli 250 µg/l). Biomassi kontsentratsioonil 3600 mg/l kõrvaldati 95%, toimus kiire antibiootikumi adsorptsioon muda peale. Tulemused

näitasid samuti, et adsorbeerunud tetratsükliini ei saa kergesti desorbeerida aktiivmudast. Üldiselt, adsorptsioonikatsed näitasid, et tetratsükliini kontsentratsiooni vähenemine reovees sõltub tugevalt tema adsorptsioonist biomassile. Samuti adsorbeeruvad tetratsükliinid hästi savisse, pinnasesse ja setetesse, kuid uuringute tulemused nende esinemise kohta pinnavees näitavad, et adsorptsioon ei ole pöördumatu protsess ning teatud tingimused võivad soodustada nende levi keskkonnas (Kim jt, 2005).

### **1.3.1.3 Aktiivmudaprotsessi eelised ja puudused**

Aktiivmudaprotsess on kõige enam kasutatav ja levinum bioloogilise puhastuse viis. Tal on palju modifikatsiooni ning teda saab kasutada erinevate reovee puhastamiseks vastavalt erinõuetele. Protsessil on palju eeliseid, kuid leidub ka puuduseid.

Aktiivmudaprotsessi eelised on järgmised (Web8):

- on võimeline eemaldada kuni 97% hõljuvainetest;
- bioloogiline lämmastikuärastus (ilma kemikaalide lisamiseta);
- bioloogiline fosfori kõrvaldamine;
- pole vaja suurt pinda;
- sobib nii olmereovee kui ja tööstusereovee puhastamiseks;
- süsteemid pole keerulised;
- puhastusprotsessis tekkiv liigmuda saab töödelda ning kasutada haljastuses (kuid see on piiratud, kuna töödeldud muda võib sisaldada raskmetalle jne)
- sobib ka väikeste asulate reovee puhastamiseks.

Aktiivmudaprotsessi puudused on järgmised (Web8):

- suhteliselt suured investeeringud;
- suur energiatarve;
- tundlikkus temperatuuri, pH, hapnikusisalduse jm suhtes;
- nõuab kvalifitseeritud personali ja korrapärast järelevalvet;
- tundlikkus hüdraulilisele ülekoormusele;
- liigmuda teke;
- raskmetallide ja mikrosaasteainete adsorptsioon aktiivmudale, mis piirab töödeldud muda kasutamist;
- protsess pole võimeline antibiootikume täielikult lagundama ja kõrvaldama.

Teadlased on kindlaks teinud, et tetratsükliinirühma antibiootikume võiks tänu aktiivmudaprotsessile eemaldada 11,6% -st kuni 85,4%-ni, kuid reoveepuhastid pole võimelised antibiootikumid täielikult reoveest kõrvaldama (Batt jt, 2007). Reoveepuhastitest pärit tetratsükliinide jääke on leitud pinnaveest, seega on puhastid mingil määral loodusreostuse allikad.

Seega tuleb antibiootikumide efektiivseks kõrvaldamiseks reoveest rakendada kas teisi tehnoloogiaid või erinevate puhastustehnoloogiate kombinatsioone. Tänapäeval uuritatakse laialdaselt täiustatud oksüdatsiooniprotsesse. Nende protsesside eeliseks on reoveepuhastuses see, et nendes on oksüdantideks väga kõrge reaktiivsusega hüdroksüülradikaalid, mis on võimelised mitteselektiivselt oksüdeerima raskeltlagundatavaid ühendeid. Samuti võib bioloogilisi puhastusprotsesse efektiivsuse tõstmiseks kombineerida süvaoksüdatsiooniprotsessidega.

### **1.3.2 Kombineeritud süsteemid**

Kombineerides täiustatud oksüdatsiooniprotsesse (AOP) ja bioloogilisi puhastusviise tuleb jälgida, kuidas iga üksik puhastusprotsess on võimeline saasteainet reoveest kõrvaldama. Aktiivmudaprotsess on odav ja sellega saab efektiivselt eraldada hõljuvaineid, vähendada orgaanika ja toitainete sisaldust reovees, kuid mikrosasteainete kõrvaldamise efektiivsus on madal. Oksüdatsioonil põhinevad protsessid – täiustatud oksüdatsiooniprotsessid ehk süvaoksüdatsiooniprotsessid (AOP protsessid) on küllaltki kallid, kuna protsessi käigus kasutatakse kemikaale ning on suur energiatarve.

AOP protsessis moodustuvad radikaalid (eriti hüdroksüülradikaalid  $\text{OH}^{\bullet}$ ), mis on väga tugevad oksüdeerijad ning on võimelised lagundama suurt osa saasteainetest, ka toksilisi ja raskesti lagundatavaid saasteaineid. AOP protsesside eelisteks on: lihtne protsessi tehniline teostus, kõrvalproduktide puudumine, võime lagundada praktiliselt kõiki ühendeid. Protsessil on ka puudused: suured investeeringud, suur energiatarve ja kemikaalide vajadus (Al-Momani, 2003). AOP protsessid on paljulubavad meetodid bioloogiliselt mittelagundavate orgaaniliste ainetega saastatud reovee puhastamiseks. Kasutades AOP protsesse on võimalik reoveest eemaldada ravimeid kas täielikult või siis muuta nad biolagundatavamateks ühenditeks. AOP protsessid on kallid, aga kombineerides neid bioloogiliste protsessidega, mis on odavad ning keskkonnasõbralikud protsessid, on võimalik tõsta saasteainete kõrvaldamise efektiivsust.

Protsesside kombineerimise eesmärgiks on leida sellised kombinatsioonid, mis tagavad kõrge efektiivsuse (Oller jt, 2011).

Puhastusprotsessi võib kombineerida erinevalt: alguses bioloogiline protsess ja seejärel AOP protsess või vastupidises järjestuses. Kasutades bioloogilist puhastust esimesena etapina võib kõrvaldada reoveest biolagundatavad ained ja teises etapis lagundatakse AOP protsessi käigus raskesti lagundatavad ühendid. Rohkem kasutatakse aga esimesena etapina keemilist töötlust, millele järgneb bioloogiline puhastus. AOP protsessiga eeltöötlemisel saab muuta raskesti biolagundatavad ühendid biolagunevateks, mis järgneva bioloogilise töötluste käigus oksüdeeritakse veeks süsihappegaasiks.

### **1.3.2.1 Fenton- ja foto-Fenton-protsessi kombineerimine aktiivmudaprotsessiga**

1894. aastal täheldas H.J.H. Fenton, et vesinikperoksiidi ( $H_2O_2$ ) ja raud(II)-soolade koostoimel on võimsad oksüdeerivad omadused, hiljem tehti kindlaks, et oksüdeerivad osakesed on hüdroksüülradikaalid. Fentoni reaktsioon sõltub lahuse pH-st ja siit tuleneb see, et  $OH^\bullet$  on põhiline oksüdeerija ainult happelises keskkonnas (Al-Momani, 2003). Fentoni reaktsiooni efektiivsuse suurendamiseks kasutatakse selle kombinatsiooni UV-kiirgusega ja seda modifikatsiooni nimetatakse siis foto-Fentoni protsessiks (Dulov, 2012).

Fentoni reaktiivil on palju eeliseid: mõlemad reaktiivid, nii raud kui ka  $H_2O_2$  on suhteliselt odavad, protsessi käigus ei moodustu kloororgaanilisi ühendeid ja reaktorite konstruktsioon on lihtne. Puuduseks tuleb pidada, et see töötab kõige efektiivsemalt ainult happelises keskkonnas ja vajab suurt reaktiivide kogust (Al-Momani, 2003).

Fentoni protsesside sobivust antibiootikume sisaldava reovee puhastamiseks on uuritud mitmetes eksperimentaalsetes töödes. Nii näiteks, Guo jt. (2014) uurisid antibiootikumi amoksütsülliini lagunemist Fentoni ja aktiivmudaprotsesside kombineerimisel. Aktiivmuda võeti Jiangning reoveepuhastusjaamast (Nanjing, Hiina). Kombineerimise puhul amoksütsülliini lagundamiseks eelpuhastuse etapis kasutati Fentoni protsessi ja seejärel kasutati aktiivmudaprotsessi. Kasutades ainult aktiivmudaprotsessi vähenes antibiootikumi sisaldus vees vahemikus 69,04 - 88,79%. Kombineeritud protsessis koos Fentoni protsessiga saavutati kuni 80%-line amoksütsülliini vähenemine 70 min jooksul ning ülejäänud 20% lagunes aktiivmudaprotsessi käigus. Seega uuringu tulemused näitasid, et biopuhastusprotsess üksi pole võimaline antibiootikumi täielikult lagundama ning Fentoni protsessi kombineerimisel aktiivmudaprotsessiga saavutati kõrgem amoksütsülliini kõrvaldamise efektiivsus.

### **1.3.2.2 Osoonimise ja aktiivmudaprotsessi kombineerimine**

Osoonil on kõrge reaktiivsus ning selle tõttu on osoon vees ebastabiilne. Molekulaarse osooni pooleetusae on muutuv, see võib olla mõnest sekundist kuni mõne minutini ja sõltub see vee temperatuurist, pH-st, orgaaniliste ja anorgaaniliste ainete kontsentratsioonidest.

Lester jt (2013) tegelesid ravimeid sisaldava reovee puhastamisega kombineerides aktiivmuda ja osoonimise protsesse. Lester jt uurisid Teva farmaatsiatööstuse reovett (Israel). Katse peamiseks eesmärgiks oli selliste preparaatide nagu karbamasepiini (CBZ) ja venlafaksiini (VLX) saaste kontsentratsioonide vähendamine heitvees. Reaktorina kasutati pidevat segureaktorit (CSTR). Karbamasepiini ja venlafaksiini algkontsentratsioonid olid kõrged:  $0,84 \pm 0,19$  mg/l ja  $11,72 \pm 2,2$  mg/l vastavalt. Katses kasutati alguses biopuhastust ja pärast osoonimist. Algse reovee KHT (keemiline hapnikutarve) oli  $4765 \pm 1405$  mg/l ja aktiivmudaprotsessis vähenes see 84% ja oli  $741 \pm 253$  mg/l. Bioloogiliselt töödeldud reovee pH vähenemine (7-st kuni 5-ni) suurendas oluliselt osooni töötlemise efektiivsust ja CBZ lagundamist, samas VLX lagunemiskiirus selle pH juures langes vähesel määral. Osoonimisega saavutati 99%-line CBZ lagunemine - CBZ kontsentratsioon vähenes 0,84 mg/l kuni 0,001 mg/l-ni, samuti saavutati 98%-line VLX lagundamise efektiivsus – VLX kontsentratsioon vähenes 11,72 mg/l kuni 0,2 mg/l-ni. Tulemustest võib teha järelduse, et osoonimise ja aktiivmudaprotsesside kombineerimine on efektiivne karbamasepiini ja venlafaksiini eemaldamiseks reoveest ning see võib olla tõhus ka teiste farmaatsiatööstuse reovete puhastamiseks.

Osoonimise ja aktiivmudaprotsesside sobivust farmaatsiatööstuse reovee puhastamiseks ei ole nii laialdaselt uuritud nagu Fentoni ja biopuhastusprotsesside kombineerimist. Kuid uuringud, mis on teostatud, näitavad, et Fentoni protsessil on puhastusefektiivsus on kõrgem.

### **1.3.2.3 Fotokatalüüsi ja bioloogiliste puhastusmeetodite kombineerimine**

Samuti uuritakse fotokatalüüsi, mis samuti kuulub AOP protsesside hulka, ning selle kombineerimist bioloogiliste puhastusmeetodiga ravimeid sisaldava reovee puhastamiseks.

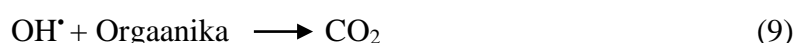
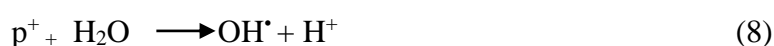
Fotokatalüüs on fotokeemiline protsess ja kujutab endast fotoreaktsiooni kiirendamist, mis toimub katalüsaatori juuresolekul (Castellote ja Bengtsson, 2011). Fotokatalüüs on suure potentsiaaliga oksüdatsiooniprotsess, mida saab kasutada vee ja reovee puhastamiseks. Seda

meetodit tuntakse juba 1970. aastatest, kui see avastati vee foto-indutseeritud dissotsiooni uurimisel.

Protsessi põhimõte seisneb pooljuhile päikesekiirguse (kas loomuliku või kunstliku UV-valguse) juhtimises (Smith ja Johnson, 2013). Pooljuhid on valguse neelajad ja neid kasutatakse tänu oma elektronilise struktuuri, valguse absorbeerimise omaduste ja pika ergastunud olekus olemise aja tõttu (Thiruvenkatachari jt, 2008). Pooljuhis toimub ergastus, mis võimaldab valents-tsooni elektronil ( $e^-$ ) minna edasi pooljuhi juhtivustsooni. Tekib nn auk ( $p^+$ ), mis võib reageerida OH-rühmadega, mis on pooljuhi pinnale absorbeerunud ja selle tulemusena saasteained lagunevad.

