



TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL
TALLINN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL
Loodusteaduskond
Keemia ja biotehnoloogia instituut

**LAHUSTUNUD ORGAANILISE AINE KEEMILISTE OMADUSTE
VEDELIKKROMATOGRAAFILINE JA SPEKTROFOTOMEETRILINE
UURIMINE TALLINNA LAHE RANNIKUVEES**

Magistritöö

Üliõpilane: Karin Kabral
Juhendaja: Viia Lepane, keemia osakond, dotsent
Rakenduskeemia ja biotehnoloogia õppekava YASM

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Karin Kabral

Juhendaja: Viia Lepane

Töö vastab magistritööle esitavatele nõuetele.

Kaitsmiskomisjoni esimees:

Lubatud kaitsmisele:

.....

(nimi, allkiri, kuupäev)

Sisukord

Annotatsioon.....	4
ABSTRACT.....	5
Tähiste ja lühendite loetelu	7
Sissejuhatus	8
1. Teoreetiline osa.....	9
1.1 Tallinna laht.....	9
1.2.1 Lahustunud orgaanilise aine iseloomustus.....	10
1.2.2 Analüütilised meetodid DOM-i uurimiseks.....	13
1.3 Kõrgsurve vedelikkromatograafia	14
1.3.1 Pööratud faasi kromatograafia	16
1.3.2 Eksklusioonkromatograafia	17
1.4 UV-Vis Spektrofotomeetria	17
1.3.3 UV-Vis detektor vedelikkromatograafias.....	20
1.4 DOM-i omaduste määramine optiliste meetoditega.....	20
2. Eksperimentaalne osa	23
2.1 Kasutatud kemikaalid ja lahused	23
2.2 HPLC aparatuur ja analüüsitimingused.....	23
2.3 UV-Vis aparatuur ja analüüsitimingused	24
2.4 Tallinna lahe veeproovid.....	24
2.5. Kontsentratsiooni määramine	26
2.6 HPSEC süsteemi kalibreerimine molekulmassi määramiseks	27
2.7 Katseandmete statistiline töötlus	27
3. Tulemused ja arutelu.....	29
3.1 DOM-i RP-HPLC ja HPSEC kromatogrammide iseloomustus.....	29
3.2 HPSEC kromatogrammide iseloomustus.....	30
3.3 DOM-i molekulmass HPSEC meetodiga	32
3.4 DOM-i kvantitatiivne määramine.....	32
3.5 DOM-i iseloomustamine kasutades UV-Vis spektroskoopiat.....	34
3.6 UV-Vis spektrofotomeetria ja kromatograafiliste tulemuste võrdlus.....	39
3.6.1 Peakomponentide analüüs.....	39
3.6.2 Eksperimentaalsete tulemuste võrdlus kirjanduses leiduvate andmetega	40
Kokkuvõte	41
Kasutatud kirjandus	43
Lisad	47

Annotatsioon

Käesoleva töö eesmärgiks oli iseloomustada ja kvantifitseerida lahustunud orgaanilist ainet Tallinna lahe äärse rannikumere veeproovides. Hinnata lahustunud orgaanilise aine seire vajalikust Tallinna lahe vees. Uuriti veeproove, mis sai võetud 6. erinevast kohast Tallinna lahe rannikult ning 4 erineval kuupäeval. Veeproovide analüüsiks kasutati vedelikkromatograafia aparatuuri koos eksklusioonkromatograafia ja pööratud faasi kolonni ning diod-maatriks detekteerimisega. UV-Vis spektrofotomeetria kasutati analüüdi neeldumissuhete määramiseks erinevatel ultraviolet- ja nähtava valguse kiirguse lainel. Neeldumissuhteid kasutati lahustunud orgaanilise aine erinevate omaduste hindamiseks.

Töö tulemusena selgus, et kõikide proovide lahustunud orgaaniline aine oli maismaa päritolu. Lahustunud orgaanilise aine molekulmassi poolest jäid enamused proovipunktid suhteliselt stabiilseks. Kõige kõrgemad lahustunud orgaanilise aine kontsentratsioonid esinesid Pirita jõe ja Russalka 29.05.18 kuupäeva proovides. Antud proovides oli DOM ka kõige polaarsem, mis tõenäoliselt on tegu pinnasest lahustunud fulvohappega. Teiste proovivõtu kohtade seast paistis välja ka Saare tee. Selles proovivõtu kohas esines suurema aromaatsuse ja ultraviolet kiirgust neelavate ühendite olemasolu lahustunud orgaanilises aines.

Tööst järeldati, et mõistlik oleks teostada Tallinna lahe rannikuvees pikemaajaline lahustunud orgaanilise aine seire, mis aitaks paremini ajas muutuvaid kontsentratsioone ja omadusi määrata ning hinnata. Lisaks võib see aidata leida võimalike süsiniku toitained allikaid, mida lühema vaatluse järel järeldada ei olnud võimalik.

ABSTRACT

Liquid chromatographic and spectrophotometric study of dissolved organic matters chemical properties in the coastal water of Tallinn Bay

The aim of this thesis was to investigate the chemical properties and concentrations of dissolved organic matter in the coastal waters of Tallinn Bay, and assess the need for dissolved organic matter monitoring. During this thesis 24 water samples were analysed. The samples were gathered from 6 different places and at 4 different times. The water samples were analysed by size-exclusion chromatography, reversed-phase chromatography and UV-Vis spectroscopy.

Reversed-phase HPLC analysis showed that there were two different types of chromatograms. One with only one hydrophobic peak and the other with hydrophilic and hydrophobic peaks. The study showed that the hydrophilic peak appeared on all samples gathered from Pirita River and also on the Russalka sample taken on the 29th of May 2018.

To determine the molecular weights of dissolved organic matter, HPSEC systems were calibrated with polystyrenesulfonic sodium salts with different molecular weights. The highest molecular weight was discovered in Pirita River water samples. All the other sampling sites had small changes in their molecular weight, but overall remained the same.

For the quantitative analysis of dissolved organic matter RP-HPLC, HPSEC and UV-Vis spectroscopy systems were calibrated with different natural organic matter dilutions. As an extra measure dissolved organic carbon concentrations were calculated by comparing different concentrations, that were obtained by different systems we could easily see the changes in concentrations through time and place. The highest concentrations were detected in Pirita River and in the Russalka water sample taken on the 29th of May 2018. The high concentrations were probably because fulvic acid from soil is more easily soluble in water and Pirita River runs through a highly populated suburban area.

To estimate the chemical properties of dissolved organic matter, UV-Vis spectroscopy was used to record and calculate absorbance ratios of water samples at different wavelengths. As a result of the analysis it was discovered that all the water samples contained material from terrestrial origin. There was significant contrast between samples aromaticity. Saare road and Russalkas water sample taken on the 29th of May 2018 had a lot higher aromaticity and more UV-Vis absorbing functional groups than the other sampling sites. Lauluväljak sampling point had the lowest aromaticity of all the sampling points.

Ultimately this thesis was unable to draw conclusions on the causes and regularity of all changes. Russalka sampling point stood out with a severe change in concentration and properties on the final day of sampling. To better understand the causes for this change, a prudent approach would be to implement a long-term survey of dissolved organic matter. This survey would also shed some light on how the properties and concentrations of organic dissolved matter are influenced

by seasons and additionally provide a better insight to its sources. Studying organic dissolved matter over a longer period would also alert on bigger changes to its properties. In the future, this would allow to more accurately determine the sources of dissolved organic matter.

When utilizing UV-Vis spectrophotometry to survey dissolved organic matter, the author would recommend the use of wavelength of 254 nm to evaluate concentration and ratios of A_{254}/A_{350} (for evaluating aromatic carbon content and molecular weight), A_{254}/A_{436} (to determine the origin of the organic matter) and A_{470}/A_{665} (determining the degree of humification). These wavelength ratios will largely cover the main properties of dissolved organic matter, that were more thoroughly measured as part of this thesis.

Tähiste ja lühendite loetelu

DAD- diod-maatriks detektor: *ingl. k* diode array detector, DAD

DOM- lahustunud orgaaniline aine: *ingl. k* dissolved organic matter, DOM

FA- fulvohape: *ingl. k* fulvic acid, FA

HA- humiinhape: *ingl. k* humic acid, HA

HMW – kõrge molekulmass *ingl. k* high molecular weight, HMW

HPLC- kõrgsurve vedelikkromatograafia: *ingl. k* high pressure (performance) liquid chromatography, HPLC

HPSEC – kõrgsurve eksklusioonkromatograafia, *ingl. k* . high pressure (performance) size-exclusion chromatography, HPSEC

HS- humiained: *ingl. k* humic substances, HS

IHSS- Rahvusvaheline Humiainete Ühing: *ingl. k* International Humic Substances Society

LMW – madal molekulmass *ingl. k* low molecular weight, LMW

NOM- looduslik orgaaniline aine: *ingl. k* natural organic matter, NOM

OM- orgaaniline aine: *ingl. k* organic matter, OM

PCA - peakomponentide analüüs *ingl. k* principal component analysis, PCA

POM- tahke orgaaniline aine: *ingl. k* particulate organic matter, POM

RP-HPLC- pööratud faasi kõrgsurve vedelikkromatograafia: *ingl. k* reversed-phase high pressure (performance) liquid chromatography, RP-HPLC

SEC- eksklusioonkromatograafia, *ingl. k* size-exclusion chromatography, SEC

SOM – mulla orgaaniline aine, *ingl. k* soil organic matter, SOM

TOC – üldine orgaaniline süsinik *ingl. k* total organic carbon, TOC

UV- ultraviolet

Vis- nähtav valgus

Sissejuhatus

Tallinna lahe rannikuvee üheks suuremaks probleemiks on toitainete üleküllus. Toitainete rohkus omakorda soodustab makrovetikate vohamist. Vetikate sattumisel randa tekib lagunemisprotsesside käigus ebameeldiv lõhn ja vaatepilt, mis paljudele Tallinna linna elanikele kindlasti tuttav. Saamaks paremat ülevaadet rannikuvee kvaliteedist ning seal toimuvatest protsessidest on vaja tähelepanu pöörata ka vees leiduvatele toitainetele kui makrovetikate vohamise põhjusele. Vetikate mõju Tallinna lahe vee kvaliteedile on oluline probleem. Peamisteks toitaineteks rannikuvees on lämmastiku ja fosforiühendid, kuid ei tohiks ära unustada süsinikuühendite rolli toitelemendina. Varasemalt on rannikuvees ja sademevee väljalaskudes toitainetest uuritud lämmastiku ja fosforiühendeid, kuid on vähe teada lahustunud orgaanilise aine rollist ja keemilistest omadustest. Lahustunud orgaanilise aine kvalitatiivne ja kvantitatiivne analüüs võib aidata tuvastada vette sattunud orgaanilise aine allikaid. Töö tulemusena peaks selguma, kas lisaks toitelementide lämmastiku ja fosforiühendite uurimisele rannikuvees oleks otstarbekas ja vajalik ka loodusliku orgaanilise aine seire ja iseloomustamine.

Looduslik orgaaniline aine (NOM) on rühm süsinikku sisaldavaid ühendeid, mis on looduslikest allikatest pärit. Suuremates kontsentratsioonides mõjutab NOM vee esteetilist välimust. Lisaks suudab NOM luua stabiilseid komplekse metallide ja hüdrofoobsete orgaaniliste kemikaalidega. NOM satub vette vetikate, algloomade, mikroorganismide ja kõrgemate eluvormide metaboolse tegevuse tulemusena. NOM-i võib jagada kaheks: lahustunud orgaaniliseks aineks (DOM) ja tahkeks orgaaniliseks aineks (POM). DOM on osa orgaanilisest ainest, mis läbib 0,45 µm filtrit.

DOM-i molekulid on üksteisega sarnased, kuid iga molekul on ainulaadne, mistõttu on DOM-i iseloomustamine keeruline. Selleks, et loodusliku DOM-i efektiivselt kirjeldada, tuleb ta jaotada sarnaste keemiliste ja füüsikaliste omadustega gruppideks. Füüsikaliste eraldusmeetoditena kasutatakse antud töös eksklusioonkromatograafiat (HPSEC), mis jaotab analüüdi vastavalt tema molekulide suurustele ja pööratud faasi kõrgsurve vedelikchromatograafiat (RP-HPLC), mis jaotab analüüdi vastavalt tema polaarsusele. Kromatograafia on hea meetod DOM-i uurimiseks kuna on tundlik ja odav meetod, mis ei vaja analüüdi eeltöötlust.

UV-Vis spektrofotomeetria meetodiga on kvantitatiivselt võimalik määrata kõiki ühendeid proovis, mis neelavad valgust UV piirkonnas (konjugeeritud C-C mitmikside, aromaadne süsinik, -COOH ja -OH rühmad suurendavad adsorptsiooni).