Päikese-energiat saab küll kasutada mõnede ühendite lagundamiseks, aga tavaliselt see energia ei ole piisav, näiteks, päikese-energiaga pole võimalik lagundada fenooli aromaatsset tuuma. Seega võeti kasutusele kunstlik ultraviolettkiirgust, kuna eksperimendid näitavad, et selle kasutamisega saab saavutada kas osalise või täieliku saasteainete lagundamise (Al-Momani, 2003; Smith ja Johnson, 2013).

Ehkki on fotokatalüüsi jaoks on testitud palju erinevaid katalüsaatoreid, on kõige sagedamini kasutatav katalüsaator titaandioksiid  $TiO_2$ . Fotokatalüüsi mehhanismi võib esitada järgmiste reaktsioonidega: (Thiruvenkatachari jt, 2008):



Titaandioksiid ei lahustu vees, ta on odav materjal ning ta ei ole toksiline (Smith ja Johnson, 2013).  $TiO_2$  esineb kolmes erinevas kristallvormis: brukiit, anataas ja rutiil. Kõrge fotokatalüütiline aktiivsus on ainult anataasi kristallvormil (Castellote ja Bengtsson, 2011).

Fotokatalüüs on odav ja keskkonnasõbralik protsess. Fotokatalüüsi  $TiO_2$  katalüsaatoriga saab kasutada õhu puhastamiseks ning uuritakse ka selle sobivust sellise reovee puhastamiseks, mis sisaldab näiteks pestitsiidid, farmaatsiatooted.

Protsess sobib mitmete saasteainete kõrvaldamiseks reoveest. Need saasteained võivad olla bioloogilise ja orgaanilise päritoluga ained ning fotokatalüüsi saab kasutada olme- ja tööstusereovee puhastamiseks.  $TiO_2$  on tugev oksüdeerija ja on võimeline lagundama

orgaanilisi ühendid isegi väga väikestes kontsentratsioonides, vahemikus 0,01-10 ppm (Castellote ja Bengtsson, 2011). Tõhusaks protsessiks on vaja, et saasteaine, katalüsaator ning valgusallikas oleksid lähedal või üksteisega kontaktis (Ibhadon ja Fitzpatrick, 2013).

Reyes jt. (2006) uurisid tetratsükliinide lagundamist TiO<sub>2</sub>-ga fotokatalüüsi käigus. Katses kasutati tetratsükliinhüdrokloriidi (95%). TiO<sub>2</sub> kogused olid 0,5 ja 1 g/l. Protsessis kasutati kolme tüüpi lampe: UV-, solaariumi- ja UV-A-lampe. Toksilisust hinnati kasutades *Staphylococcus aureus* bakterit. Tehti kindlaks, et tetratsükliini struktuur oli efektiivselt lagunenu tänu TiO<sub>2</sub> fotokatalüüsi protsessile, erinevate lampide ning väikeste katalüsaatori koguste kasutamisel. Kõrvalproduktid, mis moodustusid tetratsükliinhüdrokloriidi oksüdatsiooni käigus, ei avaldanud antibakteriaalset toimet *S. aureus* vastu. Kogu tetratsükliinhüdrokloriidi deaktivatsioon saavutati kui kiiritamise aeg oli 1 tund ja kasutati ka UV ja solaariumlampe. Seega fotokatalüüsi on otstarbekas kasutada farmaatsiatooteid sisaldava reovee eeltöötlemiseks enne bioloogilist puhastamist.

Kombineerides fotokatalüüsi aktiivmudaprotsessiga saab tõsta puhastamise efektiivsust ning kõrvaldada raskesti lagundavaid saasteained heitveest. Nii näiteks Laera jt. (2011) ühendasid membraanbioreaktori (MBR) fotokatalüüsi protsessiga karbamasepiini sisaldava reovee puhastamiseks. MBR süsteem töötas järgmiselt: söötmine/segunemine (30 min), anoksilised tingimused/segunemine (30 min), aereerimine/filtreerimine (60 min). Fotokatalüüsi reaktoris oli kiiritamise aeg 6 tundi ning kasutati UV-lampe. Karbamasepiini algkontsentratsioon oli 10 mg/l. Puhatusprotsess koosnes kahest etapist: esimeses tööteldi reovett MBR-ga ning teises etapis töödeldi reovett TiO<sub>2</sub>-ga fotokatalüüsiga. Uuringu tulemusena leiti, et MBR ja TiO<sub>2</sub>-fotokatalüüsi kombinatsioon sobib hästi antibiootikumide sisaldava reovee puhastamiseks. Suur osa KHT-st oli kõrvaldati MBR-ga ja fotokatalüütilise oksüdatsiooniga lagundati karbamasepiin. Retsirkulatsioonisuhte 4:1 korral saavutati 95% karbamasepiini lagundamine.

Kuna DOX kuulub tetratsükliinide rühma vaatleme Yahiat jt (2011) tööd, kus uuriti tetratsükliini ja tülosiini kõrvaldamist reoveest. Uuringus kasutatud antibiootikumid olid tetratsükliinhüdrokloriid (95%) ja tülosiintartraad (98%). Kõigepealt puhastati reovett fotokatalüüsiga ning seejärel töödeldi vett aktiivmudaprotsessiga. Fotoreaktoris kasutati UV-lampi, mille maksimaalne lainepikkus ( $\lambda$ ) on 365 nm. Antibiootikumide algkontsentratsioonid olid ~100 mg/l. Optimaalne pH tetratsükliinhüdrokloriidi jaoks oli 3,6 ning tülosiintartraadi jaoks 5,9. Kiiritamise aeg oli 2 tundi. Aktiivmuda koguti kohalikust reoveepuhastusjaamast.



Katse käigus täheldati mõlema antibiootikumi adsorptsiooni fotokatalüütilise materjali peale. Adsorbeerunud kogused olid umbes 39,8% ja 11% esialgsest tetratsükliinhüdrokloriidi ja tülosiintartraadi kogusest. Adsorptsiooni käigus vähenes lahustunud orgaanilise süsiniku hulk (LOS): 41% tetratsükliinhüdrokloriidi ja 6% tülosiintartraadi korral. Kõrget adsorptsiooni saab selgitada antibiootikumide kõrgete algkontsentratsioonidega. Samuti vähenes KHT: 58% tetratsükliinhüdrokloriidi ja 12% tülosiintartraadi töötlemisel. KHT vähenemine on seotud uuritavate antibiootikumide oksüdatsiooniga ja seega nende keemilise struktuuri muutusega, mis võiks põhjustada reovee toksilisuse langust. Fotokatalüütilise oksüdatsiooni käigus oli antibiootikumide täieliku lagunemise aeg 4 ja 20 tundi vastavalt tetratsükliinhüdrokloriidi ning tülosiintartraadi jaoks. Fotokatalüüsi käigus lagundati 98,3% tetratsükliinhüdrokloriidist ja 80,6% tülosiintartraadist.

Töö tulemusena leiti, et LOS ja KHT vähenemine näitavad, et vees toimub tetratsükliinhüdrokloriidi ja tülosiintartraadi osaline või täielik mineraliseerumine. Sellest tuleneb järeldus, et fotokatalüüsi kombineerimine aktiivmudaprotsessiga sobib antibiootikume sisaldava reovee puhastamiseks ning fotokatalüüsi saab kasutada reovee eeltöötlemiseks, et tõsta antibiootikume sisaldava reovee biolagundatavust.

Analüüsitud kombinatsioonidest kasutati osoonimist esimese etapina ja tehti kindlaks, et selline kombinatsioon sobib hästi karbamasepiini ja venafaksiini eemaldamiseks reoveest. Fentoni protsessi kasutati reovee eeltöötlemiseks ning Fentoni protsess osutus kõige efektiivsemaks. Vaadeldes fotokatalüüsi kombinatsiooni bioloogiliste meetoditega selgub, et efektiivsus sõltub konkreetsest süsteemist ja saasteainest.

Antud magistritöö eksperimentaalses osas uuritakse doksütsükliini lagundamist fotokatalüüsi ja aktiivmudaprotsessi kombineerimisel.

## 2 Eksperimentaalne osa

Käesoleva magistritöö eesmärk oli uurida eksperimentaalselt kombineeritud protsessi – aktiivmudaprotsess koos fotokatalüüsiga - sobivust doksütsükliini sisaldava reovee puhastamiseks.

Katsed teostati kahes etapis: esimene etapp viidi läbi 2015. a veebruarist kuni juunini (katse A), teine algas sügisel 2015 ja lõppes talvel 2015 (katse B). Teades esimeses etapis tekkinud probleeme ja tulemusi, oli teises etapis võimalik korrigeerida protsessiparameetreid ja -tingimusi, et tõsta puhastusefektiivsust.

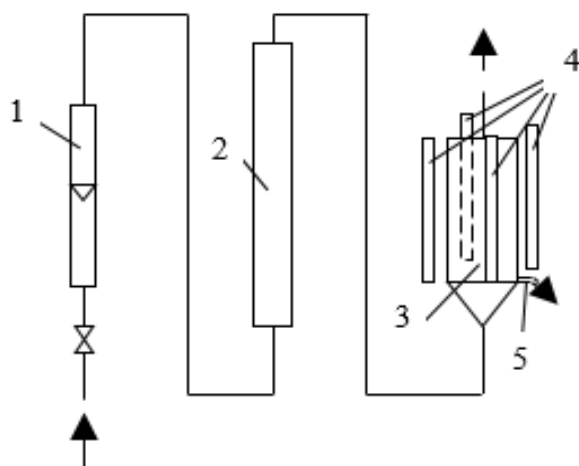
### 2.1 Katsetoetodika

#### 2.1.1 Katseseadmed

Kuna uuriti fotokatalüütilise ja bioloogilise puhastuse protsesside kombinatsiooni sobivust antibiootikumi sisaldava vee puhastamiseks, kasutati reovee eeltöötlemiseks fotokatalüütilise oksüdatsiooni protsessi (FKO) ja seejärel aeroobset biooksidatsiooni (ABO) – aktiivmudaprotsessi. Fotokatalüütiline eeltöötlemine toimus fotokatalüütilises perioodilises keevkihtreaktoris (inglise k *photocatalytic fluidized-bed reactor*) ja aktiivmudaprotsess toimus pidevas segureaktoris (inglise k *continuous stirred tank reactor*, CSTR).

#### *Fotokatalüüsiseade*

Fotokatalüütiline eeltöötlus toimus perioodilises keevkihtreaktoris, mille maht oli 2 liitrit. Reaktor, mille sisemine läbimõõt oli 144 mm, oli valmistatud UV-A-kiirgust läbilaskvast pleksiklaasist Plexiglas® XT (Evonik). Reaktori põhja oli paigaldatud difuuser, läbi mille juhiti reaktorisse suruõhk keevkihi tekitamiseks. Katalüsaatorina kasutati TiO<sub>2</sub>, mis oli kantud keramsiidile meetodiga, mis on kirjeldatud Pronina jt (2014) töös. Keramsiit pandi reaktorisse, kus see hõljus keevkihis. UV-allikana kasutati nelja 24 W-võimsusega UV-A lampi (Philips PL-L), mille suurim emissioon oli 365 nm juures. Lambid olid paigaldatud reaktori ümber. Temperatuur reaktoris oli 20 ± 4 °C. Reaktori tööaeg oli katses A 3 tundi ja katses B 4,5 tundi. Joonisel 6 on esitatud FKO keevkihtreaktori skeem.



**Joonis 6. Fotokatalüütilise perioodilise keevkihtreaktori skeem**  
**1 – rotameeter, 2 – õhuniisutaja, 3 – reaktor, 4 – UV-A-lambid, 5 – proovivõtukoht**

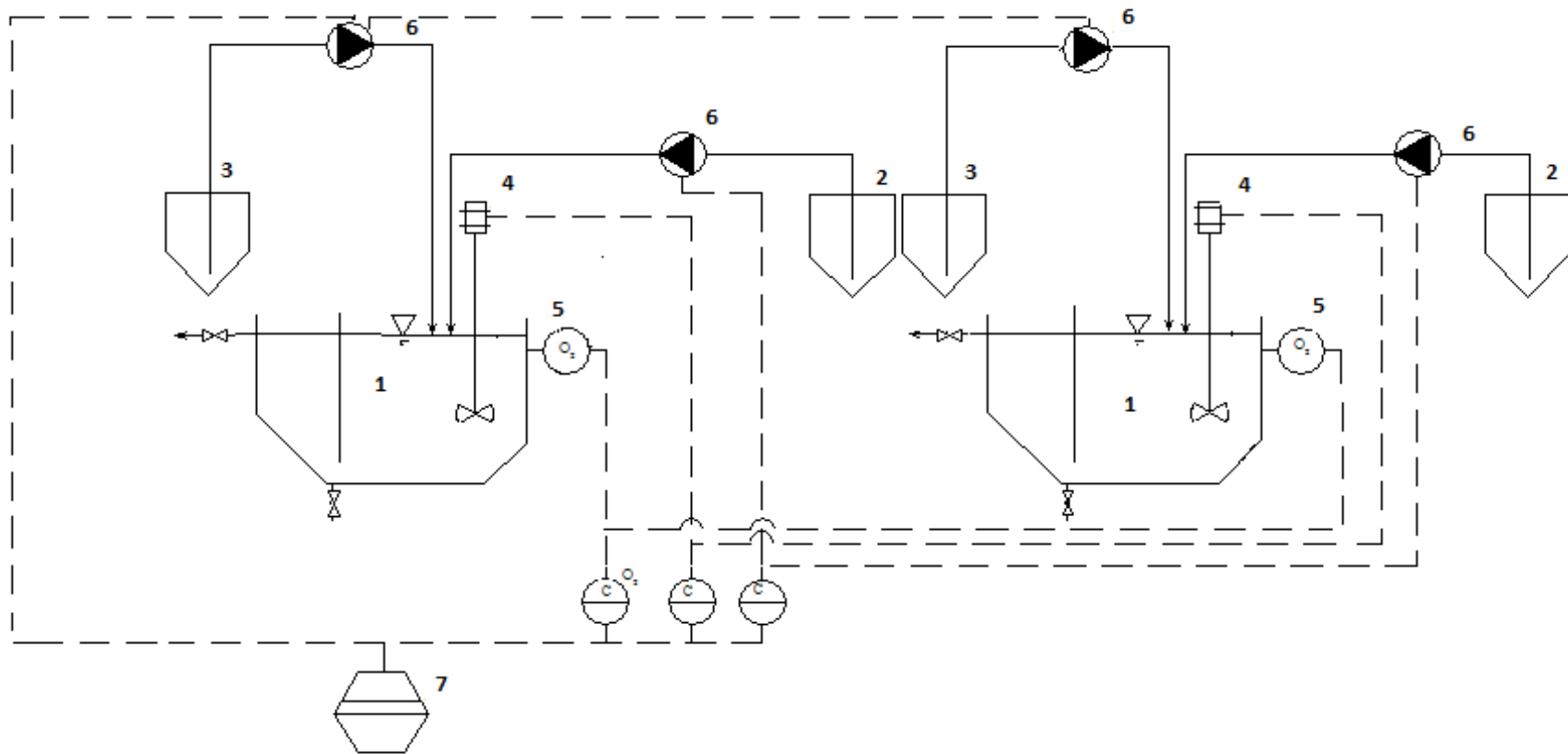
### ***Aeroobse biooksidatsiooni seade***

ABO seade koosnes kahest paralleelsest pidevalt töötavast aeroobsest aktiivmudareaktorist:

- kombineeritud protsessi aktiivmudareaktor (KR), milles puhastati fotokatalüütiliselt töödeldud mudelreovett
- võrdlusreaktor (VR), milles puhastati fotokatalüütiliselt töötlemata mudelreovett.

Reaktorid olid sarnased ja töötasid ühesugustel tingimustel.

Aktiivmuda protsessi käivitamiseks saadi Tallinna Reoveepuhastusjaamast. Mõlema reaktori aeratsioonikambri maht oli 7,5 l ja settimiskambri maht 2,5 l. Reaktorid olid varustatud peristaltilise pumbaga Masterflex 7518, hapnikuanduriga Marvet Junior, õhu kompressoritega MaximaR. Lähtelahus juhiti reaktorisse automaatselt pumbaga. Töödeldud lahus voolas reaktorist välja läbi ülevoolu. Reaktorite õhustus toimus kahe kompressoriga, millest üks töötas pidevalt ja teine hakkas töötama automaatselt, kui lahustunud hapniku sisaldus langes alla 2 mg/l. Reaktoris toimus segamine tänu aeratsioonile ning mehaanilisele segistile. Temperatuur reaktoris oli 20 °C. Tahkiste viibimisaeg SRT oli 7 ööpäeva ja hüdrauliline viibimisaeg HRT oli 1 ööpäev. Doksütsükliin juhiti reaktorisse eraldi asuvast mahutist tefloontorustiku kaudu, selleks et vältida DOX kadusid DOX adsorptsioonist anumate seintele ja torustikule. Mudelreovett pumbati automaatpumpaga (Micro-dose pump, type 335A). Aktiivmudareaktori skeem on toodud Joonisel 7.



*Joonis 7. Joonis 7. Aktiivmuda reaktori skeem*

*1 - aktiivmudareaktorid, 2 – mudelreovee mahutid, 3 - DOX mahutid, 4 - segistid, 5 - hapnikuandurid,  
6 - pumbad, 7 - automaatjuhtimissüsteem*

### 2.1.2 Katse käik

Katse A kestel oli kolm perioodi. Esimesel perioodil uuriti mudelreovee (koostis Tabelis 3) aeroobset biooksidatsiooni (ABO), mõlemasse aktiivmudareaktorisse juhiti mudelreovett, mis ei sisaldanud antibiootikumi (MR). Sellel perioodil testiti mõlemas reaktoris aeroobse biooksidatsiooni (ABO) efektiivsust antibiootikumi mittesisaldava reovee puhastamisel. Sellele järgnes nn üleminekuperiood (periood 2), kus mõlemasse reaktorisse hakati juhtima doksütsükliini sisaldavat mudelreovett (MR<sub>DOX</sub>). Sellel perioodil adapteeriti aktiivmuda uue reoveega.

Pärast muda adapteerumist algas kolmas periood, kus uuriti DOX sisaldava reovee (MR<sub>DOX</sub>) puhastamist kombineeritud protsessiga – fotokatalüütiline oksüdatsioon koos järgneva aeroobse biooksidatsiooniga (FKO+ABO) – ja traditsioonilise aeroobse oksüdatsiooniga (ABO). Selleks töödeldi eraldi olevas fotokatalüüsiseadmes perioodiliselt reovett MR<sub>DOX</sub> ning juhiti seejärel kombineeritud protsessi reaktorisse KR. Samal ajal võrdlusreaktorisse VR juhiti töötlemata reovesi MR<sub>DOX</sub>.

Analoogiliselt viidi läbi katse B. Katse A ja B erinevate perioodide iseloomustus on esitatud Tabelis 3.

**Tabel 3. Katse A ja B erinevate perioodide iseloomustus**

Katse	Periood	Kestvus	Reovee tüüp	DOX algkontsentratsioon, mg/l	KR protsess	VR protsess
A	1	105 ööpäeva	MR	0	AOB	AOB
	2	39 ööpäeva	MR <sub>DOX</sub>	25	AOB	AOB
	3	37 ööpäeva	MR <sub>DOX</sub>	25	FOK +AOB	AOB
B	1	55 ööpäeva	MR	0	AOB	AOB
	2	24 ööpäeva	MR <sub>DOX</sub>	10	FOK +AOB	AOB
	3	42 ööpäeva	MR <sub>DOX</sub>	10	FOK +AOB	AOB

Siin: FOK +AOB – fotokatalüütiliselt töödeldud reovee aeroobne biooksidatsioon,

AOB - eeltötluseta reovee aeroobne biooksidatsioon.

Katses A oli mudelreovee FKO protsess perioodiline, kestvusega 3 tundi, ning DOX kontsentratsioon muutus 25-st kuni keskmiselt 10 mg/l-ni. Selle tõttu oli doksütsükliini doos võrdlusreaktorisse VR ja kombineeritud protsessi reaktorisse KR esimese 17 päeva jooksul 2,5 ja 1 mg/ööpäev vastavalt; alates 18. katsepäevast suurendati DOX doosi 10 korda ning reaktoritesse juhiti 25 ja 10 mg/ööpäev. Mudelreovee mahtkulu reaktoritesse oli ühesugune.

Katses B oli doksütsükliini algkontsentratsioon võrdlusreaktoris VR 10 mg/l (DOX doos 10 mg/ööp). Mudelreovee fotokatalüütilise lagundamise protsess oli perioodiline, kestvusega 4,5 tundi, ning DOX kontsentratsioon muutus 10 mg/l kuni alla 1 mg/l-ni ning antud mudelreovett juhiti KR reaktorisse.

### 2.1.3 Kasutatud reaktiivid

Ekspriimentide käigus kasutati järgmisi kemikaale:

- doksütsükliinhüklaat,  $C_{22}H_{24}N_2O_8$ , HCl,  $\frac{1}{2} C_2H_6O$ ,  $\frac{1}{2} H_2O$  (Doxycycline Hyclate Biochemica, Panreac Applichem);
- metanool,  $CH_3OH$ , ( $\geq 99,8\%$ , Sigma-Aldrich)
- atsetonitriil,  $CH_3CN$  (CHROMASOLV® gradient grade, for HPLC,  $\geq 99,9\%$  Sigma-Aldrich);
- sipelghape,  $CH_2O_2$  (99%, Merck)
- väävelhape,  $H_2SO_4$
- $NH_4OH$  (Ammonia solution 25%, Merck)
- $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ ,  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$  ( $\geq 99\%$ , USP)

Mudelreovesi valmistati laboris. Valmistatud lahus imiteeris munitsipaalreovett. Reovett valmistati bakterioloogilise peptooni kontsentraadist, loomaliha ekstrakti kontsentraadist ja ka teistest reaktiividest ning lahjendati kõik reovee komponendid kraaniveega vajaliku kontsentratsioonini. Mudelreovee koostis on esitatud Tabelis 3.

**Tabel 4. Mudelreovee koostis**

Aine	Kontsentratsioon, g/l
Bakterioloogiline peptoon	0,16
Loomaliha ekstrakt	0,11
Urea	0,03
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0,057
NaCl	0,007
CaCl <sub>2</sub>	0,003
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,002
CH <sub>3</sub> COONa	0,06

## 2.1.4 Analüüsimetoodika

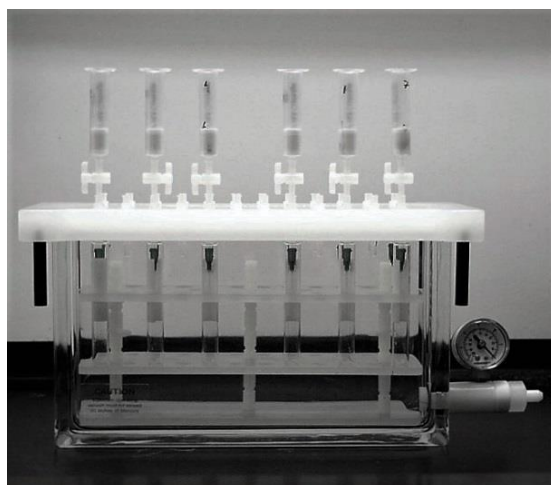
### 2.1.4.1 Analüüsiseadmed

Doksütsükliini kontsentratsioonid proovis määrati kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (Shimadzu LC-MS 2020), mis on varustatud fotodiodrividetektoriga ja mass-spektromeetriga. Ainete segu/proovi lahutamiseks kolonni Phenomenex Gemini-NX 5u C18 110A 150x2,0 sisediameetriga oli 1,7 µm. Elueerimiseks kasutati kahte eluenti. Esimene (A) oli 0,3% sipelghappe vesilahus ning teine (B) atsetonitriil. Eluendi voolukiirus 0,3 ml/min. Fotodiodrividetektor töötas skaneerimisrežiimis lainepikkustel 190-800 nm.

Doksütsükliini sisaldust bioreaktori väljuvoolu proovides määrati kvantitatiivselt mass-spektromeetriga SIM (valitud ionide seire, m/z = 445) režiimil saadud mass-kromatogrammilt. Doksütsükliini sisaldust mudas määrati PDA detektoriga.

Mudelreovee hägusus ja KHT määrati Helios Beta spektrofotomeetriga (Spectronic Unicam). Mikroorganismide hapnikutarbimisekiirust (inglise k *Oxygen Uptake Rate*, OUR) ning reovee BHT määrati kasutades lahustunud hapniku andurit SevenGo® pro Portable Dissolved Oxygen Meter, Mettler Toledo®. Üldise orgaanilise süsiniku sisaldust määramiseks kasutati analüsaatorit AnalytikJena multi N/C 3100. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ja NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ionid määrati ionkromatograafia 761 Compact IC.

Tahkefaasekstraktsiooniks (inglise k *solid phase extraction, SPE*) kasutati strata-XL-CW kolonne Phenomenex, 500 mg/6 ml. SPE seade on näidatud Joonisel 8 ja koosneb seadmest Vacuum Manifold (Macherey-Nagel, CHROMBOND®) ja vaakumpumpast KNFN86 KT.18.