Antud uurimistöö eesmärgiks oli iseloomustada ja kvantifitseerida lahustunud orgaanilist ainet (DOM) Tallinna lahe äärsel rannikumere veeproovides. UV-Vis spektroskoopia meetodil määrata analüütide neeldumiste suhteid erinevatel ultraviolet- ja nähtava kiirguse lainepikkustel ning kasutada neid DOM-i erinevate omaduste hindamiseks. Eksklusioonkromatograafia (HPSEC) ja pööratud faasi kromatograafia abil hinnata vastavalt analüüdi molekulmassi ja polaarsust. Viimaseks eesmärgiks oli võrrelda kõiki 3 meetodit DOM-i kvantitatiivseks määramiseks.

Antud magistritöö sai premeeritud Tallinna Raestipendiumiga.

1. Teoreetiline osa

1.1 Tallinna laht

Tallinna lahe piirkond on üks inimtegevuse poolt enim mõjutatud veeökosüsteeme Eesti ranniku meres. Ta on paljudele Tallinlastele lähim veekogu, kuhu rannamõnusid nautima minna. Selleks, et inimesed sooviksid mere äärde tulla on oluline, et vesi oleks esteetilise välimusega ning puhas. Iga aasta voolab Tallinna lahte sademevee- ja veepuhastusjaama kollektoritest kümneid tonne aineid, mis mõjutavad merevee kvaliteeti. [1]

Tallinna Reidi ääres asuvad 2 sademevee väljalasku Vanasadamas ning 4 Russalka lähedal Pirita tee ääres. Saare tee sademe vee väljalasku tuleb vesi Pirita keskosast ja osaliselt Pirita-Kose valgalast. Lasnamäe sademevee suubla asub Lauluväljaku väravate vastas ning sinna uhutakse suurem osa Lasnamäe sademeveest. Lasnamäe sademevesi juhitakse torustikku, mille viimane Pirita jõe poolne lõik sisaldab puitvaheseina, et eraldada reo-ja sademevett. Üleujutuste korral võib esineda sademe- ja reovee segunemist puitseina avarii tõttu. Russalka sademevee väljalasku kogutakse Ülemiste järve ülevool, sademe-ja drenaažveed Suur-Sõjamäe tööstusrajoonist ja Tartu mnt piirkonnast.[2]

Peale sademe kollektorite on suurteks reostusallikateks sadamad. Tallinna reidi lähedal on 10 sadamat, millest on ka tingitud piirkonna tihe laevaliiklus. Tiheda laevaliikluse tõttu on märkimisväärne osa lainetest Tallinna lahe piirkonnas inimtekkelised. Vanasadam asub Tallinna lahe lõunaosas olles sildumispaiaks reisiparvlaevadele, kruisi- ja kiirlaevadele. [2] Vanasadamasse suunduvad ja sealt lahkuvad laevad tekitavad laineid, mis kannavad merelt prahti rannikule. Lisaks on laevad ise suured saasteallikad. [3] Pirita jõe suudmes asuvad Kalevi Jahtklubi ning Pirita sadam. Viimsi poolsaare lääneküljel asub Miiduranna sadam, mille põhitegevuseks on laevade lastimis-lossimistööde tagamine. Sadamat kasutatakse ümarpuidu, saematerjali, tehnoloogiliste laastude ja naftasaaduste laadimiseks mandrile. Sadamas laadimise käigus tekkinud praht ja tolmu võib sattuda tuule mõjul merre ning osa merre sattunud prahist korjab enda taha Merivälja muul. [2]

Tallinna lahe veekvaliteeti mõjutavad ka erinevad sissevoolud. Üheks sissevooluks on Pirita jõgi, mis algab Paidest loode pool Pususoos ja suubub Tallinnas Pirita ranna lähedal Tallinna lahte. Ülemjooksul voolab jõgi läbi hõredalt asustatud soiste metsade. Kesk- ja alamjooksul on jõe ümbrus tihedalt asustatud. Pirita jõkke suunatakse sademe- ja liigveed Lasnamäe linnaosa Ussimäetee ja Priisle tee ristumiskoha läheduses asuvatest elamukvartalitest, Vao karjäärist ja Kose ning Mähe asumitest. Lisaks suunab Botaanikaaed oma vee äravoolu Pirita jõkke. Tallinna lahte voolab veel Mähe oja, Teesuuoja ja Varsallika oja. Mähe oja suunatakse lisaks looduslikele veele ka Mähe piirkonna sademe-ja kuivendusvesi ning osaliselt ka olmereovett, mistõttu on oja vesi nõrgalt reostunud inimtekkeliste reoainetega. Teesuuoja ja selle valgalas on võimalike reostusallikaid vähe, kuid tegemist on suhteliselt rauarikka veega, mistõttu võib esineda oja vee värvumist oranžiks. Varsallika oja kogub Lasnamäe ja Kose piirkonna sademe- ja liigvett. Pirita teest voolab oja edasi torus Tallinna lahte. [2]

Aastate jooksul on esinenud probleeme kõrgeenenud bakteriaalse reostusega Pirita jõest läänepoolse jäävate sademevee kollektorite juures. Üleujutuste ajal võib merre jõuda ka puhastamata asula reovesi. Samuti ei puhastata mõningates linnaosades sademevett enne merre laskmist.[2]

1990-datest on Tallinna lahe keskkonna seisundit seiratud peamiselt lämmastiku ja fosfori sisalduste ning fütoplaktoni, suurvetika ja suurselgrootute alusel. Nende näitajate põhjal on loetud merevesi peamiselt saastunuks. Tänapäeval ei ole keskkonna seisund oluliselt paranenud. Tallinna lahe piirkonnas on siiani üheks suuremaks probleemiks toitainete üleküllus, mis on põhjustatud inimtegevusest [1]. Toitainete üleküllus paneb makrovetikad vohama ning vetikate sattumisel randa tekib lagunemisprotsesside käigus ebameeldiv lõhn ja vaatepilt. [3] Vetikate lagunemisel uhutakse vette loodusliku orgaanilist ainet, mis toitainena soodustab omakorda vetikate vohamist.

Varasemalt on uuritud Tallinna lahte voolava sademevee nitritite, nitraatide ja fosfaatide sisaldust.[4] Samuti on uuritud inimtekkelise reostuse mõju vetikate lagunemisprotsessile ning rannalähedase mikroobikoosluse mitmekesisust. [1,3] Lisaks on määratud 4 erineva sademevee kollektori juures hapniku sisaldust, üldlämmastiku, üldfosforit, kogu orgaanilist süsinikku ning ammoniumi. Siiani pole tehtud uurimistöid lahustunud orgaanilise aine (DOM, ingl. k *dissolved organic matter*) kvaliteedi ja kontsentratsiooni kohta Tallinna lahe piirkonnas, kus ranniku merevesi on segunenud juurdevooludega maismaalt.

1.2.1 Lahustunud orgaanilise aine iseloomustus

Looduslik orgaaniline aine (NOM, ingl. k *natural organic matter*) on termin, mida kasutatakse kõikides veekogudes oleva looduslikest allikatest pärit keerulise orgaanilise maatriksi kirjeldamiseks. NOM-i leidub nii mullas, setetes kui ka vees. [5] NOM tekib vette vetikate, algloomade, mikroorganismide ja kõrgemate eluvormide metaboolse tegevuse tulemusena (kalade ja muude vees elavate loomade väljaheited, bakterite poolt lagundatud orgaaniline aine). [6] NOM võib uhtuda vette ka maismaalt või sattuda sinna inimtegevuse tagajärjel, mistõttu võib teda päritolu järgi klassifitseerida maiseks, mereliseks, inimtekkeliseks või seguks. [5,6] NOM varieerub suuresti oma koostise, molekulmassi, konformatsiooni ja struktuuri poolest sõltuvalt oma päritolust ja teda ümbritsevast keskkonnast.

NOM mõjutab vee esteetilist välimust andes kõrgematel kontsentratsioonidel veele ebameeldiva lõhna, maitse ja kollakas pruuni värvuse. [6] Metallide ja hüdrofoobsete orgaaniliste kemikaalidega (nagu pestitsiidid) suudab NOM luua stabiilseid komplekse mõjutades nii nende lahustuvust, toksilisust kui ka transpordivõimet. [3,6] Lahustunud olekus on neid kemikaale võimalik edasi kanda vesikeskkonda ning seetõttu on neid raskem erinevate puhastusprotsessidega eemaldada. [4] Lisaks on NOM-il võime reageerida halogeenidega andes vee desinfitseerimisel desinfektsiooni kõrvalproduktid (DBP), mis on tihti kantserogeensed. [6] DBP-d võib põhjustada põievähki, spontaanseid aborte ja sünnidefekte. DBP-de eelkäijaks peetakse hüdrofoobse ja kõrge molekulmassiga NOM-i, kuna see reageerib hästi klooriga. Hüdrofiilne ja madala molekulmassiga NOM on reaktiivsem joodi ja broomi ühenditega

moodustades nii trihalometaane (THM) ja haloetaanhappeid (HAA-s). [7] Veepuhastusprotsessides võib NOM reageerida ka koagulantidega, mida kasutatakse vee hägususe vähendamiseks, adsorbeeruda aktiveeritud süsinikule vähendades nii märkimisväärselt süsiniku adsorbeerumismõimet, adsorbeeruda membraanidele ummistades nii selle poore ning saastades membraani pinda. Lisaks võib NOM olla ka biolagunev suurendades lima ja korrosiooni teket veejaotussüsteemides. [6]

NOM ei ole lenduv ja esineb peamiselt lahustunud kujul. Teda võib kontsentreerida rohkem kui 1000 mg/L ilma, et ta välja sadeneks. Enamus NOM-i molekulide on negatiivselt laetud ja paljud omavad anioonset funktsionaalrühma muutes nad polüelektrolüütiliseks. NOM-i molekulide molekulmass varieerub laialdaselt olles 90% juhtudest 500 kuni 3000 Da vahel. NOM-i elemendiline koostis on järgnev: 45-60% süsinik, 4-5% vesinik, 35-40 % hapnik ja 1% lämmastik. [6]

NOM-i võib jagada kaheks fraktsiooniks: lahustunud ja mittelahustunud osaks. Lahustunud orgaaniline aine (DOM) on fraktsioon, mis läbib 0,45 µm filtrit, tahke orgaaniline aine (ingl. k. particulate organic matter, POM) jääb filtrile. [8] Enamus orgaanilisest süsinikust eksisteerib merevees lahustunud kujul ja tema kogus vees ületab enam kui 200 kordselt POM-i kogust vees, mistõttu on DOM-i omaduste uurimine oluline arusaamaks ookeani süsiniku tsüklist. DOM osaleb kolloidosakeste tekkimisel, vesikeskkonnas toimuvates fotokeemilistes reaktsioonides, toitainete saadavuses ja ringluses, pH puhverdamises ja ionide jaotamises vesi ja tahke faasi vahel. [6] DOM omab rolli ka kliima muutuses. Tema lagunemisel satuvad keskkonda kasvuhoonegaasid. Sõltuvalt atmosfääri ja setete vahelisest tasakaalust muutub DOM-st saadavate ja atmosfääri vabastatavate gaaside CO₂ ja CH₄ kogus. Maise päritoluga DOM lagundatakse nii mere kui ka suudmeala bakterikolooniate poolt. DOM omab olulist rolli mikroobsetes protsessides olles mikroorganismidele süsiniku ja energia allikaks nii vees kui ka mullas. [9]

Enamus keemilisi reaktsioone ja mikroobseid protsesse nagu DOM-i lagunemine ja tema interaktsioon saasteainetega toimub kõrgematel temperatuuridel. [10–12] Temperatuur mängib olulist rolli mõjutades bakterite suurust ja kasvukiirust suudmealal, rannikul ja magevee ökosüsteemis. On tõenäoline, et kliima muutus tõstab DOM-i kogust pinnavees võimendades sellega mikroobide aktiivsust. Temperatuuri ja sademete muutuste ning toitainete juurdevoolu kasvuga esineb sagedamini mage- ja merevee keskkonnas ohtlikke vetikate õitsemist. [13,14]

Kliima muutus toob endaga kaasa ekstreemsemaid ilma muutusi nagu tormid ja üleujutused. Nende tulemusena kantakse järjest rohkem saasteaineid mullast ja setetest järvedesse, jõgedesse ja ookeanidesse. DOM seob toitaineid (N, P, Fe), metalle ja teisi saasteaineid, mõjutades nende toksilisust ja bioakumulatsiooni. Muutlikes keskkonnatingimustes võib muutuda ka DOM-i struktuur ja tema interaktsioon saasteainetega vabastades nii DOM-i struktuurist toit- ja saasteaineid. [15–17] On täheldatud ka, et suurenenud DOM-i kogus tõstab päikese UV-kiirguse absorptsiooni takistades sellega kiirguse neeldumist vees ja patogeenide hävitamist. [18,19]