*Joonis 8. SPE kolonn (Web15)*

#### **2.1.4.2 Doksütsükliini kontsentratsiooni määramine**

##### ***Doksütsükliini kontsentratsiooni määramine vees***

Katsetes määrati töödeldud reovees DOX kontsentratsiooni.

DOX kontsentratsiooni määramiseks vedelikromatroofiga tuleb proovid eelnevalt puhastada ja kontsentreerida. Selleks kasutati SPE protsessi. Alguses võeti kasutusele meetodid, mis on kirjeldatud Laasi (2015) magistritöös, kuid analüüsi efektiivsuse parandamiseks täiustati seda meetodit. Võrreldes Laasi (2015) tööga lühendati kolonni pesemise tsüklit (kasutati 1x6 ml bidestilleeritud vett ja metanooli), kuivatusaeg oli pikem (25 min) ning käesolevas töös kasutati sihtkomponendi elueerimiseks 5% list sipelghappega hapustatud metanooli.

Enne SPE-d pesti strata-XL-CW kolonnid. Pesemiseks kasutati hapustatud vett (bidestilleeritud vesi, mis oli hapustatud H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ga, tulemusena vee pH oli 2 juures). Seejärel kolonnid pesti 5%-lise sipelghappega hapustatud metanooliga.

Pärast kolonnide pesemist valmistati standardid ja heitvee proovid. Standardite lahjendusveena kasutati varem jälsetitist kogutud töödeldud reovett (vesi koguti katse alguses, enne DOX lahuse juhtimist sissevoolu ja säilitati temperatuuril -18 °C). Standardide valmistamiseks kogutud vesi sulatati ja seejärel filtriti läbi membraanfiltri (Express Pluss® Membrane). 0,1 liitri standardivee kohta lisati 0,05 g Na<sub>2</sub>EDTA-d. Standardi pH-i reguleeriti vahemikus 5-6



ning reguleerimiseks kasutati 2,8%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  või 15%  $\text{NH}_4\text{OH}$ . pH-d mõõdeti pH-meetriga Mettler Toledo mp 225. Standardid valmistati kontsentratsioonivahemikus 0,01 mg/l kuni 0,5 mg/l.

Heitvee proovid DOX määramiseks võeti katse käigus kord nädalas bioreaktori järelsetitist ning säilitati temperatuuril  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ . Enne analüüsimist proovid sulati ning proovis olevate tahkete osakeste eraldamiseks kasutati tsentrifuugi (Janetzki S70; kasutati 2000 pööret/min, 20-30 min). Pärast tsentrifugimist lisati 0,1 liitri proovi kohta 0,05 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ja kontrolliti lahuse pH-d. pH pidi olema vahemikus 5-6.

Strata-XL-CW kolonnide ettevalmistamiseks pipeteeriti 6 ml metanooli kolonni ja lasti sellel kolonnist välja voolata. Seejärel pipeteeriti 6 ml bidestilleeritud vett ja samuti lasti kolonnist välja. Peale ettevalmistust pipeteeriti kolonni 10 ml standardite ja 10 ml analüüsitavat proovi. Kui analüüsitav lahus oli kolonnist välja voolanud, pesti kolonni jälle 6 ml bidestilleeritud veega ja seejärel 6 metanooliga. Siis kolonne kuivati 25 minutit vaakumis (vaakumpump, KNFN86 KT.18). Doksütsükliini väljapesemiseks kasutati 6 ml 5% metanooli. Kolonnist väljuv hapustatud metanool koguti katseklaasi.

Peale väljapesemist aurustati kogutud proovid kuivaks veevannis lämmastikuvoos. Aurustamiseks kulus 40-45 minutit. Kui proov oli kuivatatud, lahustati see 2 ml HPLC algeluendis (0,3% sipelhape, 5% atsetonitriili vees). Doksütsükliini analüüsi kvantitatiivselt MS-detektoriga standarditega tehtud kalibratsioonikõvera alusel.

### ***Doksütsükliini kontsentratsiooni määramine aktiivmudas***

Aktiivmuda proovid võeti bioreaktorist katse alguses (need ei sisaldanud DOX) ning samuti võeti proovid katse käigus (sisaldasid DOX). Bioreaktorist võeti kord nädalas aktiivmuda proov ja pandi jääkambrisse (temperatuuril  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ ). Peale sulatamist analüüsitavat mudaproovi tsentrifuugiti 30 min ja pöörete arvu 2600 1/min juures. Vedelfaas eraldati ja mudale lisati DOX ekstraheerimiseks 15 ml McIlvaine/EDTA lahust, mille pH oli 5 (0,5 l McIlvaine/EDTA lahuse valmistamiseks kasutatakse: 5,0689 g sidrunhapet, 18,4349 g  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1,86 g  $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$ ). Seejärel lahus (ekstrakt) eemaldati mudast ning korraldati ekstraktsiooni (kuni 8 tsükli). Ekstrakt koguti ning filtreeriti läbi membraanfiltri (Express Pluss® Membrane). Kvantitatiivselt analüüsi PDA detektoriga kasutades eelnevalt tehtud kalibratsiooni.

### 2.1.4.3 Reovee ja aktiivmuda analüüs

#### *Reovee analüüsid*

Katsetes määrati bioreaktorisse siseneva ja väljuva reovee järgmisi parameetreid:

- BHT, vastavalt standardmeetodile 5210B;
- KHT, vastavalt standardmeetodile 5220A;
- TOC, AnalytikJena multi N/C 3100 analüsaatoriga;
- NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ja NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ioonide kontsentratsioon, määramiseks kasutati 761 Compact IC ionkromatograafi.

Samuti määrati bioreaktoris oleva reovee järgmised parameetrid:

- Hägusus, vastavalt standardmeetodile 2130A. Kasutati Helios Beta spektrofotomeetrit ja määrati lainepikkusel 800 nm.
- pH pH-meetri Mettler Toledo mp 225.

#### *Aktiivmuda analüüsid*

Katsetes määrati bioreaktoris oleva aktiivmuda järgmised parameetrid:

- SVI vastavalt standardmeetodile 2710D;
- Aktiivmuda kontsentratsioon MLSS (ingl k *mixed liquor suspended solids*) vastavalt standardmeetodile 2540A;
- Aktiivmuda kontsentratsioon väljendatud MLVSS (ingl k *mixed liquor volatile suspended solids*) kaudu . Kuumutusjääk e MLVSS, mis määratakse, et kontrollida lenduvate orgaaniliste ainete sisaldust. Kõigepealt kuivatati portselankaussi püsiva kaaluni 5 tundi ja 550 °C juures. Pärast kuivatamist jahutati see eksikaatoris ja kaaluti. Seejärel kaaluti portselanikausid koos filtraadiga (kuivjääkiga) ning kuivatati ahjus samadel tingimustel: 5 tundi ja 550 °C. Edasi jahutati portselanikausid koos filtraadiga eksikaatoris ja kaaluti analüütilistel kaaludel ning kaalutiste järgi arvutati MLVSS.
- Mikroorganismide hapniku eritarbimise kiirus (sOUR), mis näitab mikroorganismide hapnikutarvet. 100-ml silindrisse valati 30 ml vett bioreaktorist ja 70 ml destilleeritud vett. Seejärel küllastati segu hapnikuga. Aereeriti 15-20 min jooksul, aereerimise käigus segati aktiivmudasegu. Seejärel segu valati BHT pudelisse, lisati 10 ml mudelreovett (sissevoogu), pandi magnetsegajale ja pudelisse asetati hapnikuandur. Hapniku kontsentratsiooni registreeriti kuni lahustunud hapniku sisaldus langes 2 mg/l-ni.

## 2.2 Tulemused ja arutelu

### 2.2.1 Katse A tulemused

Katse A koosnes kolmest perioodist (Tabel 3).

Tabelis 5 on esitatud reaktorite tööd iseloomustavad parameetrid katse A esimesel perioodil. Sellel perioodil uuriti mudelreovee aeroobset biooksüdatsiooni (ABO), mõlemasse aktiivmudareaktorisse juhiti mudelreovett, mis ei sisaldanud antibiootikumi (MR).

**Tabel 5. Reaktorite tööd iseloomustavad parameetrid katse A esimesel perioodil**

Parameeter	Kombineeritud reaktor (FKO + ABO)	Võrdlusreaktor (ABO)
MLSS, g/l	2,1	2,6
MLVSS, g/l	1,9	2,4
SVI, ml/g	89,7	82,6
sOUR, mgO <sub>2</sub> /(min*gMLVSS)	3,9	4,1
Hägusus, FAU	muutuv	muutuv
pH	7,3	7,3
Puhastusefektiivsus ΔTOC, %	94,0	94,0
Puhastusefektiivsus ΔKHT, %	91,0	90,2
Puhastusefektiivsus ΔBHT, %	99,8	99,8

Tabelist 5 on näha, et mõlema reaktori tööd iseloomustavate parameetrite väärtused olid antud perioodil lähedased. KR reaktori efektiivsus oli TOC, KHT ja BHT järgi hea – keskmised väärtused oli vastavalt 94,0%, 91,0% ja 99,8% ja need tulemused langesid praktiliselt kokku võrdlusreaktori VR efektiivsusega, mis tähendab, et mõlemad reaktorid töötasid samades tingimustes sarnaselt ja nende tööd saab võrrelda omavahel.

Enne teist perioodi s.o enne DOX sisaldava reovee juhtimist KR reaktorisse stabiliseerus hägusus väärtusel 0,8 FAU ja NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kontsentratsioon oli vahemikus 225,2 - 230,3 mg/l. VR reaktoris muutus hägusus vahemikus 0,02 - 0,5 FAU. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-kontsentratsioon võrdlusreaktori heitvees varieerus ja stabiliseerus 201,6 mg/l juures.

Esimesele perioodile järgnes nn üleminekuperiood (periood 2), kus mõlemasse reaktorisse hakati juhtima doksütsükliini sisaldavat mudelreovett ( $MR_{DOX}$ ). Sellel perioodil adapteeriti aktiivmuda uue reoveega.

Pärast aktiivmudareaktorite adapteerumist doksütsükliini sisaldavale reoveele, algas katse A kolmas periood. Tabelis 6 on esitatud reaktorite tööd iseloomustavad parameetrid katse A kolmandal perioodil, kus uuriti DOX sisaldava reovee ( $MR_{DOX}$ ) puhastamist kombineeritud protsessiga – fotokatalüütiline oksüdatsioon koos järgneva aeroobse biooksidatsiooniga (FKO+ABO) – ja traditsioonilise aeroobse oksüdatsiooniga (ABO). Selleks töödeldi eraldi olevas fotokatalüüsiseadmes perioodiliselt reovett  $MR_{DOX}$  ning juhiti seejärel kombineeritud protsessi reaktorisse KR. Samal ajal võrdlusreaktorisse VR juhiti töötlemata reovesi  $MR_{DOX}$ .

**Tabel 6. Reaktorite tööd iseloomustavad parameetrid katse A kolmandal perioodil**

Parameeter	Kombineeritud reaktor (FKO + ABO)	Võrdlusreaktor (ABO)
MLSS, g/l	2,5	2,4
MLVSS, g/l	2,4	2,8
SVI, ml/g	315,2	muutuv
pH	6,9	6,9
Puhastusefektiivsus $\Delta$ TOC, %	91,0	92,0
Puhastusefektiivsus $\Delta$ KHT, %	88,0	89,4
Puhastusefektiivsus $\Delta$ BHT, %	99,6	99,7
DOX kõrvaldamise %	90,0	94,0

Võrreldes kolmandal perioodil saavutatud puhastusprotsessi iseloomustavaid parameetreid esimesel perioodil saadud parameetritega on näha järgmised erinevused.

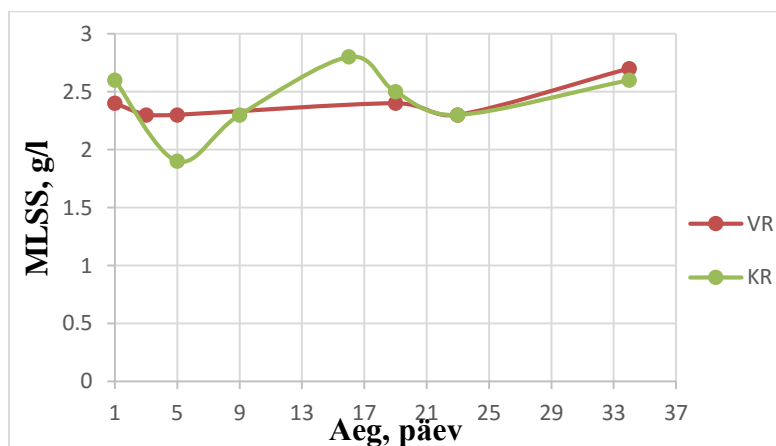
Kolmandal perioodil ilmnes, et vastupidiselt oodatule oli ABO protsessi efektiivsus nii TOC, KHT ja BHT kui ka DOX vähenemise osas kõrgem kombineeritud puhastusprotsessis. KR reaktoris olid TOC, KHT ja BHT keskmised puhastusefektid vastavalt 91,0%, 88% ja 99,6%. Samal ajal võrdlusreaktor saavutas kõrgema TOC, KHT ja BHT keskmise vähenemise (vastavalt 92,0%, 89,4% ja 99,7%).