Kui mulla orgaaniline aine (ingl. k. soil organic matter, SOM) on peamiselt tahkel kuju, siis mereline DOM allub kiiremale dünaamikale, kuna see on vees lahustunud kujul. DOM-i kantakse edasi ja muundatakse vees suuremates kogustes kui SOM-i. Lisaks on DOM rohkem saadaval

ensüümide aktiivsusele, oksüdatsioonile või metalliga komplekseerumiseks. Merevees leidub DOM-i väiksemates kontsentratsioonides. Need tegurid võimaldavad eristada NOM-i merelist struktuuri ja maisest. [5]

Merelise DOM-i molekulmassi ei saa tuvastada kergelt. Madala molekulmassiga (ingl. k. *low molecular weight*, LMW) ühendid eksisteerivad koos järjest kasvavate biomolekulidega (valgu, polüsahhariidid ja eksotsellulaarsed makromolekulid ja anorgaanilised ioonid), mis stabiliseerivad molekuli siseseid interaktsioone luues komplekse. Selle tulemusena eksisteerib erinevate molekulmassidega DOM-e. DOM-id, mille molekulmass on <1 kDa loetakse LMW. Kui molekulmass on >1kDa, siis loetakse seda fraktsiooni kõrge molekulmassiga (ingl. k *high molecular weight*, HMW) DOM-iks. Lisaks on tehtud uuringuid, milledest nähtub et HMW DOMi osa sisaldab autohtoonset päritolu eksopolümeerseid materjale, mis moodustavad stabiilseid mikrokeele polüsahhariidide ja lipiididega ning eksisteerivad koos maiset päritolu humiinainete laadsete supramolekulaarsete struktuuridega. LMW DOM-i osa koosneb maisest biomakromolekulide lagunemissaadustest. [5]

DOM-i võib jagada hüdrofiilseks ja hüdrofoobseks osaks. Hüdrofiilne osa koosneb alifaatsetest süsinikest ja lämmastikku sisaldavatest ühenditest ja madala molekulmassiga humiinainetest ning hüdrofoobne osa humiinainetest, aromaatsetest süsinikest ja fenoolidest. [6] Lisaks on võimalik DOM-i jagada veel omakorda alaosadeks: hüdrofoobne aluseline (HoB), hüdrofoobne happeline (HoA), hüdrofoobne neutraalne (HoN), hüdrofiilne aluseline (HiB), hüdrofiilne happeline (HiA) ja hüdrofiilne neutraalne (HiN). HoB osa moodustavad alifaatne süsinik, süsivesikud ja amiinid. HoA koosneb tanniinist, polüfenoolidest, humiinainete orgaanilistest kompleksidest. HoN sisaldab mittepolaarseid ühendeid nagu humiinid. Hüdrofiilne fraktsioon HiB koosneb valgu substraatidest, peptiididest ja amino-suhkrutest. HiA koosneb kõrgelt oksüdeeritud orgaanilistest ühenditest nagu madala molekulmassiga humiinainetest ja HiN-i moodustavad peamiselt taimset ja mikrobioloogilist päritolu polü- ja oligosahhariidid. [20] Nimetatud ühenditest kõige olulisema ökoloogilise tähtsusega vesikeskkonnas on humiinained. Magedas vees koosneb umbes 50-80% DOM-ist humiinainetest, põhjavees 25% ja ookeanis 0,7-2,4% DOM-ist. [21,22]

Humiinained (ingl.k *humic substances*, HS) on amorfsed, tumedat värvi ja happelise iseloomuga. Struktuurselt koosnevad HS-id asendatud aromaatsetest tsüklitest, mis on ühendatud alifaatsete ahelatega. [7] HS dünaamiline konformatsioon on nõrgalt stabiliseeritud vesiniksidemete ja van der Waalsi interaktsioonide kaudu, mistõttu on võimalik tema konformatsiooni lõhkuda nõrkade orgaaniliste hapete kaudu. [23–27] HS-id tekivad NOM-i, taime- ja loomajääkide biokeemilise lagunemise tulemusena. Humifitseerumis protsess toimub paralleelselt orgaanilise materjali lagunemisega. [20] Vee HS arvatakse peamiselt moodustuvat fütoplanktonist või uhutakse vette maismaalt. [28] Vee HS sisaldavad suhteliselt suurt kogust peptiide, mis pakub kaitset mikroobse lagunemise vastu. [29]

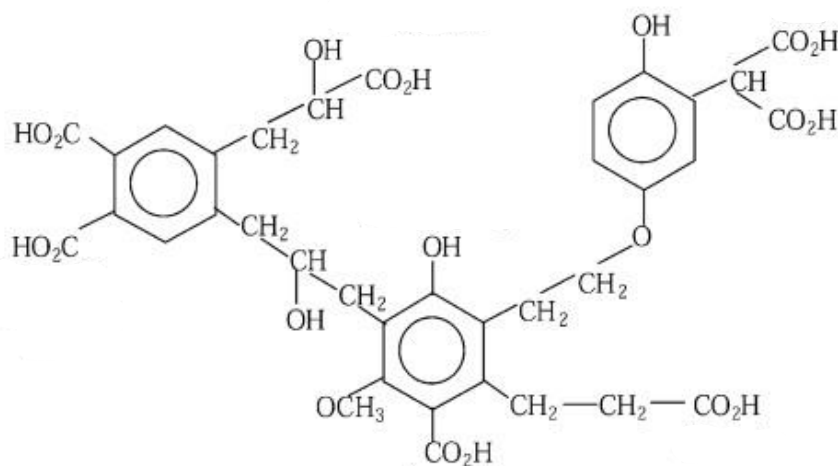
HS võib jagada 3 fraktsiooni vastavalt nende lahustuvusele erinevate pH väärtustega keskkondades:

- 1) Humiinhapped (ingl. k *humic acid*, HA)- HS osa, mis on vees lahustumatu pH väärtustel <2, kuid lahustub kõrgematel pH väärtustel.

- 2) Fulvohapped (ingl. k *fulvic acid*, FA) – osa HS-st, mis lahustub vees ükskõik, mis pH juures.
 - 3) Humiinid (ingl. k *humins*)- osa humiainetest, mis olenemata pH-st vees lahustumatud.
- [20]

HA-d on kompleksed aromaatsed makromolekulid, mis on seotud aminohapete, aminosuhkrute, peptiidide, alifaatsete ühenditega. HA struktuuri ei ole võimalik täpselt defineerida, kuna iga molekul on ainulaadne. Kuid siiski on moodustatud üldised hüpoteetilised HA ja FA struktuurid.

[30]



Joonis 1 Hüpoteetiline HA molekuli struktuur. [30]

HA ja FA on struktuurselt sarnased, kuid erinevad teineteisest märgatavalt molekulmassi ja funktsionaalrühmade paigutuse poolest. [6] FA ja HA massisuhe on tavaliselt 9:1. [31] FA molaarmass varieerub 200-1000 g/mol, samas kui HA molaarmass võib olla kuni 200 000 g/mol. [6] FA lahustub vees paremini kui HA, kuna tema keskmine molekulmass on väiksem ja ta on kõrgema happesusega. HA on jällegi aromaatssem, mistõttu omavad nad rohkem värvi ja paremat UV neelduvust. [31]

1.2.2 Analüütilised meetodid DOM-i uurimiseks

Looduslik DOM on hästi keerulise struktuuriga, mistõttu kasutatakse tihti DOM-i hindamiseks hulkpameetreid. [6] Kõige tavalisemad vee kvaliteedi näitajad, mida veepuhastusjaamades määratakse on üldist orgaanilist süsiniku (*ingl* k. total organic carbon, TOC), UV₂₅₄, pH, hägusus ja värvus, kuid see ei anna informatsiooni selliste parameetrite kohta nagu molaarmass või hüdrofoobsus. [7]

DOM-i tõhusaks iseloomustamiseks jaotatakse ta vastavalt oma keemiliste ja füüsikaliste omaduste järgi gruppidesse. Looduslikku DOM-i iseloomustamiseks võib kasutada kõrgsurve

eksklusioonkromatograafiat (HPSEC), mis annab informatsiooni loodusliku DOM-i molekulmassi jaotuse kohta või erinevaid jaotusmeetmeid, mis jaotavad DOM-i hüdrofiilseks ja hüdrofoobseks osaks. [6,7] Kõige tavalisemad keemilised jaotusmeetodid on sadestamine, solvendi ekstraktatsioon ja adsorptsioonkromatograafia. Füüsikalisteks fraktsioneerimismeetoditeks on elektroforees, ultrafiltratsioon, eksklusioonkromatograafia (SEC), pööratud faasi kõrgsurvevedelikkromatograafia (RP-HPLC), väljavoolu fraktsioneerimine (FFF) ja ultratsentrifuugimine. [7] DOM on optiliselt aktiivne. See võimaldab kasutada DOM-i iseloomustamiseks spektroskoopilisi meetodeid, mis põhinevad UV absorptsioonil. [28] Looduslikus DOM-is olevate funktsionaalsete gruppide ja ühendite identifitseerimiseks saab kasutada ka spektroskoopilisi meetodeid nagu Fourier teisendusega infrapuna (FT-IR) spektroskoopia, ^{13}C tuumamagnetresonantsspektroskoopia, elektronlööki ehk elektronionisatsioon massispektromeetria ja pürolüüsi gaaskromatograafia massispektromeetria (pyr-GC-MS). [6]

Kromatograafia on hea meetod DOM-i uurimiseks kuna on tundlik, lihtne ning ei vaja analüüdi eeltöötlust. RP-HPLC põhineb mittepolaarsel statsionaarsel faasil ja vesilahuselisest, mõõdukalt polaarset mobiilsest faasist. Selle tulemusena lahutatakse looduslik DOM vastavalt tema polaarsusele. Hüdrofoobse ja hüdrofiilse osa suhet on võimalik kasutada loodusliku DOM-i aktiivsuse hindamiseks. [7]

HPSEC on kõige mugavam ja laialdasemalt kasutatav meetod DOM-i fraktsioneerimiseks. HSPEC on mitte lõhustav meetod, mis ei vaja suurt proovi eeltöötlust ja meetodi väljaarendamist. [32,33]

1.3 Kõrgsurve vedelikkromatograafia

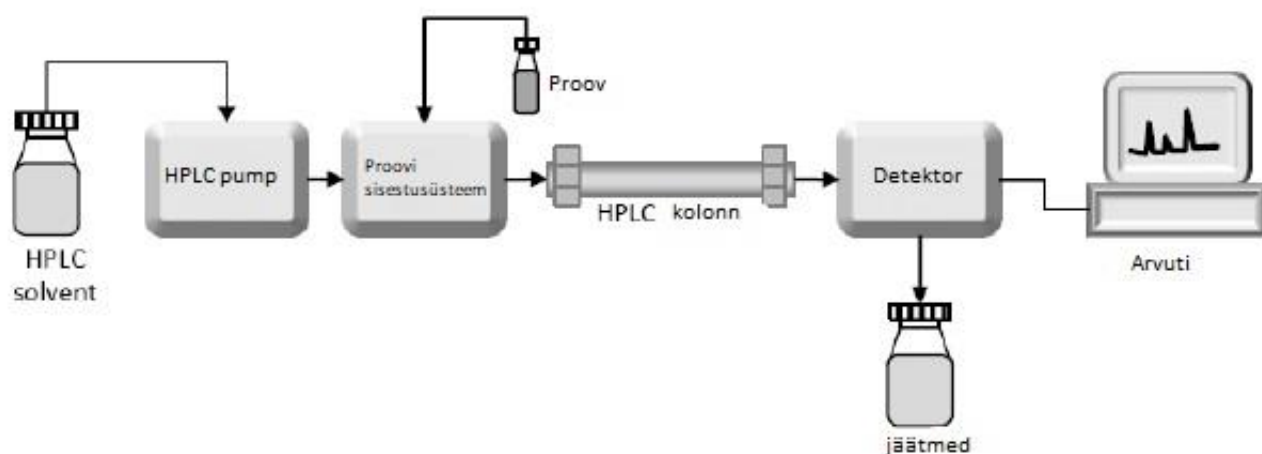
Kõrgsurve vedelikkromatograafia (ingl. k high-performance liquid chromatography, HPLC) kasutab kõrget rõhku, et suruda solvent läbi tihkelt pakitud mikroosakeste, mis annavad kõrge eraldusega lahutuse. [34] HPLC-s pumbatakse solvendis lahustunud proov kõrge rõhu all läbi kolonni, kuhu on immobiliseeritud kromatograafiline pakke materjal (statsionaarne faas). Proovi, solvendi ja statsionaarse faasi omadustest sõltub analüüdi retentsiooni aeg. Analüüdid, mis kolonni läbides omavad kõige tugevamat interaktsiooni statsionaarse faasiga, elueeruvad kõige aeglasemalt. [35] Analüüdi ja statsionaarse faasi vahelisteks interaktsioonideks võivad olla vedeliku-tahkise adsorptsioon, vedelik-vedelik jaotus, ionivahetus ja suuruse järgi eraldus. Lisaks võib lahutamist mõjutada analüüdi ning mobiilse faasi vaheline interaktsioon.[36]