Kusjuures KR reaktori efektiivsus KHT järgi oli tavalise mudelreovee puhastamisel 91,0% ja ja pärast, DOX sisaldava reovee puhastamisel 88,0% , samuti oli võrdlusreaktori VR efektiivsus

tavalise mudelreovee puhastamisel KHT järgi 90,2% ja pärast DOX sisaldava reovee puhastamisel 89,4%. Seega nii KR reaktoris kui ka VR reaktoris mõjutas antibiootikum reovees bioreaktorite tööd, tõenäoliselt avaldades toksilist mõju mikroorganismide tegevusele, kuid antibiootikumi mõju KHT vähenemisele oli madal.

Shi jt (2013) täheldasid, et tetratsükliinid võivad tekitada toksilist mõju aktiivmudale, põhjustada nitrit-ioonide akumulatsiooni ning inhibeerida nitrifikatsiooni protsessi. Bioreaktoritest väljuvas heitvees olid alati nitraat-ioonid. Nii KR reaktoris kui ka VR reaktoris põhjustas  $MR_{DOX}$  reovee puhastusele üleminek nitrit-ioonide kontsentratsiooni suurenemise, kuid perioodi 37. päevaks oli see 0 mg/l. KR reaktoris põhjustas DOX doos 1 mg/ööpäev nitraat-ioonide kontsentratsiooni suurenemise ja 16. katsepäevaks oli see 226,0 mg/l. Üleminek suurema DOX doosi juurde põhjustas nitraat-ioonide kontsentratsiooni suurenemist 168,8 kuni 188,4 mg/l-ni. VR reaktoris põhjustas DOX doos 2,5 mg/ööpäev nitraat-ioonide kontsentratsiooni suurenemise ja 16. katsepäevaks oli see 254 mg/l, DOX doosi 25 mg/ööpäev juures suurenes  $NO_3^-$  kontsentratsioon 174,4 kuni 214,0 mg/l-ni.

MLVSS väärtused suurenesid 1,9 mg/l kuni 2,4 mg/l-ni KR reaktoris ja 2,4 mg/l kuni 2,8 mg/l-ni võrdlusreaktoris, kuid MLVSS/MLSS suhe oli stabiilne katse käigus, 0,8 ja 0,7 vastavalt KR reaktoris ja VR reaktoris. Võrdlusreaktoris suurenes MLSS 2,3 g/l-st kuni 2,7 g/l-ni. KR reaktoris suurenes MLSS vahemikus 1,9 - 2,8 g/l. MLSS muutused kummaski reaktoris katse A kolmandal perioodil on esitatud Joonisel 8.

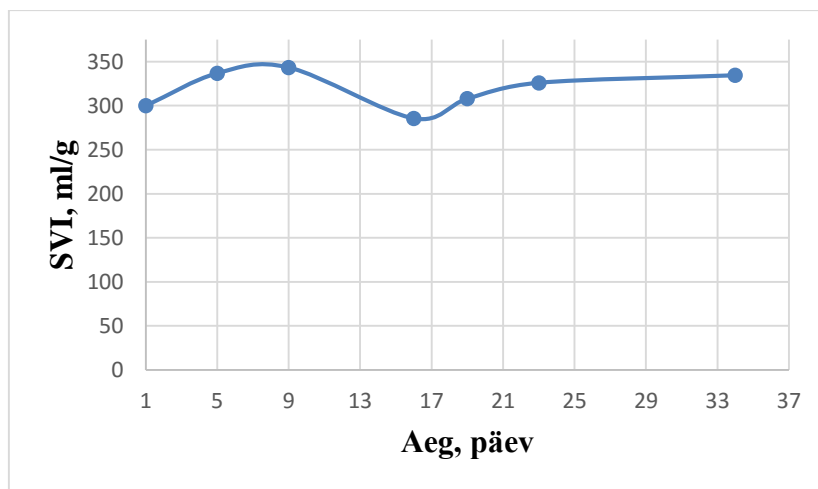


**Joonis 8. Aktiivmuda kontsentratsiooni MLSS muutumine reaktorites katse A kolmandal perioodil**

Joonisel 8 on näha, et DOX juuresolek mõjutas kombineeritud puhastusprotsessi MLSS-i muutumist. MLSS esimest katsepäevast langes ning 5. katsepäeval oli see 1,9 g/l juures.

Süsteemaatiline antibiootikumi juhtimine põhjustas mikroorganismide kohanemist ja 16 katsepäevaks MLSS oli 2,8 g/l. 17. katsepäeval suurendati DOX doosi 10 korda, mis põhjustas MLSS langemist kuni 2,3 g/l, kuid 34. katsepäevaks see suurenes ja oli 2,6 g/l juures.

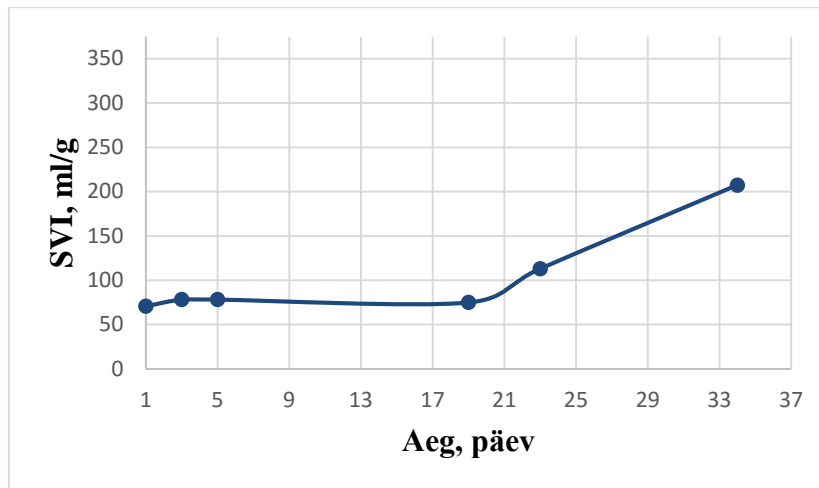
Katse A kolmandal perioodil suurenes mõlemas reaktoris mõnevõrra muda mahuindeksi SVI väärtus. Juba katse teisel päeval tõusis KR reaktoris SVI üle 300,0 ml/l, 34. katsepäevaks saavutas SVI väärtuse üle 330,0 ml/l. Võrreldes SVI väärtusega esimesel perioodil, kui puhastati tavalist mudelreovett (MR ilma DOX-ta), oli SVI umbes 3,5 korda kõrgem. KR reaktori SVI väärtuste muutumine katse A kolmandal perioodil on esitatud Joonisel 9:



**Joonis 9. Muda mahuindeksi SVI muutus KR reaktoris katse A kolmandal perioodil**

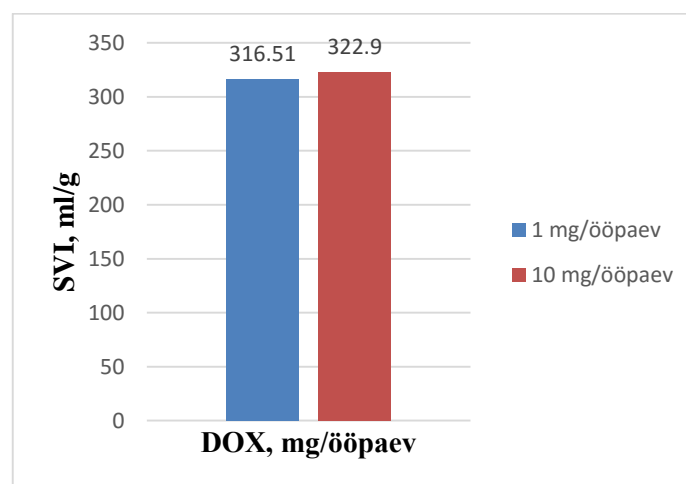
Joonisel 9 on näha, et alates esimesest katsepäevast kombineeritud protsessi SVI alguses suurenes, kuid stabiilne DOX juhtimine reaktoris võis põhjustada mikroorganismide kohanemist ning 16. katsepäevaks SVI oli 285,7 ml/g juures, kuid üleminek DOX 1 mg/ööpäev kuni 10 mg/ööpäev põhjustas SVI suurenemist ja 34. katsepäevaks suurenes kuni 334,6 ml/g.

Võrdlusreaktori SVI ei muutunud nii suureks võrreldes kombineeritud protsessiga, kuid SVI samuti kasvas ja 34. katsepäevaks oli see üle 200,0 ml/g. Võrreldes esialgsuga SVI suurenes 1,9 korda. Võrdlusreaktori SVI muutused ajas on esitatud Joonisel 10.



**Joonis 10. Võrdlusreaktori SVI muutused katse A kolmandal perioodil**

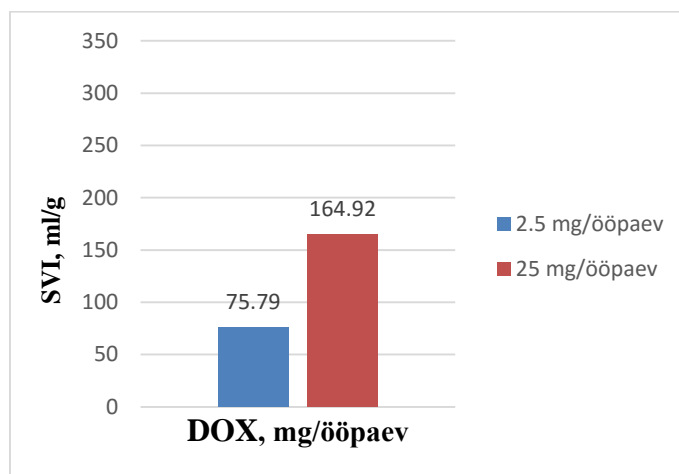
Joonisel 9 on näha, et kombineeritud puhastusprotsessi reaktori SVI muutused 1. katsepäevast ja 37. katsepäevani olid väiksed ja Joonisel 10 on näha, et võrdlusreaktori SVI suurenes 70,8 ml/g-st kuni 207,4 ml/s-ni. Saadud tulemused näitavad, et mõlemas reaktoris DOX juuresolek mõjutas aktiivmuda settivust – settivus halvenes, mis viitab häiringutele reaktori töös. Reaktorite SVI suurenemist võib põhjustada niitbakterite moodustumine. Antud katses saab niitbakterite moodustumist põhjendada sellega, et DOX sisalduse tõttu oli reovesi toksiline (Web9). Samuti üleminek suurema DOX doosi juurde ei põhjustanud kombineeritud protsessi SVI märgatavat muutust. KR reaktori keskmised SVI väärtused erinevate DOX dooside juures on toodud Joonisel 11.



**Joonis 11. KR reaktori keskmine SVI väärtus erinevate DOX dooside juures katse A kolmandal perioodil**

Antibiootikum võib kõrgetel kontsentratsioonidel inhibeerida aeroobset biooksidatsiooni ning selle tõttu muda settivus halveneb ja SVI suureneb märkimisväärselt (Samuel ja Anjaneyulu,

2005) ning võrdlusreaktori üleminek suuremale DOX doosile põhjustas aga suurema SVI muutust, umbes 117,0% võrra. Võrdlusreaktori keskmised SVI väärtused erinevate DOX dooside juures on esitatud Joonisel 12.



***Joonis 12. VR reaktori keskmised SVI väärtused erinevate DOX dooside juures katse A kolmandal perioodil***

Katse A kolmandal perioodil heitvee hägususe väärtused olid tavaliselt madalad. Kombineeritud protsessi käigus muutus hägusus vahemikus 0,02 - 0,2 FAU ning võrdlusreaktoris varieerus hägusus samas vahemikus. Teatud niitbakterite juuresolek reaktorites võib samuti põhjustada väikest hägusust. Niitbakterite roll aktiivmudas seisneb selles, et nad moodustavad flokkide tugistruktuuri, tänu normaalsetele flokkidele on heitvesi väiksema hägususega. (Web9). Niitbakterite vohamisel on aga vastupidine efekt.

Katse esimesel perioodil oli aktiivmuda hapniku eritarbimise kiirus sOUR KR-s 3,9 mgO<sub>2</sub>/min\*gMLVSS ja VR-s 4,1 mgO<sub>2</sub>/min\*gMLVSS. sOUR määramisel täheldati, et mõlemas reaktoris põhjustas DOX lisamine reovette sOUR väärtuse vähenemist s.t vähenes biomassi aktiivsus. KR reaktoris sOUR langes 60,0% võrra ja võrdlusreaktoris 51,5% võrra. sOUR väärtusega saab kontrollida mikroorganismide käitumist toksilistes tingimustes. Madal sOUR võib näidata, et biomass on mõjutatud toksilise aine, antud juhul DOX poolt (Web9).



Katse A tulemused näitasid, et kombineeritud protsessi FKO+ABO efektiivsus DOX järgi oli 90,0%, kuid traditsioonilise ABO efektiivsus oli 94,0%.

Võrreldes kaht protsessi oma vahel, on näha, et FKO+ABO protsessi korral DOX kõrvaldamise efektiivsus veefasist oli väiksem kui AOB efektiivsus, kuid adsorbeerunud DOX kontsentratsioon aktiivmudas oli FKO+ABO protsessi korral madalam. 37. katsepäevaks oli KR reaktori aktiivmudas FKO+ABO protsessi tulemusena doksütsükliini kontsentratsioon 4,4 mg DOX/gAS ning VR reaktoris mudas ABO tulemusena 8,1 mg DOX/gAS.

Eelnevalt esitatud SVI, heitvee hägususe ja sOUR analüüsi põhjal võib öelda, et DOX reovee koostises mõjutab üldiselt biomassi negatiivselt põhjustades häiringuid reaktorite töös. Võrreldes kaht protsessi omavahel, on näha, et FKO+ABO protsessi korral muutused olid rohkem nähtavad, millest võib teha järeldust, et katses A fotokatalüütiline eeltöötlemisel enne aktiivmuda protsessi ei toimu esialgse saasteaine DOX-i täielikku mineraliseerimist. See ei ole puuduseks, kuna käesoleva töö eesmärgiks oli uurida fotokatalüüsi potentsiaali muuta doksütsükliini lagunemisproduktid vähem toksilisemateks ning rohkem biolagundavateks. Antud katses fotokatalüüsi kestvus oli 3 tundi ja see polnud piisav, kuna DOX lagunemisel võisid moodustuda doksütsükliini lagunemisproduktid, mis võisid olla toksilisemad kui DOX. Sama tulemuse said näiteks Lopez-Penalver jt (2010), kes uurisid UV- ja UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oksüdatsiooniprotsesside käigus moodustunud tetratsükliinide lagunemisproduktide toksilisust ning tulemused näitasid, et toksilisus suurenes tetratsükliinide lagunemisel.

## 2.2.2 Katse B tulemused

Arvestades eelmise katse tulemusi, määrati katses B täiendavalt ka fotokatalüütilise oksüdatsiooni käigus tekkivate doksütsükliini lagunemisproduktide toksilisust. Toksilisust analüüsis TTÜ keemiatehnika instituudi doktorant Natalja Pronina. Toksilisus aktiivmuda bakterite suhtes määrati nn „viable plate count“ meetodil. Tulemusena leiti, et doksütsükliini alglahuse, mille kontsentratsioon oli 10 mg/l, toksilisus oli 93% võrreldes null-proovidega, DOX lahuse toksilisus pärast 3-tunnist fotokatalüütilise eeltöötlemist oli 84% ning pärast 4,5-tunnist fotokatalüütilist eeltöötlemist 63%.

Katse B koosnes kolmest perioodist (Tabel 3).

Tabelis 7 on esitatud reaktorite tööd iseloomustavad parameetrid katse B esimesel perioodil. Sellel perioodil uuriti mudelreovee aeroobset biooksidatsiooni (ABO), mõlemasse aktiivmudareaktorisse juhiti mudelreovett, mis ei sisaldanud antibiootikumi (MR).

**Tabel 7. Reaktorite tööd iseloomustavad parameetrid katse B esimesel perioodil**

Parameeter	Kombineeritud reaktor (FKO + ABO)	Võrdlusreaktor (ABO)
MLSS, g/l	2,7	2,4
MLVSS, g/l	2,0	1,6
SVI, ml/g	75,2	muutuv
sOUR, mgO <sub>2</sub> /(min*gMLVSS)	1,4	1,5
Hägusus, FAU	3,7	muutuv
pH	6,6	6,8
Puhastusefektiivsus ΔTOC, %	89,0	93,0
Puhastusefektiivsus ΔKHT, %	92,0	88,0
Puhastusefektiivsus ΔBHT, %	99,8	99,4

KR reaktor saavutas heitvee orgaanilise osa lagundamisel hea efektiivsuse nii TOC, KHT kui ka BHT järgi – keskmised väärtused olid vastavalt 89,0%, 92,0% ja 99,8% ning võrdlusreaktoris olid efektiivsuste keskmised väärtused 93,0%, 88,0% ja 99,4% vastavalt.

VR reaktoris SVI alguses varieerus, kuid enne kolmandat perioodi s.o enne doksütsükliini sisaldava mudelreovee juhtimist reaktorisse stabiliseerus vahemikus 56,3 – 64,0 ml/g. Hägusus samuti varieerus ja oli perioodi lõpus 5,6 FAU juures.

Esimesele perioodile järgnes teine periood, kus mõlemasse reaktorisse hakati juhtima DOX sisaldavat mudelreovett ( $MR_{DOX}$ ). Sellel perioodil adapteeriti aktiivmuda uue reoveega.

Pärast aktiivmudareaktorite adapteerumist doksütsükliini sisaldavale reoveele, algas katse B kolmas periood. Tabelis 8 on esitatud reaktorite tööd iseloomustavad parameetrid katse B kolmandal perioodil, kus uuriti DOX sisaldava reovee ( $MR_{DOX}$ ) puhastamist kombineeritud protsessiga – fotokatalüütiline oksüdatsioon koos järgneva aeroobse biooksidatsiooniga (FKO+ABO) – ja traditsioonilise aeroobse oksüdatsiooniga (ABO). Selleks töödeldi eraldi olevas fotokatalüüsiseadmes perioodiliselt reovett  $MR_{DOX}$  ning juhiti seejärel kombineeritud protsessi reaktorisse KR. Samal ajal võrdlusreaktorisse VR juhiti töötlemata reovesi  $MR_{DOX}$ .

**Tabel 8. Reaktorite tööd iseloomustavad parameetrid katse B kolmandal perioodil**

Parameeter	Kombineeritud reaktor (FKO + ABO)	Võrdlusreaktor (ABO)
MLSS, g/l	2,3	2,9
MLVSS, g/l	1,9	1,8
SVI, ml/g	71,0	61,1
pH	6,9	6,9
Puhastusefektiivsus $\Delta$ TOC, %	87,0	89,0
Puhastusefektiivsus $\Delta$ KHT, %	87,5	85,0
Puhastusefektiivsus $\Delta$ BHT, %	99,8	99,2
DOX kõrvaldamise %	95,0	87,0

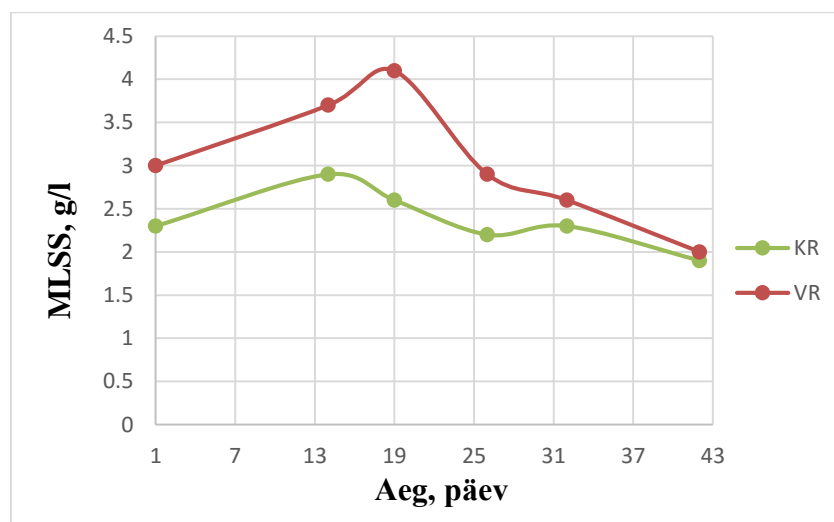
Katse B käigus ei toimunud selliseid nähtavaid muutusi nagu katses A, see võib tuleneda sellest, et katses B suurendati fotokatalüüsi keevkihtreaktori tööaega ning vähendati doksütsükliini algkontsentratsiooni. Kombineeritud reaktori puhul oli DOX doos väiksem kui 1 mg/ööpäev ja võrdlusreaktoris 10 mg/ööpäev.

Kolmandal perioodil KR reaktoris olid TOC, KHT ja BHT keskmised puhastusefektid vastavalt 87,0%, 87,5% ja 99,8%. Samal ajal võrdlusreaktor saavutas kõrgema TOC, KHT ja BHT keskmise vähenemise (vastavalt 89,0%, 85,0% ja 99,2%). KR reaktori efektiivsus KHT järgi

oli tavalise mudelreovee puhastamisel 92,0% ja pärast DOX sisaldava reovee puhastamisel 87,5% , samuti oli võrdlusreaktori VR efektiivsus tavalise mudelreovee puhastamisel KHT järgi 88,0% ja pärast DOX sisaldava reovee puhastamisel 85,0%. KR reaktoris DOX juuresolekul suurenes KHT vahemikus 18,5 – 32,1 mg/l ja VR reaktoris 23,44 – 33,31 mg/l, kuid antibiootikumi mõju KHT vähenemisele oli madal.

Bioreaktoritest väljuvas heitvees esinesid nitrit-ioonid ja nitraat-ioonid. Nii KR reaktoris kui ka VR reaktoris põhjustas DOX-i sisaldava mudelreovee juhtimine reaktoritesse nitrit-iooni kontsentratsiooni suurenemist heitvee. KR reaktoris suurenes nitrit-iooni kontsentratsioon 0,6 kuni 1,2 mg/l-ni ja VR reaktoris oli katse B kolmanda perioodi alguses nitrit-iooni kontsentratsioon 0 mg/l, kuid 41. katsepäevaks oli see 0,44 mg/l. KR reaktoris suurenes nitraat-iooni kontsentratsioon 145,6 kuni 187,7 mg/l-ni ning VR reaktoris 171,7 kuni 201,3 mg/l-ni. Samuti nagu katses A põhjustas DOX juuresolek mudelreovees nitrit-iooni ja nitraat-iooni kontsentratsioonide suurenemist katse B kolmanda perioodi käigus, mis omakorda võib põhjustada nitrifikatsiooni protsessi inhibeerimist (Shi jt ,2013).

VR reaktoris suurenes katse B kolmanda perioodi alguses MLSS, aga pärast 19. katsepäeva hakkas kahanema ning 42. katsepäevaks oli MLSS 2 g/l. KR reaktoris MLSS hakkas kahanema alates 14. katsepäevast ja 42. katsepäevaks oli 1,9 g/l. MLSS muutumine mõlema reaktoris katse B kolmanda perioodi käigus on esitatud Joonisel 13.

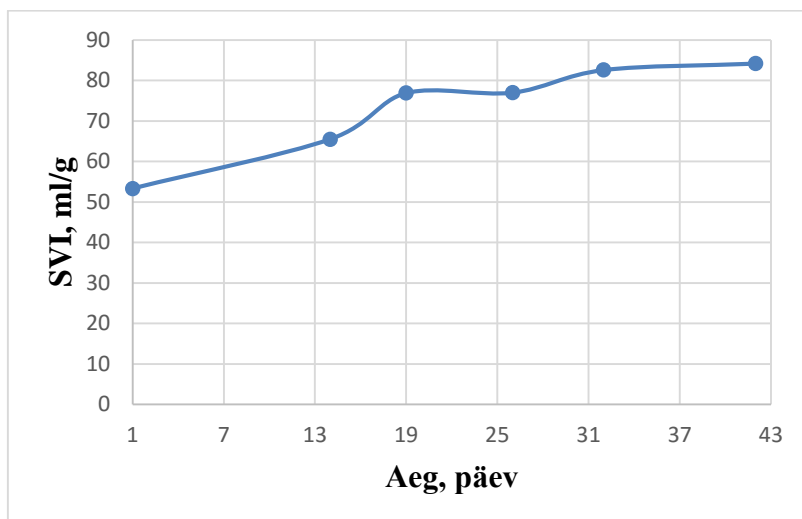


**Joonis 13. Aktiivmuda kontsentratsiooni MLSS muutumine reaktorites katse B kolmandal perioodil**

Joonisel 13 on näha, et mõlemas reaktoris toimus MLSS vähenemine, kuid antibiootikumi juuresolek VR reaktoris põhjustas suurema MLSS vähenemise võrreldes KR reaktoriga.