Mobiilne faas on enamasti segu 2 solvendist, mis koos annavad piisava elueerimisvõime ja lahutuvuse. Normaalse faasi HPLCs on liikumatu faas polaarsem kui mobiilne faas, mis tähendab, et elueerimis efektiivsus kasvab solvendi polaarsuse kasvuga. Pööratud faasis on tegemist vastupidise olukorraga. Statsionaarne faas on vähem polaarne kui mobiilne faas ning sellest tingituna elueerimisvõime väheneb solvendi polaarsuse kasvamisega. [37]

Ühendite lahutamist saab teostada nii isokraatse kui ka gradient elueerimisega. [35] Isokraatseks elueerimiseks nimetatakse elueerimist, mis viiakse läbi ühe solvendi või konstantse solvendi seguga. Tihti on keeruline leida ühte mobiilse faasi koostist, mis oleks sobilik kõikidele analüütidele. Kui üks solvent ei anna piisavalt head lahutuvust, siis on võimalik kasutada ka gradient elueerimist. Gradient elueerimisel muudetakse eluendi koostist või kontsentratsiooni lahutusprotsessi käigus. [36]

Analüüdi väljumisel kolonnist suunatakse proov koos mobiilse faasiga detektorisse. Detektor genereerib signaali, mis on korrelatsioonis kolonnist välja juu analüüdi kogusega. Signaal salvestatakse HPLC kontrollarvutisse, kus on võimalik andmeid põhjalikumalt analüüsida. [35]

HPLC süsteem koosneb solvendi edastussüsteemist, proovi sisestussüsteemist, kõrgsurve kromatograafia kolonnist, detektorist ning arvutist, mis kontrollib tarkvara ja väljastab tulemusi. Uuemad süsteemid sisaldavad ka automaat proovi sisestussüsteemi. [34]



Joonis 2 Kõrgsurve vedelikkromatograafia süsteemi skemaatiline diagramm [38]

HPLC instrumendi kõige olulisem osa on kolonn, kuna sellest sõltub, mis omaduse järgi toimub komponentide segu lahutus. HPLC aparatuur sisaldab tavaliselt 2 kolonni: analüütiline kolonn ja eelkolonn. Analüütilises kolonnis toimub ainete lahutumine ning eelkolonn kaitseb analüütilist kolonni saastumise eest. [36] Tüüpilises HPLC kolonnis olevate osakeste suurus on 1,7-5 μm ning see on valmistatud terasest või plastikust, mis on 5-30 cm pikad ning sisediaameeter jääb 1-5 mm vahele.[34]

Kolonnid on kallid, mistõttu on oluline teada probleemidest, mis võivad analüütilise kolonni eluiga lühendada. Esiteks võib analüüt seostuda pöördumatult statsionaarse faasiga vähendades nii kolonni lahutusvõimet. Teiseks, kui kolonni süstitakse proov, mis sisaldab tahkeid osakesi, võib see analüütilise kolonni ummistada. Selle vältimiseks peaksid kõik proovid enne aparatuuri sisestamist olema filtreeritud läbi 0,45 μm filtri ning soovitatakse lisakaitkena kasutada eelkolonni. [36] Eelkolonn püüab peened ja tugevalt adsorbeerunud lahustunud osakesed kinni, takistades nende jõudmist analüütilisse kolonni. [34] Eelkolonn sisaldab tavaliselt sama statsionaarset faasi, mis põhikolonn, kuid on märgatavalt lühem ning odavam.[34,36] Eelkolonni vahetatakse perioodiliselt kui kolonni rõhk hakkab tõusma või piisav aeg või süstimiste arv on täis saanud.[34]

Statsionaarseteks faasideks HPLC süsteemis on peamiselt keemilistelt modifitseeritud ränidioksiidid (tuntud ka kui silikageel), mittemodifitseeritud ränioksiidid ja ristseotud stüreeni ja divinüülbenseeni kopolümeerid. [37] Ränidioksiid on amorfne tahke valget värvi poorne materjal, mis sisaldab paljusid ülipeenikesi poore, mistõttu on tal erakordselt suur adsorptsioonivõime. [38] Ränidioksiidi pind sisaldab kuni 8 μmol silanooli rühmi (Si-OH) ühel ruutmeetril. Silanooli rühmad protoneeritakse pH 2-3 juures ning nad dissotseeruvad negatiivseks Si-O^- rühmaks pH üle 3 juures. [34] Silanooli rühmade tõttu on räni pind kergelt happeline ning polaarne. Ränidioksiidi pinda saab keemiliselt modifitseerida reagentidega, mis reageerivad silanooli rühmadega andes neile terve hulga teisi funktsioone. Tulemusena tekivad seotud faasid, mis on hüdrofüüsiliselt stabiilsed siloksaani (Si-O-Si-C) sideme tekke tõttu ning omavad erinevaid kromatograafilisi omadusi ja selektiivsusi kui mittemodifitseeritud ränioksiid. [37]

1.3.1 Pööratud faasi kromatograafia

Pööratud faasi kromatograafia (ingl. k. *reversed-phase high performance liquid chromatography*, RP-HPLC) on vedelikkromatograafia lahutusmeetod, mis kasutab erinevaid mittepolaarseid statsionaarseid faase ja polaarset mobiilset faasi. [39] Elueerimine toimub polaarsuse kahanemise järjekorras. [36] Proov on tavaliselt lahustatud vees, mis on väga polaarne solvent. Polaarses solvendis lahustatud orgaanilise ühendi analüüsiks saab kasutada kolonni, mis kasutab hüdrofoobseid interaktsioone (van der Waalsi jõud, dispersioonijõud), kuna statsionaarse faasi afiinsus on suurem kui mobiilse faasi oma. [39]

RP-HPLC statsionaarne faas koosneb peamiselt keemiliselt modifitseeritud ränidioksiidist, kus hüdrofiilsed silanooli rühmad on seotud hüdrofoobsete alküülrühmadega. Alküülalahelate pikkusteks on tavaliselt C-4, C-8 ja C-18. [39] Reeglina, mida rohkem süsiniku aatomeid on seotud statsionaarse faasi külge, seda pikem on ka retentsiooni aeg. [37] Kõige populaarsemateks statsionaarseteks faasideks on keemiliselt seotud okta-detsüül ränidioksiid (ODS) ja n-alkaan 18 süsiniku aatomiga, mis suudavad lahutada madala, keskmise ja kõrge polaarsusega analüüte. [37,40]

RP-HPLC-s toimub tugev proovi ja statsionaarse faasi vaheline interaktsioon, mistõttu peab vesilahuseline eluent sisaldama orgaanilist solventi. [40] Liikuva faasi polaarsuse kasvades kasvab ka retentsiooni aeg. [36] Kõige laialdasemalt kasutatakse mobiilse faasina veepõhist puhvri lahust koos metanooliga või vett ja atseetonitriili. [37] Metanooli kasutamisel eluendina on miinuseks kõrge viskoosus segunemisel veega, mis tõstab märgatavalt rõhku HPLC süsteemis võrreldes teiste eluentidega. Atseetonitriil on eluendina väga kallis, eriti kui soovitakse seda hästi puhta kvaliteediga. [35]

RP-HPLC-d kasutakse kõige enamasti vesilahuste uurimiseks nagu näiteks bioloogilist päritolu proovid, farmaatsias, jookide analüüsil. Kuna vesilahus on kõige nõrgem eluent, siis võib neid proove sisestada ilma igasuguse erilise töötluseta. [35]

1.3.2 Eksklusioonkromatograafia

Eksklusioonkromatograafia (ingl. k *size exclusion chromatography*, SEC) on sobilik lahutama analüütide segu, mille molekulmass jääb 10^2 - 10^8 Da vahele. [37] Erineva suurusega analüütide segu läbib kolonnis olevat poorseid osakesi. Molekulid, mis on liiga suured, et poore läbida, elueeruvad esimesena. Väiksemad molekulid läbivad ja difundeeruvad pooridesse elueerudes hiljem. See võimaldab proovi lahutada ja jagada analüüdi molekulide nende suuruse järgi. Kui SEC süsteemi kalibreerida tuntud molekulmassiga proovidega, siis on võimalik hinnata analüüdi keskmist molekulmassi. [41]

Analüüte saab jagada kolmeks rühmaks:

- 1) Analüüdid, mis on suuremad kui kõige suuremad poorid, elueeritakse sama ruumalaga, mis on võrdeline kolonni vaba ruumalaga V_0 .
- 2) Kõige väiksematest pooridest väiksemad analüüdid elueeritakse totaalse ruumalaga V_{tot} , mis on vabaruumala ja osakeste sees olevate pooride ruumala summa.
- 3) Vahepealse suurusega analüüdid lahutuvad vastavalt sellele, kui sügavalt nad difundeeruvad pooridesse. (V_{tot} ja V_0 vahel)

Ainult kolmandas rühmas olevad analüüdid lahutatakse teineteisest. [37]

Statsionaarseteks faasideks SEC-is on kas mikroosakestega rist-seotud stüreeni ja divinüülbenseeni kopolümeerid koos kitsalt jaotunud poori suurstega või kontrollitud poorsusega silikageel, mille kõrvalahelad on kaetud lühikesi alküülalahlaid sisaldava reagentiga, et vältida analüüdi adsorptsiooni liikumatule faasile. Eksklusioonkromatograafias analüüt ja solvent ei interakteeru liikumatu faasiga. [37,40]

SEC kasutatakse peamiselt polümeeride segu ja bioloogiliste makromolekulide nagu valkude ja peptiidide iseloomustamiseks. [37]

1.4 UV-Vis Spektrofotomeetria

Spektrofotomeetria on igasugune tehnika, mis kasutab valgust aine keemilise kontsentratsiooni mõõtmiseks. Meetodit, mis põhineb nähtava valguse absorptsioonil, kutsutakse ka kolorimeetriaks. [34]

Ultraviolet (UV) ja nähtava valguse (Vis) piirkonna elektromagnetiline spekter katab lainepikkused 100 nm kuni 800 nm. Vaakum UV regioonis, mis omab kõige väiksemaid lainepikkusi (100-200 nm) ja kõrgemaid energiasid, on keeruline mõõtmise teha, mistõttu tehakse enamasti UV piirkonna mõõtmise lainepikkuste vahemikus 200-400 nm. [37]

Absorptsioon spektroskoopias läbib elektromagnetiline kiirgus proovi. Suurem osa kiirgusest läbib proovi ilma intensiivsuse kaotuseta, kuid kindlatel lainepikkustel toimub kiirguse nõrgenemine. Seda nõrgenemise protsessi kutsutakse absorptsiooniks. [36] Kui valgus absorbeerub proovis, siis valguskiire intensiivsus väheneb. Kiirguse intensiivsus (P) on valguse intensiivsus pärast proovi

läbimist ja (P_0) on enne proovi läbimist. Läbilaskvus (T) on defineeritud kui osa originaal valgusest, mis läbib proovi.

$$T = \frac{P}{P_0}$$

Neelduvust defineeritakse kui $A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = -\log T$

Kui valgus ei neeldu, siis $P=P_0$ ja $A=0$. Kui 90% valgusest neeldub, siis 10% sellest valgusest läbib proovi ja $P=P_0/10$, $A=1$. Neelduvust kutsutakse ka vahel optiliseks tiheduseks (D) ja absorptsiooniks (A). Neelduvus on oluline, kuna on otseselt proportsionaalne kontsentratsiooniga. Optilise tiheduse ja kontsentratsiooni vahelist seost väljendatakse Beer'i seaduse abil:

$$A = \epsilon lc$$

Neelduvus on dimensioonita suurus. Proovi kontsentratsiooni (c) väljendatakse tavaliselt ühikus moolide arv liitris (M). Teekonna pikkust ehk küveti läbimõõtu (l) väljendatakse tavaliselt sentimeetrites. Epsilon (ϵ) kutsutakse molaarseks absorbeeruvuseks või neeldumiskoeffitsendiks, ühikuks on $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Molaarne absorptsioon iseloomustab aine omadust absorbeerida valgust teatud lainepikkusel. [34]