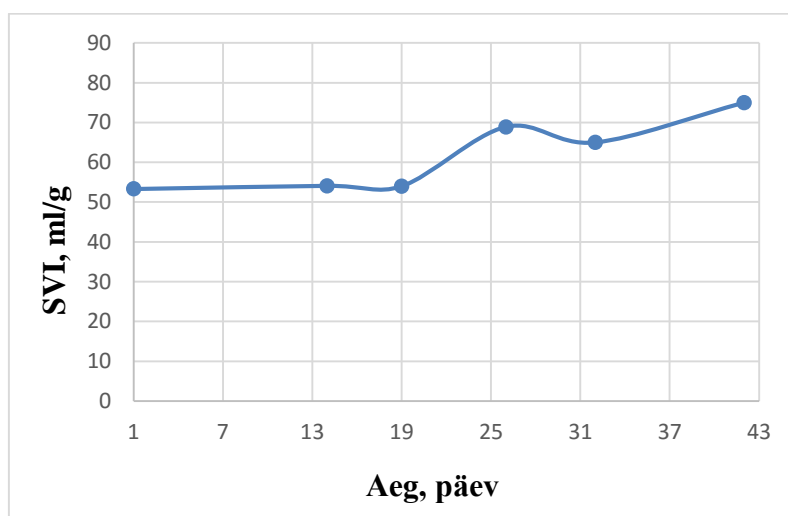
Põhjuseks võib olla kõrgem DOX kontsentratsioon võrdlusreaktorisse sisenevas mudelreovees. Nii näiteks, Samuel ja Anjaneyulu (2005) töös ravimi suure kontsentratsiooni juures MLSS samuti vähenes, mis näitas, et mikroorganismide aktiivsus vähenes ravimi juuresolekul.

Võrreldes katse A tulemustega ei toimunud antud katses kummaski reaktoris SVI märgatavat muutust. Joonisel 14 on esitatud SVI muutus KR reaktoris katse B kolmandal perioodil.



*Joonis 14. Muda mahuindeksi SVI muutus KR reaktoris katse B kolmandal perioodil*

Jooniselt 14 on näha, et KR reaktoris kolmanda perioodi 1. katsepäeval oli SVI 53,3 ml/g juures ja 42. katsepäevaks oli 84,2 ml/g. VR reaktoris 1. katsepäeval samuti oli SVI 53,3 ml/g juures ja 42. katsepäevaks oli 75,0 ml/g. VR reaktori SVI väärtuste muutus katse B käigus on esitatud Joonisel 15.



*Joonis 15. Muda mahuindeksi SVI muutus VR reaktoris katse B kolmandal perioodil*

Joonisel 15 on näha, et VR reaktori SVI paarameter hakkas kasvama alates 19. katsepäevast ning võrdlusreaktori MLSS samuti hakkas kahanema 19. katsepäevast. Sellest tulenevalt antibiootikumi kõrgem kontsentratsioon reovees võib avaldada toksilist mõju aktiivmudale ning inhibeerida bioloogilise oksüdatsiooni protsessi (Samuel ja Anjaneyulu, 2005).

Doksütsükliini juuresolek reaktoris võib põhjustada muda settimise halvenemist ning suurendada väikeste hõljuvate flokkide hulka (Katsou jt, 2016). Nii näiteks, KR reaktori heitvee hägusus suurenes katse B kolmanda periood, 1. katsepäeval oli hägusus 3,5 FAU ning 42. katsepäevaks oli 5,3 FAU juures. Võrdlusreaktoris doksütsükliini sisaldus reovees põhjustas aga hägususe langemist. Katse B alguses oli hägusus võrdlusreaktoris 3,5 FAU ja 42. katsepäevaks oli 2,4 FAU juures. Nagu ka katses A, võis hägususe vähenemist põhjustada niitbakterite sobiv sisaldus võrdlusreaktoris (Web9).

Katse B käigus sOUR määramisel täheldati samuti antibiootikumi mõju aktiivmudale. FKO+ABO käigus vähenes sOUR 23,0% võrra, alates 1,4 kuni 1,1 mgO<sub>2</sub>/min\*gMLVSS. ABO protsessis võrdlusreaktoris langes sOUR 1,5 kuni 0,8 mgO<sub>2</sub>/min\*gMLVSS ehk 46,7% võrra. Võrdlusreaktorisse juhiti doksütsükliini kõrgemal kontsentratsioonil kui KR reaktoris ning see võib olla sOUR suure kahanemise põhjuseks (Web9).

Katse B tulemused näitasid, et et FKO+ABO protsessi efektiivsus DOX järgi oli 95,0% ning oli suurem kui katses A. ABO efektiivsus oli 87,0%. Mõlemas reaktoris antibiootikum adsorbeerus aktiivmudale ja 42. katsepäevaks oli FKO+ABO protsessis reaktoris doksütsükliini kontsentratsioon aktiivmudal 3,4 mg DOX/gAS ning ABO protsessis võrdlusreaktoris DOX kontsentratsioon oli 10,5 mg DOX/gAS.

Katse B käigus ei toimunud KR reaktoris aktiivmudaga nähtavaid muutusi nagu katses A ning FKO+ABO protsessis saavutati parem antibiootikumi kõrvaldamise efektiivsus.

## Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö põhieesmärk oli uurida fotokatalüüsi ja aktiivmudaprotsessi kombineerimise võimalikkust ning nende protsesside efektiivsust doksütsükliini sisaldava vee puhastamiseks. Antibiootikumiks valiti tetratsükliinide rühma kuuluv doksütsükliin (DOX), kuna seda kasutatakse laialdaselt nii meditsiinis kui ka veterinaarias. Doksütsükliin laguneb bioloogiliselt väga aeglaselt ja võib akumulereuda keskkonnas. Sellest tulenevalt on oluline rakendada tõhusaid meetodeid antibiootikumi kõrvaldamiseks reoveest.

Magistritöös koostati kirjandusülevaade ravimite leidumisest looduskeskkonnas, doksütsükliini omadustest ja toimest, klassikalise aktiivmudaprotsessi rakendamisest antibiootikumi sisaldava reovee puhastamiseks ning süvaoksüdatsiooniprotsesside ja bioloogiliste puhastusprotsesside kombinatsioonidest antibiootikumi sisaldava reovee puhastamisel.

Käesoleva magistritöös eksperimentaalses osas uuriti fotokatalüüsi ja aktiivmudaprotsessi kombinatsiooni efektiivsust doksütsükliini sisaldava reovee puhastamiseks. Fotokatalüüsiprotsess toimus perioodilises fotokatalüütilises keevkihtreaktoris ja aktiivmuda protsess toimus pidevas segureaktoris. Aeroobne bioksüdatsiooniseade koosnes kahest paralleelsest aeroobsest aktiivmudareaktorist: kombineeritud protsessi aktiivmudareaktorist, milles puhastati fotokatalüütiliselt töödeldud mudelreovett, ja võrdlusreaktorist, milles puhastati fotokatalüütiliselt töötlemata mudelreovett.

Töö käigus viidi läbi kaks pikaajalist katset. Katse A tulemused näitasid, et kombineeritud protsessi reaktoris doksütsükliini juuresolek põhjustas mitmete parameetrite märgatavaid muutusi (muda mahuindeks, hägusus, biomassi aktiivsus) võrreldes võrdlusreaktoriga, millest võib teha järeldust, et katses A fotokatalüütiline eeltöötlemine enne aktiivmuda protsessi ei viinud esialgse saasteaine mineraliseerumiseni ja 3-tunniline eeltöötlemine polnud piisav. Katse A käigus oli kombineeritud protsessi efektiivsus DOX veefaasist kõrvaldamise järgi 90,0% ja võrdlusreaktori efektiivsus oli 94,0%. Mõlemas reaktoris antibiootikum adsorbeerus aktiivmudale (AS) ja katseperioodi lõpuks oli kombineeritud protsessi reaktoris doksütsükliini kontsentratsioon aktiivmudal 4,4 mg DOX/gAS ning võrdlusreaktoris oli see suurem 8,1 mg DOX/gAS.

Kombineeritud protsessi puhastusefektiivsuse tõstmiseks, vähendati katses B doksütsükliini algkontsentratsiooni reovees 25 mg/l kuni 10 mg/l ning suurendati fotokatalüütilise eeltöötlemise aega 4,5 tunnini, mille käigus DOX kontsentratsioon vähenes 10 mg/l kuni 1

mg/l-ni. Katse B tulemused näitasid, et et kombineeritud protsessi käigus efektiivsus DOX-i kõrvaldamisel oli 95,0% ning oli suurem kui katses A. Aktiivmudaprotsessi efektiivsus oli üle 87,0%. Mõlemas reaktoris DOX adsorbeerus aktiivmudale ja katsete lõpuks oli kombineeritud protsessi reaktoris doksütsükliini kontsentratsioon aktiivmudal 3,4 mg DOX/gAS ning võrdlusreaktoris kontsentratsioon oli 10,5 mg DOX/gAS. Katse B käigus saavutati fotokatalüüsi ja aktiivmudaprotsessi kombineerimisel parema antibiootikumi kõrvaldamise efektiivsus.



## Summary

### **Bio-oxidation of photocatalytically pretreated antibiotic containing wastewater**

Tetracycline-class antibiotic doxycycline (DOX) has been reported to be present in environmental matrices due to its extensive use in human and veterinary medicine. Wastewater treatment plants can not reduce antibiotics fully and can end up the environment via discharges of the treated effluents. For these reasons it is important to develop treatment methods that can be applied for water containing antibiotics. Advanced oxidation processes have been shown to be a promising approach for the removal of antibiotics from wastewater.

The aim of the current thesis was to investigate the effectiveness of the combination of photocatalysis and activated sludge process for treatment of doxycycline containing wastewater. Photocatalytic oxidation took place in a photocatalytic fluidized-bed reactor and for biological oxidation two continuous stirred-tank reactors (CSTR-1 and CSTR-2) were built. CSTR-1 was used for photocatalytically pre-treated DOX solution, CSTR-2 operated as reference reactor. The experiment consisted of two runs: run A and run B. In run A doxycycline initial concentration in influent for CSTR-2 was 25 mg/L. Photocatalytic pretreatment lasted 3 h and DOX concentration reduced from 25 to approx. 10 mg/L. In run B DOX initial concentration in influent for CSTR-2 was 10 mg/L. Photocatalytic pretreatment was 4.5 h and doxycycline concentration reduced from 10 to less than 1 mg/L.

Based on results of run A the elimination of doxycycline from liquid phase occurred up to 90.0% and 94.0% in CSTR-1 and in CSTR-2, respectively. The concentration of DOX on AS by the end of the run A reached approx. 8.1 mg DOX /g AS in CSTR-2 and 4.4 mg DOX /g AS in CSTR-1. In run A photocatalytic pretreatment led to formation of toxic by-products that caused disruption of activated sludge process.

Run B results indicated the elimination of doxycycline from liquid phase up to 95.0% in CSTR-1 and 87.0% in CSTR-2. The concentration of doxycycline on AS by the end of the run B reached approx. 10.5 mg DOX /g AS in CSTR-2 and 3.4 mg DOX /g AS in CSTR-1. The adjustment of photocatalytic pre-treatment helped to avoid disruption of activated sludge process and resulted in enhanced efficiency of DOX removal.

## **Kasutatud kirjandus**

Al-Momani, F. Combination of photo-oxidation process with biological treatment, Doctoral Thesis. Barcelona, 2003, 371 pp.

Batt, A. L.; Kim, S.; Aga, D. S. Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations.. 2007, 68 (3), 428–435.

Castellote, M., Bengtsson, N. Principles of TiO<sub>2</sub> Photocatalysis. Spain, 2011, 7 pp.

Cetecioglu, Z., Ince, B., Azman, S., Ince, O. Biodegradation of Tetracycline Under Various Conditions and Effects on Microbial Community. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, pp 631-640.

Daghir, R., Drogui, P. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. Environmental Chemical Lett (2013) 11:209–22.

Ding, C., He, J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. Appl Microbiol Biotechnol, (2010) 87: 925–941.

Dulov, A. Advanced Oxidation Processes for the Treatment of Water and Wastewater Contaminated with Refractory Organic Compounds. Doctoral Thesis, Tallinn University of Technology, 2012, 112 pp.

Elmolla, E.S., Chaudhuri, M. The feasibility of using combined TiO<sub>2</sub> photocatalysis-SBR process for antibiotic wastewater treatment. Desalination 272 (2011) 218–224.

Grady, L. C., Daigger G. T., H. C. Lim. Biological Wastewater Treatment. New York, CRC Press, 1998, 1076 pp.

Guo, R., Xie, X., Chen, J. The degradation of antibiotic amoxicillin in the Fenton-activated sludge combined system. Environmental Technology, 2014, 9 pp.

Henning, H., Billing, R. Advantages and disadvantages of photocatalysis induced by light - sensitive coordination compounds. Coordination Chemistry Reviews, 125 (1993) 89-100.

Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. Toxicology Letters 131 (2002) 5–17.

Hu, D., Coats, J. Laboratory evaluation of mobility and sorption for the veterinary antibiotic tylosin, in agricultural soils. J. Environ. Monit. 2009; 11:1634-1638.

Ibhadon, A.O., Fitzpatrick, P. Heterogeneous Photocatalysis: Recent Advances and Applications. Catalysts 2013, 3, 189-218.

Jungles, M.K., Campos, J.L, Costa, R.H.R. Sequencing batch reactor operation for treating wastewater with aerobic granular sludge. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2014, pp. 27 – 33.

Katsou, E., Alvarino, T., Malamis, S., Suarez, S., Frison, N., Omil, F., Fatone, F. Effects of selected pharmaceuticals on nitrogen and phosphorus removal bioprocesses. Accepted Manuscript, Chemical Engineering Journal, 2016.

Keen, P.L., Patrick, D.M. Tracking Change: A look at the Ecological Footprint of Antibiotics and Antimicrobial Resistance. 2013; 2(2): 191-205.

Kiely G. Environmental engineering. McGraw-Hill Publishing Company, 1997, 969 pp.

Kim, S., Carlson, K. Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. Environ. Sci. Technol. 2007; 41:50-57.

Kim, S., Jensen, N.J., Aga, D.S., Weber S.A. Fate of tetracycline resistant bacteria as a function of activated sludge process organic loading and growth rate. Water Science & Technology. 2007, 55: 291–29

Kim, S., Jensen, N.J., Aga, D.S., Weber S.A. Tetracycline as a selector for resistant bacteria in activated sludge. New York, 2006, 1643-1651 pp.

Kim, S., Jensen, N.J., Aga, D.S, Einhorn, P., Weber S.A. Removal of Antibiotics in Wastewater: Effect of Hydraulic and Solid Retention Times on the Fate of Tetracycline in the Activated Sludge Process. Environ. Sci. Technol. 2005, 39, 5816-5823 pp.

Kogawa, A.C., Nunes Salgado, H.R. Doxycycline hyclate: a review of properties, applications and analytical methods. Review Article, 2012, ISSN 2250-0480.

Laas, P. Doksütsükliini määramine vees ja reoveesettes. Magistritöö, Tallinna Tehnikaülikool, 2015, 48 pp.

Laera, G., Chong, M.N., Jin, B., Lopez, A. An integrated MBR–TiO<sub>2</sub> photocatalysis process for the removal of Carbamazepine from simulated pharmaceutical industrial effluent. Bioresource Technology 102 (2011) 7012–7015.

Lester, Y., Mamane, H., Zucker, I., Avisar, D. Treating wastewater from a pharmaceutical formulation facility by biological process and ozone. Water research 47 (2013) 4349-4356 pp.

Li, B., Zhang, T. Removal mechanisms and kinetics of trace tetracycline by two types of activated sludge treating freshwater sewage and saline sewage, 2013, 3024-3033 pp.

Lindberg, R.H., Wannberg, P., Johansson, M.I. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. Environmental Science & Technology. 2005, 39: 3421–3429.

Lindsey, M.E., Meyer, M., Thurman, E.M. Analysis of Trace Levels of Sulfonamide and Tetracycline Antimicrobials in Groundwater and Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Analytical Chemistry. 2001, 73: 4640-4646.

Lopez- Penalver, J.J., Sanchez-Polo, M., Gomez-Pacheco, C.V., Rivera-Utrilla, J. Photodegradation of tetracyclines in aqueous solution by using UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation processes, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85 (2010) 1325–1333.

Masse, D.I., Cata Saady, N.M., Gilbert, Y. Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals* 2014, 4, 146-163.

Mboula, V.V., Hequet, V., Gru, Y., Colin, R., Andres, Y. Assessment of the efficiency of photocatalysis on tetracycline biodegradation. 2012, 355-364 pp.

Miao, X.S., Bishay, M., Chen, M., Metcalfe, C.D. Occurrence of Antimicrobials in the Final Effluents of Wastewater Treatment Plants in Canada. *Environmental Science & Technology*. 2004, 38: 3533–3541.

Munter, R. Keskkonnakaitse meetodid, Tallinn: Valgus, 1988, 115 lk.

Mölder, H. Reovete puhaustusseadmed I, Tallinn, 1975, 160 lk.

Nadelman RB, Luger SW, Frank E, Wisniewski M, Collins JJ, Wormser GP. Comparison of cefuroxime axetil and doxycycline in the treatment of early Lyme disease. *Annals of Internal Medicine*, 1992.

Nelson, M.L, Levy, S.B. The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011, 17-32 pp.

Oller, I., Malato, S., Sanches-Perez, J. A. Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination. *Science of the Total Environment* 409 (2011), 4141-4166 pp.

Pamreddy, A., Hidalgo, M., Havel, J., Salvado, V. Determination of antibiotics (tetracyclines and sulfonamides) in biosolids by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, 2013, 68-75 pp.

Perez, S., Eichhorn, P., Aga, D. S. Evaluating the biodegradability of sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, and trimethoprimat different stages of sewage treatment. 2005, 24 (6), 1361–1367 pp.

Pronina, N., Klauson, D., Moiseev, A., Deubener, J., Krichevskaya, M. Titanium dioxide sol–gel-coated expanded clay granules for use in photocatalytic fluidized-bed reactor. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2014.

Reyes, C., Fernandez J., Freer J., Mondaca M.A., Zaror C., Malato S., Mansilla H.D. Degradation and inactivation of tetracycline by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 184 (2006) 141–146.

Richard, M. Activated Sludge Microbiology Problems and Their Control, 2003, 21 pp.

Riond, J.L., Riviere, J.E. Pharmacology and toxicology of doxycycline, 1988.

Samuel, D.D.R, Anjaneyulu, Y. Evaluation of biokinetic parameter for pharmaceutical wastewaters using aerobic oxidation integrated with chemical treatment. *Process Biochemistry*, 2005, pp 165- 175.

Schauss, K., Focks, A., Leininger, S., Kotzerke, A., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Sharma, S., Wilke, B.M., Matthies, M., Smalla, K., Munch, J.C., Amelung, W., Kaupenjohann, M., Schloter, M., Schleper, C. Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils. *Environ Microbiol* (2009)11:446–456.

Sclüsener, M.P, Bester, K. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environmental Pollution*. 2006, 143, 565–571.

Shi, Y., Xing, S., Wang, X., Wang, S. Changes of the reactor performance and the properties of granular sludge under tetracycline (TC) stress. *Bioresource Technology* 139 (2013) 170–175.

Smith, A. B., Johnson N. A. *Photochemistry: New Research*. New York: Nova Science Publishers, 2013, 119 pp.

Thiruvengkatachari, R., Vigneswaran, S., Moon, I.S. A review on UV/TiO<sub>2</sub> photocatalytic oxidation process. *Korean J. Chem. Eng.*, 25 (1), 64-72 (2008).

Varatharajan, B., Kanmani, S., Treatability study of pharmaceutical waste water by combined solar photo Fenton and activated sludge process. *Jr. of Industrial Pollution Control*, 2007, pp 157-164.

Velner, H. A. *Keskkond ja tehnika*, Tartu, 1998, 137 lk.

Yahiat, S., Fourcade, F., Brosillon, S., Amrane, A. Removal of antibiotics by an integrated process coupling photocatalysis and biological treatment - Case of tetracycline and tylosin. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65 (2011) 997-1003.

Web1 Salis, I. Reovee iseloomust tingitud probleemid ja operatiivmeetmed puhastusprotsessi juhtimisel. [Võrgumaterjal]. Available: <https://www.ttu.ee/public/e/.../SlaidSalis1.ppt>. [Kasutatud 18 Aprill 2016].

Web2 Eestis kehtiva Euroopa patendi patendikirjeldamise tõlge. [Võrgumaterjal]. Available: <http://www1.epa.ee/ep/EPtolked/E002105.pdf>. [Kasutatud 28 Veebruar 2016].

Web3 Riigi teataja, “Veeseadus”. [Võrgumaterjal]. Available: <https://www.riigiteataja.ee/akt/28669>. [Kasutatud 29 Veebruar 2016].

Web4 The American Society of Health-System Pharmacists. [Võrgumaterjal]. Available: <http://www.drugs.com/monograph/doxycycline-calcium.html>. [Kasutatud 2 Märts 2016].

Web5 Centers for Disease Control and Prevention. [Võrgumaterjal]. Available: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/leptospirosis>. [Kasutatud 2 Märts 2016].

Web6 Research Shows Wastewater Treatment May be Creating New Antibiotics. [Võrgumaterjal]. Available: <http://enr.uncc.edu/newsletters/2015-spring-review/research-shows-wastewater-treatment-may-be-creating-new-antibiotics>. [Kasutatud 3 Märts 2016].

Web7 State of Michigan Department of Environmental Quality. Activated Sludge Process Control. [Võrgumaterjal]. Available: [https://www.michigan.gov/documents/deq/wrd-ot-activated-sludge-manual\\_460007\\_7.pdf](https://www.michigan.gov/documents/deq/wrd-ot-activated-sludge-manual_460007_7.pdf). [Kasutatud 17 Märts 2016].

Web8 Rousseau D., Hooijmans, T. Activated sludge wastewater treatment. [Võrgumaterjal]. Available: [http://www.switchtraining.eu/fileadmin/template/projects/switch\\_training/db/event\\_upload\\_folder/97/Day\\_2\\_-\\_6.Activated\\_Sludge.pdf](http://www.switchtraining.eu/fileadmin/template/projects/switch_training/db/event_upload_folder/97/Day_2_-_6.Activated_Sludge.pdf). [Kasutatud 17 Märts 2016].

Web9 Richard, M. Activated Sludge Microbiology Problems and Their Control. [Võrgumaterjal]. Available: [http://www.dec.ny.gov/docs/water\\_pdf/drrichard1.pdf](http://www.dec.ny.gov/docs/water_pdf/drrichard1.pdf). [Kasutatud 15 mai 2016].

Web10 Pipeline. Explaining the Activated Sludge Process. [Võrgumaterjal]. Available: [http://www.nesc.wvu.edu/pdf/ww/publications/pipline/pl\\_sp03.pdf](http://www.nesc.wvu.edu/pdf/ww/publications/pipline/pl_sp03.pdf). [Kasutatud 19 Aprill 2016].

Web11 DrugBank. Doxycycline. [Võrgumaterjal]. Available: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00254>. [Kasutatud 20 Aprill 2016].

Web12 Long-Term Monitoring of the Occurrence of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes in Groundwater near Swine Confinement Facilities. [Võrgumaterjal]. Available: <http://info.ngwa.org/GWOL/pdf/042379986.pdf>. [Kasutatud 20 Aprill 2016].

Web13 Eesti loodus. Ravimijäädgid looduskeskkonnas. [Võrgumaterjal]. Available: [http://www.eestiloodus.ee/artikkel4679\\_4623.html](http://www.eestiloodus.ee/artikkel4679_4623.html). [Kasutatud 21 Aprill 2016].

Web14 Antibiootikumid ja antibiootikum-resistentsus. [Võrgumaterjal]. Available: [http://www.terviseamet.ee/fileadmin/dok/Nakkushaigused/ab\\_paev/Antibiootikumid\\_ja\\_resistentsus\\_2.pdf](http://www.terviseamet.ee/fileadmin/dok/Nakkushaigused/ab_paev/Antibiootikumid_ja_resistentsus_2.pdf). [Kasutatud 21 Aprill 2016].

Web15 Wikipedia. SPE Manifold. [Võrgumaterjal]. Available: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SPE\\_Manifold.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SPE_Manifold.jpg). [Kasutatud 24 Aprill 2016].

Web16 RealTech. Chemical Oxygen Demand. [Võrgumaterjal]. Available: <http://realtechwater.com/chemical-oxygen-demand/>. [Kasutatud 16 mai 2016].

Web17 Dasgupta, D., Sengupta, T.K. Techniques and Methods: Detection of antibiotics in environmental samples. [Võrgumaterjal]. Available: <http://www.microbiology5.org/microbiology5/book/1084-1090.pdf>. [Kasutatud 19 mai 2016].

Web18 USP. Doxycycline Hyclate. [Võrgumaterjal]. Available: <http://static.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/msds/1226003.pdf>. [Kasutatud 20 mai 2016].

Web19 IWA Water Wiki. Nitrogen Removal. [Võrgumaterjal]. Available: <http://www.iwawaterwiki.org/xwiki/bin/view/Articles/Nitrogenremoval>. [Kasutatud 20 Mai 2016].

Web20 Gerardi, M.H. Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process. [Võrgumaterjal]. Available: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471216682.app2/pdf> [Kasutatud 20 Mai 2016].