Selleks, et proov absorbeeriks elektromagnetkiirgust peab olema täidetud 2 eeldust. Esiteks, peab olema mehhanism, kuidas kiirguse elektri- või magnetväli interakteerub analüüdiga. Ultraviolett ja nähtava valguse kiirguse puhul toimub interaktsioon valentselektroni elektroonse energiaga. Teiseks, elektromagnetkiirguse energia peab olema võrdne energia muutusega kahe kvantifitseeritud analüüdi energia oleku vahel ehk footoni energia peab olema võrdne madalama ja kõrgema energia oleku vahega. [36]

Kui molekul või ioon absorbeerib UV või nähtava valguse kiirgust siis toimub muutus valentselektroni konfiguratsioonis. [36] Orgaanilised molekulid sisaldavad süsinik-süsinik sidemeid ja sidemeid süsiniku ning teise elemendi vahel nagu hapnik, vesinik, lämmastik, väävel, fosfor ja halogeenid. Üksikside vastab ühele siduvalle σ orbitaalile, millega on seotud lõdvendav σ^* orbitaal. Mitmiksidemed vastavad π siduvalle ja π^* lõdvendavale orbitaalile. Siduvad orbitaalid on madalama energiaga, samal ajal kui lõdvendavad orbitaalid omavad kõrgemat energiat. [37] Orgaanilisestest molekulides täidavad valetselektronid kvantiseeritud σ -sidet, π -sidet, ja mittesiduvaid molekulaarorbitaale n . Tihtipeale asuvad tühjad σ -lõdvendavad σ^* ja π -lõdvendavad π^* üksteisele energeetiliselt nii lähedal, et elektroni ülekanne täidetud orbitaalilt tühjale orbitaalile on võimalik. [36] Absorptsioon spektrofotomeetrias on energia allikaks footonid. [36] Kui molekul absorbeerib footoni, siis molekuli energia suureneb ning me saame öelda, et molekul viidi ergastatud olekusse. [34] Mida kergemini elektrone saab ergastada, seda pikemat lainepikkust see ühend absorbeerib. [42] Nähtav ja ultraviolett kiirgus ergastavad elektronid kõrgema energiaga orbitaalidele. [34]

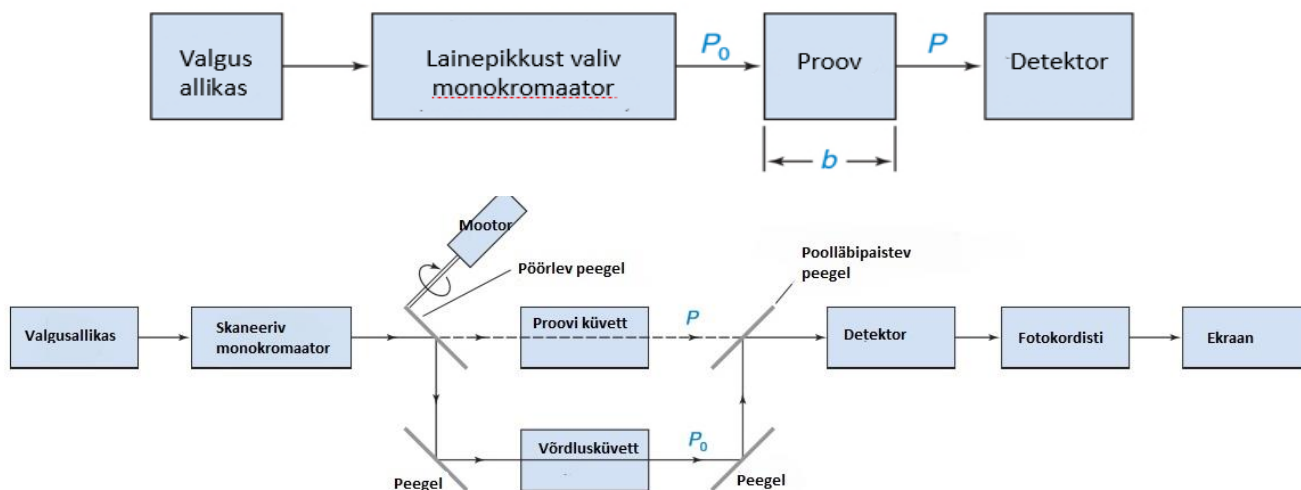
Osa molekulist, mis absorbeerib valgust kutsutakse kromofooriks. Iga aine, mis absorbeerib nähtavat valgust, tundub värviline, kui temast suunatakse läbi või temalt peegeldatakse valgust

valgust. Aine neelab valget valgust kindlal lainepikkusel ja meie silmad detekteerivad lainepikkusi, mis ei absorbeerunud. [34]

Tabel 1. Nähtava valguse piirkonna lainepikkustele vastavad värvid. [34]

Lainepikkus, nm	Absorbeerunud värv	Nähtav värv
380-420	Violett	Roheline-kollane
420-440	Sinine-violett	Kollane
440-470	sinine	Oranž
470-500	Sinine-roheline	Punane
500-520	Roheline	Lilla
520-550	Kollane-roheline	Violett
550-580	Kollane	Violett-sinine
580-620	Oranž	Sinine
620-680	Punane	Sinine-Roheline
680-780	Punane	Roheline

Spektrofotomeetri kindlateks osadeks on valgusallikas, monokromaator, proov ja valguse detektor. Volframtraadist lamp on hea valgusallikas nähtava valguse ja infrapunakiirguse lähedases piirkonnas. Tüüpiline volframi lamp töötab 3000 K juures ja kiirgab kiirgust 320-2500 nm juures. UV piirkonnas kasutatakse tavaliselt valgusallikana deuteerium kaarlahenduslampi, mis emiteerib UV kiirgust 110-400 nm vahemikus. UV-Vis spektroskoopias kasutatakse enamasti lülitit kahe eelnimetatud valgusallika vahel, et liikuda ühest lainepikkuse piirkonnast teise. [34] Proovianumatena kasutatakse UV-Vis spektroskoopias enamasti kvarts küvetti. Klaas küvett on sobilik nähtava valguse piirkonnas, kuid mitte UV piirkonnas, kuna klaas küvett absorbeerib ultraviolet kiirgust. Kõige tavalisemad küvetid on 1,000 cm laiused. [34]



Joonis 3. UV-Vis spektrofotomeetria ühe- ja kahe kiirelise instrumendi skemaatilised diagrammid [34].

UV-Vis spektrofotomeetrias esineb 2 erinevat seadme konfiguratsiooni, mis on toodud joonisel 3. Üksikkiirega instrumendis ei mõõdeta läbilaskvust otse vaid valguse läbilaskvust mõõdetakse läbi võrdlus küveti mõõtmise P_0 . Võrdlusküvett eemaldatakse ning asendatakse identse küvetiga, mis sisaldab analüüsitavat proovi. Valguse kiirus, mis pärast proovi läbimist jõuab detektorisse, on tähistatud joonisel P tähega. Teades nii P ja P_0 võimaldab meil määrata T või A väärtust. Võrdlusküvett on vajalik, kuna ta kompenseerib peegeldumist, hajumist ja absorptsiooni küveti ja solventi poolt. Kahekiireline aparaat jagab valgust, et see läbiks nii proovi kui ka võrdlusküveti.[34]

1.3.3 UV-Vis detektor vedelikkromatograafias

Detektor peaks olema suuteline tuvastama analüüti, mida elueeritakse kolonnist. Detektor peab jälgima muutust mobiilse faasi koostises, konverteerima selle elektriliseks signaaliks ja kandma info edasi arvutisse, kus toimub informatsiooni kuvamine. [40]

Kõige populaarsemad detektorid, mida kasutatakse HPLC-s ning põhinevad spektromeetrilistel mõõtmistel on UV-Vis absorptsioon ja fluorestsents. Need detektorid varieeruvad ehituselt suuresti alates lihtsast disainist, kus analüütiline lainepikkus valitakse sobiva filtriga kuni läbivoolurakuga modifitseeritud spektrofotomeetrini välja. [36] UV detektorid on tundlikud. Neid ei mõjuta temperatuuri muutused ning on sobilikud ka gradient elueerimiseks. [40]

Fotodiodmaatriks detektor (PDA) ehk DAD suudab mõõta eluenti mitmel erineval lainepikkusel üheaegselt. [40] DAD kasutab fotodiodmaatriksit, et mõõta kiirgava valguse intensiivsust. [41] DAD on võrreldes UV-Vis detektoriga vastupidise optikaga. Valgus läbib detektori rakku ning seejärel jagatakse polükromaatori poolt laiali. Järgmisena jõuab valgus diodmaatriksini. Diodmaatriks on 1 cm laiune silikoon kiip, mis sisaldab 100-1000 tundliku kõrvuti asetsevat diodi. Iga diod registreerib informatsiooni paika pandud lainepikkuselt. [40,41]

1.4 DOM-i omaduste määramine optiliste meetoditega

Kromofoorne DOM (ingl. k. Chromophoric DOM) on osa orgaanilisest ainest, mis on võimeline interakteeruma valgusega ning neelama selle energiat. Selleks, et DOM-il oleksid kromofoorseid omadused, peab ta sisaldama küllastamata ja konjugeeritud rühmasid. [5]

Looduslik DOM vees neelab valgust UV valguse piirkonnas (200-400 nm) ja nähtava valguse piirkonnas (400-700 nm) andes iseloomuliku spektri. Spektril puudub maksimum ning miinimum ja optiline tihedus väheneb lainepikkuse kasvades. Kuigi erinevat päritoluga looduslik DOM võib omada erinevat elemendilist koostist ja omadusi, siis nende spektrid on sarnased. Kui võrrelda DOM-is sisalduva HA ja FA spektrit, siis visuaalselt neil erinevust ei ole. [43]

DOM-i absorptsioon UV piirkonnas toimub peamiselt üksiku elektronpaari ergastumisega, milleks on tavaliselt hapnik ($n \rightarrow \pi^*$) või konjugeeritud kaksikside ($\pi \rightarrow \pi^*$). Absorptsioon nähtava valguse piirkonnas on põhjustatud üksiku elektronpaari ja laengu ülekande süsteemidest. [30,44]

Erinevaid lainepikkusi ja nende suhteid on võimalik kasutada DOM-i kirjeldamiseks ja iseloomustamiseks. UV-Vis spektri lainepikkust 254 nm (UV_{254}) kasutatakse enamasti DOM-i kvantitatiivseks määramiseks. Lainepikkust 280 nm kasutatakse tihti totaalse aromaatsuse kirjeldamiseks, sest ühenditel nagu fenoolsed areenid, bensoehape, aniliini derivaadid, polüeenid ja polütsükliilsed aromaatsed süsivesinikud toimub selles lainepikkuse piirkonnas (u. 270-280 nm) $\pi \rightarrow \pi^*$ elektroni üleminek. DOM-is sisalduva HS-i absorptsioon UV-Vis valguse piirkonnas kasvab aromaatsete tuumade kondensatsiooniastme, üldsüsiniku sisalduse, molekulmassi ning aromaatses süsiniku ja kõrvalahelas oleva alifaatses süsiniku suhte kasvuga. [30,44]

Peale kindlate lainepikkuste on võimalik kasutada ka teatud lainepikkuste suhteid DOM-i omaduste määramiseks.

- A_{254}/A_{203} on kasutatud looduslikus DOM-is oleva küllastamata ja küllastatud (aromaatsete ja alifaatsete) osade suhtelise koguse indikaatorina. Madalad A_{254}/A_{203} suhted ($<0,1$) on iseloomulikud peamiselt asendatud alifaatsete rühmadega aromaatsetele tsüklitele. Kõrged A_{254}/A_{203} väärtused ($>0,40$) on tüüpilised aromaatsetele tsüklitele, mis sisaldavad asendatud estri, hüdroksüül-, karbonüül- ja karboksüülrühmi. Neid funktsionaalrühmi seostatakse DBP-de tekkega. [44]
- A_{250}/A_{365} seostatakse molekulmassi negatiivse korrelatsiooniga. A_{250}/A_{365} suhet tuntakse ka kui E_2/E_3 . Molekuli suurus kasvab kui E_2/E_3 väärtus väheneb. Loodusliku DOM-i kõrgema molekulmassi tõttu toimub tugevam valguse absorptsioon kõrgematel lainepikkustel. E_2/E_3 suhe ja aromaatsus on omavahel negatiivses korrelatsioonis. [44]
- Lainepikkuste suhte E_4/E_6 kirjeldamiseks kasutatakse lainepikkusi A_{465}/A_{665} , A_{470}/A_{665} , A_{470}/A_{665} . E_4/E_6 teatakse traditsiooniliselt kui aromaatses süsiniku kondensatsiooni astme või humifitseerimis astme indikaatorina. [44–46] E_4/E_6 suhe korreleerub ka keskmise molekulmassi ja molekuli suurusega. [47] Neelduvus 460-480 nm kajastab humifitseerumis protsessi alguses olevat orgaanilist materjali. 600-670 nm viitab tugevalt humifitseerunud materjalile, mis sisaldab palju aromaatsed ja kondenseerunud rühmi. Madalad E_4/E_6 väärtused viitavad kõrgele humifitseerumis ja kondenseerumis astmele. [48]
- A_{280}/A_{350} parameetrit kasutatakse NOM-i fraktsioonide elektroni ülekande laiuse (ET) neelduvuse hindamiseks. On leitud ka korrelatsioone NOM-i aromaatsuse ja molekulmassi vahel. [44]
- Parameetrit A_{280}/A_{470} (E_2/E_4) on kasutatud HS-is ligiini suhtelise koguse hindamiseks humifitseerumisprotsessi alguses. [45]
- Lainepikkuste suhe A_{365}/A_{470} iseloomustab UV-nähtava valguse piirkonnas neelduvaid funktsionaalrühmi. [46]
- Suhtega A_{254}/A_{436} hinnatakse DOM-i võimaliku päritolu. Madalad A_{254}/A_{436} suhte väärtused (näiteks piirkonnas 4-14) on iseloomulikud maiset/allohtoonse päritoluga ja kõrged A_{254}/A_{436} väärtused (25-40) on omased mikroobse/autohtoonse päritoluga looduslikule DOMile. [44]

- Suhet A_{210}/A_{254} on kasutatud looduslikku DOM-i makromolekulide iseloomustamiseks. Tuntakse ka kui UV neelduvuse suhte indeks. A_{210}/A_{254} madalaimad väärtused viitavad makromolekulidele, millel on kõrge aromaatsus nagu HA ning kõrgemad väärtused madala aromaatsusega ühenditele nagu valgud.[44]

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Kasutatud kemikaalid ja lahused

1. IHSS Nordic Reservoir NOM (RO isolation) IHSS Nordic Reservoir 1R108N
2. Metanool (Sigma-Aldrich Chromasolv® for HPLC 99,9%)
3. Polüstüreensulfonaadi naatriumi soolad (PSS Na-sool) Fluka CAS number 9080-79-9
 - a. Standard 17 000. Toote nr 81609 MP 15800, MW 14900, D<1,2
 - b. Standard 13 000. Toote nr 81608 MP 13500, MW 13200, D<1,2
 - c. Standard 6800. Toote nr 81607 MP 6430, MW 6530, D<1,2
 - d. Standard 4300. Toote nr 81606 MP 4210, MW 4230, D<1,2
 - e. Standard 210. Toote nr 81604 MP 208, MW 208, D<1,05
4. 20 mM fosfaatpuhver pH 6,8 + 10 % CH₃OH. Puhvri valmistamiseks kaaluti mõõtkolbi 5,77 g NH₄H₂PO₄ (M = 115 g/mol, Reidel-de Haen, Saksamaa) ja 6,56 g (NH₄)₂HPO₄ (M = 132 g/mol, Lach-Ner, Tšehhi) ning lahustati 1 l MilliQ vees. Saadud 100 mM fosfaatpuhver filtreeriti ja degaseeriti ultraheli vannis. 20 mM fosfaatpuhvri + 10 % metanooli saamiseks võeti 200 ml 100 mM fosfaatpuhvrit ning 100 ml metanooli (Sigma-aldrich Chromasolv® ning lahjendati veega 1 L-ni.
5. 1:1 metanool:vesi

Kõikide vett sisaldavate lahuste valmistamiseks kasutati MilliQ puhtusega vett.

2.2 HPLC aparatuur ja analüüsitingimused

HPLC süsteem koosnes pumbast (Knauer), dosaatorist (Rheodyne), kolonnist, diodmaatriks-detektorist (Agilent Technologies), mis valgusalikana kasutas deuteerium lampi. Andmete analüüsimiseks ja salvestamiseks kasutati programmi Agilent ChemStation.

Pööratud faasi kromatograafia kolonniks oli Discovery HS C18 HPLC, 15cm x 4,6 mm, mis on oktaedetsüül ränidioksiid kolonn. Kolonni osakeste suurus on 5 µm, poori suurus 120 Å, pindala 300 m²/g ja talub pH vahemikku 2-8.

RP-HPLC süsteemis analüüsiti kõiki analüüte järgmistel tingimustel: eluendi voolukiirus 0,2 ml/min, rõhk 5,0-6,0 MPa, proovi ruumala 20 µl ja läbivoolu ajaga 15 minutit. Eluendiks oli 1:1 vee ja metanooli lahus. Tulemusi salvestati 3 erineval lainepikkusel, milleks olid 210 nm, 254 nm ja 280 nm. Selles töös kasutasime andmeid lainepikkustel 254 nm.

Eksklusioonkromatograafia kolonniks oli Biosep™ 5 µm SEC-s2000 145 Å, 300 x 7,8 mm, mis sisaldab hüdrofiilselt seotud ränidioksiidi. Kolonn talub pH vahemikku 2,5-7,5. Kolonni sise diameetriks on 7,8 mm, osakeste suurus kolonnis on 5 µm ning lahutusviisiks on geelfiltratsioonkromatograafia. Eelkolonniks oli Phenomenex Security Guard GFC-2000.

HPSEC süsteemis analüüsiti kõiki analüüte järgmistel tingimustel: eluendi voolukiirus 0,5 ml/min, rõhk 6,0-7,0 MPa, proovi ruumala 20 µl ja läbivoolu ajaga 35 minutit. Eluendiks oli 20 mM

fosfaatpuhver pH 6,8 + 10% metanooli. Tulemusi salvestati 3 erineval lainepikkusel, milleks olid 210 nm, 254 nm ja 280 nm. Selles töös kasutasime andmeid lainepikkustel 254 nm.

2.3 UV-Vis aparatuur ja analüüsi tingimused

UV-Vis spektrofotomeetria aparatuurina kasutati Shimadzu UV-1280 spektrofotomeetrit joonis 4. Spektrofotomeeter suutis skaneerida lainepikkusi 190-1100nm. Valgusallikatena kasutati 20 W halogeen ja deuteerium lampe ning detektoriks on silikoon fotodiodid.

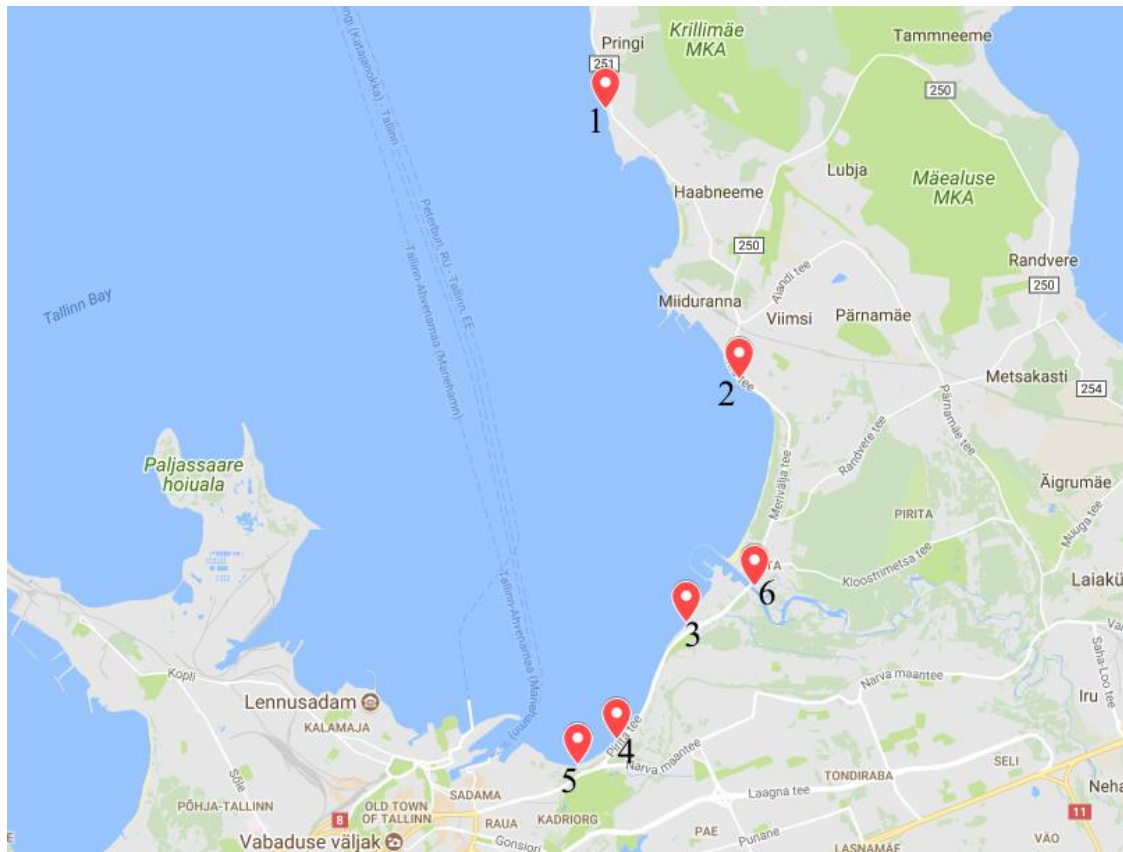
Neeldumisspektritelt võeti andmeid 8-lt lainepikkuselt: 205, 210, 254, 280, 350, 436, 470 ja 665 nm. Suhete arvutamiseks kasutatud lainepikkused võivad vähesel määral erineda peatükis 1.4 suhetest, kuna erinevad allikad kasutasid erinevaid lainepikkusi DOM-i sama omaduse määramiseks.



Joonis 4. UV-1280 aparatuur [50]

2.4 Tallinna lahe veeproovid

Uurimistöö raames analüüsiti 24 erinevat veeproovi, mis olid võetud 6 erinevast kohast ning 4 erineval kuupäeval (17.04.18, 02.05.18, 15.05.18 ja 29.05.18). Proovivõtu asukohad on toodud joonisel 5. Kõik proovid filtreeriti läbi 0,45 µm ning säilitati suletud pudelis +4 °C juures pimedas.



Joonis 5. Proovivõtukohad Tallinna lahe ääres.[51]

Esimene proov sai võetud restoran Paat juurest olevast veest. Koht valiti, kuna tuule puhangute ja mere hoovuste tõttu on vesi selge ja rohelist materjali ei olnud. Teiseks proovi võtukohaks oli Merivälja muuli vahetu lähedus. Antud asukohas olid kivid kaetud roheline vetikamassiga ning antud piirkonnas on esitatud kaebusi adru haisu üle. Kolmas proov võeti Saare tee algusest, kus asub sademereovee väljavool. Antud piirkonnas oli näha rohelist vetikaid ja tunda halba lõhna. Neljas proov sai võetud Lauluvaljaku lähedalt, kus on järgmine sademevee väljavool ning ka seal asukohas võis näha vetikaid. Viies proov sai võetud Russalka juurest, mis meie katsete seerias oli siis kõige lähem vaatluspunkt Tallinna kesklinnale. Russalka juures oli 2 sademevee väljavoolu, mis väljutavad reovett Tallinna lahte. Visuaalselt fikseeriti kivil pruunikat materjali. Russalka ümbrus oli ka populaarseks supluskohaks. Viimaseks proovivõtu kohaks oli Pirita jõe suudmeala (silla lähedal). Pirita jõgi sai valitud oma vee kollase värvuse ja rohke toiteelementide sisalduse tõttu. Lisaks voolab jõgi merre mõjutades nii mere lahustunud orgaanilise aine kvaliteeti ja kogust.

Kõige paremat informatsiooni proovivõtu päevade ilmastiku tingimuste kohta leidis Riigi ilmateenistuse kodulehel. Uurimistöö proovivõtu ilmastikutingimustele kõige adekvaatsemat informatsiooni pakkusid Pirita rannikujaamas mõõdetud väärtused. Pirita rannikujaam asub Pirita Jahisadamal ning proovide võtu asukoha jaotuses umbes keskel.

Tabel 2. Piritä rannikujaama vaatlusandmed proovivõtu kuupäevadel [52].

Kuupäev	Veetase BK77 (cm)	Veetase EH2000 (cm)	Veetaseme muutus 24h jooksul (cm)	Veetemperatuur (°C)	Õhutemperatuur (°C)
17.04.18	-32	-8	9	6,1	3,7
02.05.18	-10	14	-3	8,6	8,8
15.05.18	-27	-3	-0	8	23,3
29.05.18	-4	-16	3	12	17,4

2.5. Kontsentratsiooni määramine

Uuritavates proovides DOM-i kontsentratsiooni määramiseks kalibreeriti kromatograafilisi kolonne ja UV-Vis spektrofotomeetrit erinevate kontsentratsioonidega loodusliku DOM-i standarditega. Lahused sai valmistatud IHSS Nordic Reservoir NOM-i standardist kontsentratsioonidega: 1 mg/L, 5 mg /L, 10 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L ja 100 mg/L ning seejärel filtreeriti läbi 0,45 µm vastavalt DOM-i definitsioonile.

Kõiki standardlahuseid sai analüüsitud eelnevalt välja töötud HPSEC, RP-HPLC ja UV-Vis spektrofotomeetria tingimustel ning kalibreerimisgraafikute koostamiseks võeti andmed 254 nm juures.

Tabel 3. DOM-i kvantitatiivseks määramiseks kasutatud kalibratsioonivõrrandid.

Meetod	Kalibratsioonivõrrand	Korrelatsioonikordaja
UV-Vis spektroskoopia	$Y = 0,0109 \pm 0,0001X + 0,0340 \pm 0,0030$	0,9995
RP-HPLC	$Y = 35,8456 \pm 0,4142X + 34,5267 \pm 21,7839$	0,9971
HPSEC	$Y = 18,1069 \pm 0,2506X + 44,916 \pm 14,0879$	0,9964

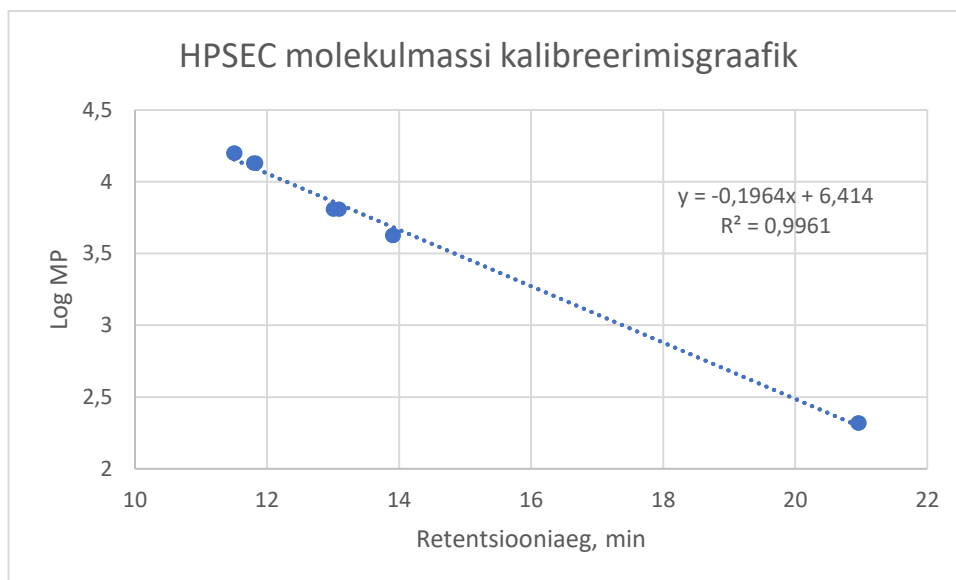
Lisaks kalibreerimisgraafikutele arvutati ka DOC Arnividarsoni valemi järgi [49]:

$$C \left(\frac{mg}{L} \right) = 472 * A(\lambda) * \exp(0,014(\lambda - 450))$$

λ on antud töös lainepikkus 254 nm ja $A(\lambda)$ on neelduvus selle lainepikkuse juures.

2.6 HPSEC süsteemi kalibreerimine molekulmassi määramiseks

Uuritavates Tallinna lahe proovides molekulmassi määramiseks kalibreeriti HPSEC kromatograafilist kolonni standardainetega, mille molekulmassid olid meile teada. Kuna teadaoleva molekulmassiga DOM-i standardeid ei ole saadaval, siis kasutati molekulmassi kalibreerimiseks polüstüreensulfonaate (PSS). PSS kasutatakse tihti DOM-i molekulmassi kalibreerimiseks, sest tema keemilised ja hüdrodünaamilised omadused on sarnased HS-ile ning tema laengujaotus on sarnane DOM-ile. [50]



Joonis 6. HPSEC süsteemi kalibreerimine molekulmassi määramiseks

Kalibreerimisgraafiku koostamiseks kasutati PSS standardeid molekulmassidega 17000 Da, 13 000 Da, 6800 Da, 4300 Da ja 210 Da. (Täpsem informatsioon kasutatud kemikaalide juures) ning standardainete M_w väärtuste asemel kasutati M_p väärtusi, mis näitab HPSEC kromatogrammil piigi maksimumi molekulmassi. Mõõtmised viidi läbi 254 nm juures.

2.7 Katseandmete statistiline töötlus

Proovide statistiliseks analüüsiks analüüsiti iga veeproovi iga aparatuuriga vähemalt 3 korda. Kromatogrammide analüüsil kasutati programmi ChemStation, mis registreeris antud piikide retentsiooniajad ning arvutas välja piikide pindalad, kõrgused, laiused ja sümmeetria. Antud töös kasutati peamiselt kromatogrammide analüüsil piikide retentsiooniaegu, pindalasid ja kõrgusi. UV-vis spektrofotomeetriaga registreeriti iga proovi neelduvus. Kõigile saadud tulemustele arvutati keskvaartused ja standardhälbed, kasutades alltoodud valemeid:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=0}^n x_i}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$\bar{x}$ - mõõdetava suuruse keskväärus

x_i - mõõdetava suuruse üksikväärus

s- mõõdetavate suuruste standardhälve

n- mõõtmiste arv.

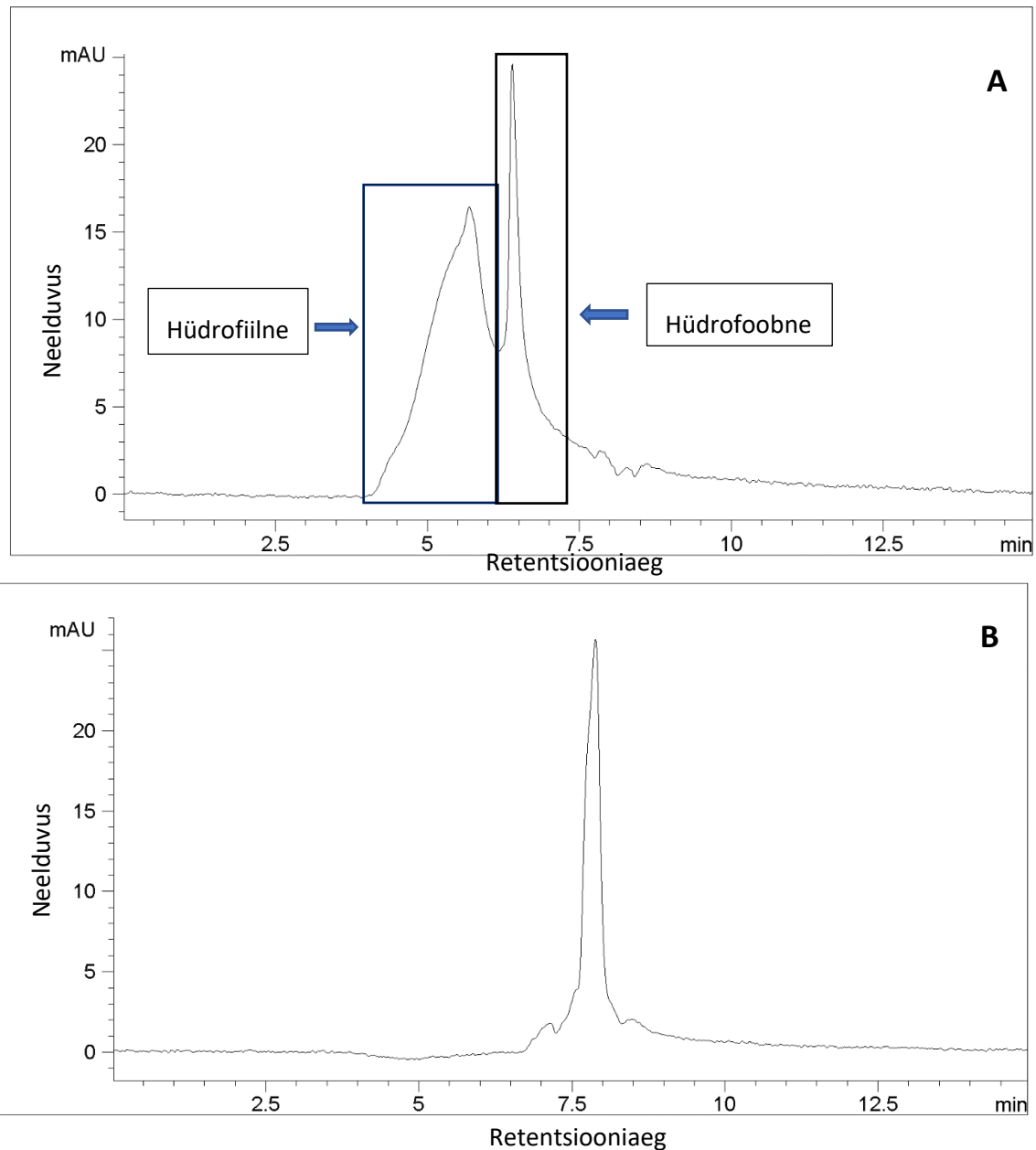
Vaatluspunktidest sarnasuste leidmiseks sai kasutatud Microsoft Exceli statistilise tarkvara XLSTAT-i peakomponentide analüüsi (ingl. k. principal component analysis, PCA) funktsiooni. PCA on projekteerimismeetod, mis projekteerib objektid p-omadustega p-dimensionaalsest ruumist k-dimensionaalsesse ruumi (kus $k < p$), samal ajal säilitades võimalikult palju informatsiooni esialgsetest dimensioonidest. PCA dimensioone kutsutakse telgedeks või Faktoriteks. [51]

PCA võimaldab kergesti saada informatsiooni suurtest andmetabelitest. PCA-d saab kasutada omaduste vahelise korrelatsiooni visualiseerimiseks ja uurimiseks võimaldades nii elimineerida mõõdetavate parameetrite arvu tulevikus. Lisaks võimaldab PCA visualiseerida objekte 2 või 3-dimensionaalses ruumis, selleks, et tuvastada sarnaseid või erinevate omadustega gruppe.[51]

Antud PCA analüüsi läbiviimisel kasutati klassikalist PCA (Pearsoni) andmetöötlust, mis automaatselt autoskaleerib andmed enne arvutusi, selleks, et vähendada numbriliselt suurema muutuse mõju arvuliselt väiksemate muutujate suhtes. Andmete visualiseerimiseks sai kasutatud „*Biplot*“ tüüpi graafikut, mis esitab samaaegselt muutujaid ja omadusi ühel graafikul. [51]

3. Tulemused ja arutelu

3.1 DOM-i RP-HPLC ja HPSEC kromatogrammide iseloomustus



Joonis 7. RP-HPLC näidiskromatogrammid A- Pirita jõgi 02.05.18, B- Merivälja muul 17.04.18

Kõik veeproovide analüüsid said läbi viidud punktis 2.3 toodud tingimustel. Kromatogrammidelt saadud andmed, nende keskmised ja standardhälbed on toodud tabelis lisa 1. RP-HPLC meetodil esines 254 nm lainepikkuse juures Tallinna lahe veeproovidel enamasti 2 erineva kujuga kromatogramme, mille näited on toodud joonisel nr 7.

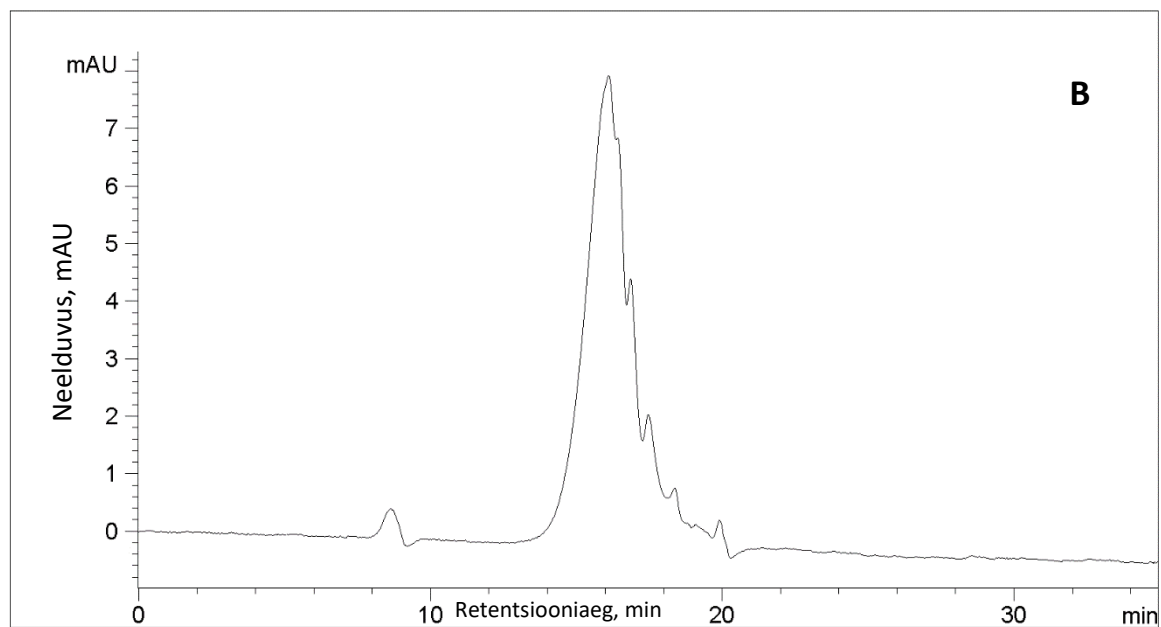
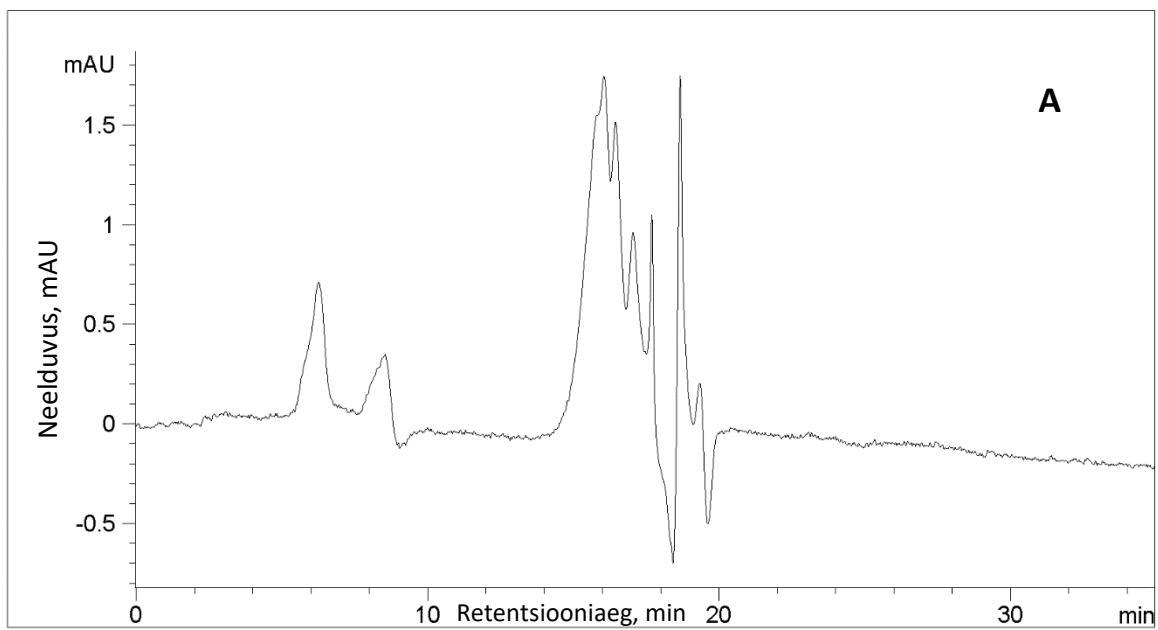
Esimest stiili kromatogrammi näide on tähistatud joonisel 7 tähega A. A stiili kromatogrammid esinesid Pirita jõe ja 29.05.18 kuupäeva Russalka veeproovidel. Kromatogrammidelt on näha 2 kõrgemat kromatograafilist piiki, mis elueerusid 3,5 -7,5 minuti vahel. RP-HPLC-s lahutatakse piigid polaarsuse kahanemise järjekorras. Kuna aine vees lahustumise võime on tugevalt seotud aine polaarsusega, siis võib kromatogrammi jagada hüdrofiilseks ja hüdrofoobseks osaks. Detekteeritud ühendite neeldumisspektreid võrreldi arvutiprogrammi ChemStation kohalikku andmebaasi kogutud ainete neeldumisspektritega. Hüdrofiilse piigi neeldumisspekter sarnanes kõige rohkem humiinaine laadse ühendi spektrile. Tõenäoliselt on tegu FA-ga, kuna ta elueerub enne hüdrofoobse piigina tuvastatud humiinaine-peptiidilaadse ühendi kompleksi ning tegemist on kõige polaarsete HS-iga. [32]

Teise kujuga kromatogramme (näidiskromatogramm joonisel 7 B) esines kõikidel ülejäänutel Tallinna lahe proovidel. Analüütide kromatogramm koosnes peamiselt ühest suurest piigist, mis elueerus 7-9 minuti vahel viitades sellega elueerunud ühendi mittepolaarsusele. Vastavalt andmebaasile oli enamasti tegu humiini-peptiidilaadse ühendi kompleksiga. 17.04.18 kuupäeva Merivälja muuli ja Saare tee proovidel ning 02.05.18 ja 29.05.18 Saare tee proovidel tuvastati piigiks aga peptiidilaadne ühend. [32]

Kui võrrelda omavahel kromatogramme A ja B siis on näha, et B kromatogrammil tuvastatud ühend on hüdrofoobsem ehk mittepolaarsem võrreldes A kromatogrammi ühenditega.

3.2 HPSEC kromatogrammi iseloomustus

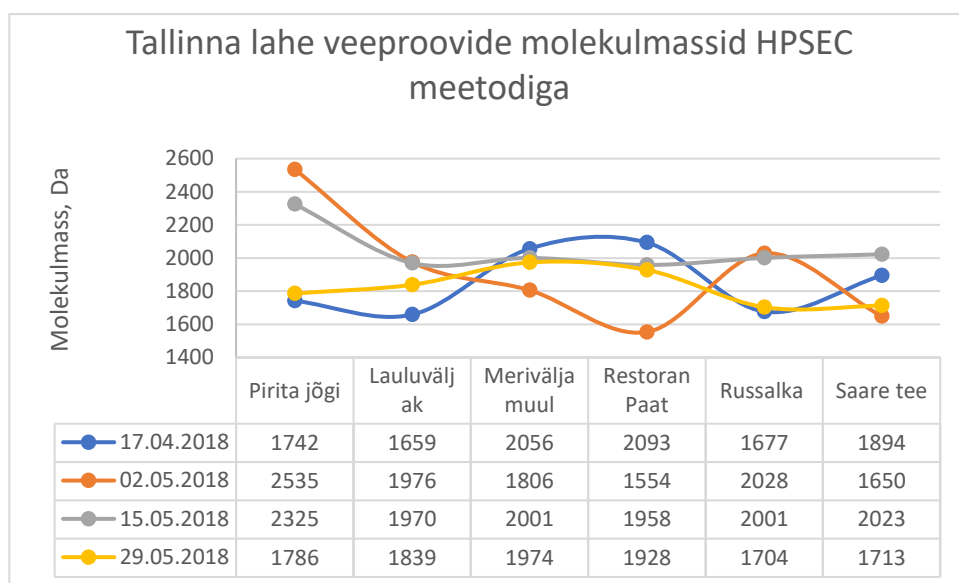
Tallinna lahe veeproovide HPSEC kromatogrammid saadi punktis 2.3 läbi viidud tingimustel. Kromatogrammidelt saadud andmed on toodud tabelis lisa 2. Joonisel 8 on toodud 2 näidiskromatogrammi, mis erinevad teineteisest peamiselt kontsentratsiooni poolest ning sellest tulenebki näilik kromatogrammi erinevus. Retentsiooniajad ei muutunud märkimisväärselt erinevate proovide vahel. Selleks, et täpselt piiritleda DOM-i väljumisaega sai määratud ka dekstraani ja asiidi elueerimisajad, milleks olid vastavalt 8,555 ja 18,348 min. Dekstraani ja NaN_3 molekulmassid on vastavalt 1 000 000 Da või rohkem ja 65 Da. 90% DOM-dest jääb 100-3000 Da vahele, mistõttu saab eeldada, et asiidist väiksemate molekulide puhul on tegu mingi tundmatu madalmolekulaarse ainega, mis elueerub ruumalaga V_{tot} . [6] Dekstraan elueerub ajaga V_0 , seetõttu on raske ühendeid antud piirkonnas tuvastada, kuid tõenäoliselt on esimese piigi näol tegu mõne kõrgmolekulaarse humiinaine agregaadiga. Arvestades dekstraani ja asiidi elueerimisajad määratlesime DOM-i elueerumisaegade vahemikuks 13,5-18 minutit.



Joonis 8. HPSEC näidis kromatograafid a) 29.05.18 Lauluväljak b) 29.05.18 Pirita Jõgi

3.3 DOM-i molekulmass HPSEC meetodiga

Molekulmassi määramiseks loodi punktis 2.6 kirjeldatud kalibreerimisgraafik. Molekulmassid määrati kõige kõrgema piigi maksimumi järgi. Enamus veeproovides määratud DOM-i molekulmassid jäävad 1500-2100 Da vahele. Kõrgemaid väärtusi esineb Pirita jõe 02.05.18 ja 15.05.18 proovides, kus molekulmassideks on vastavalt 2535 ja 2325 Da. Kõikides proovides mõõdetud DOM-ide molekulmassi väärtused on üle >1kDa, mistõttu võib neid klassifitseerida kõrge molekulmassiga (HMW) DOM-iks.



Joonis 9. Tallinna lahe veeproovide kõige kõrgema piigi molekulmassid.

3.4 DOM-i kvantitatiivne määramine

DOM-i kontsentratsiooni määramiseks loodud kalibratsioonivõrrandid ja kasutatud valem on toodud punktis 2.5.

Tabel 4. Erinevate meetoditega määratud DOM-i kontsentratsioonid. Proovide tähistamiseks kasutati numbri ja tähe kombinatsioone: L- Lauluvaljak, M-Merivälja muul, P-Restoran Paat, J- Pirita Jõgi, R- Russalka, S-Saare tee. 1- 17.04.18, 2- 02.05.18, 3- 15.05.18, 4- 29.05.18. Tabelis on tulemused jaotatud Exceli programmi Quick Analysis funktsiooni abil värvi koordineeritult erinevatesse rühmadesse. Madalama kontsentratsiooniga tulemused on tähistatud roheliselt, keskmised valgelt ning kõrged punaselt.

Proov	DOM (UV ₂₅₄) mg/L	DOC mg/L	DOM (RP-HPLC) mg/L	DOM (HPSEC) mg/L
L1	9,05	4,02	11,51	14,51
L2	8,10	3,70	14,37	14,26
L3	5,86	2,96	9,34	10,75
L4	4,97	2,67	9,37	11,29
M1	15,64	6,19	14,45	21,89
M2	14,45	5,80	16,37	22,81
M3	6,23	3,09	10,33	13,24
M4	6,38	3,14	10,46	13,24

P1	14,85	5,93	14,12	21,35
P2	8,47	3,82	15,93	14,94
P3	7,42	3,48	13,43	13,67
P4	9,26	4,09	12,96	15,37
J1	42,87	15,18	34,39	57,37
J2	63,30	21,92	46,82	74,60
J3	54,49	19,01	42,06	65,96
J4	37,57	13,43	26,98	58,89
R1	17,45	6,79	20,39	23,09
R2	9,85	4,28	12,18	15,76
R3	10,83	4,60	13,55	15,60
R4	36,80	13,17	25,63	54,09
S1	19,63	7,51	15,01	23,33
S2	13,04	5,33	14,48	17,91
S3	7,21	3,41	11,69	13,82
S4	12,48	5,15	14,39	16,31

Kontsentratsiooni tulemustest kõige adekvaatsemaks hindaksime HPSEC meetodiga saadud väärtusi. Antud meetodiga saadi küll kõige kõrgemad tulemused, kuid HPSEC võimaldas DOM-i identifitseerida ning elimineerida liiga kõrge ja liiga madala molekulmassiga ühendid. DOM-i kontsentratsiooni paremaks võrdlemiseks DOC-i tulemustega on võimalik DOM-i kontsentratsioonid ümber arvutada DOC-iks, kuna teame kasutatud standardi Aquatic NOM 1R108N süsiniku sisaldust, milleks on 53,17%.

RP-HPLC tulemused olid HPSEC omadest natuke madalamad, mis on tõenäoliselt tingitud väga hüdrofoobsete DOM-i ühendite adsorptsioonist statsionaarsele faasile. RP-HPLC meetodit saab antud juhul kasutada DOM-i suhtelise kontsentratsiooni hindamiseks, kuid mitte täpseks kontsentratsiooni määramiseks. RP-HPLC meetodil DOM-i kontsentratsiooni täpseks määramiseks tuleks muuta eluendi koostist. Antud töös sai kasutatud 1:1 MetOH-vesi eluenti, kuna lisaks kvantitatiivsele analüüsile oli oluline ka DOM-i kvalitatiivne analüüs.[52]

Kui võrrelda omavahel UV₂₅₄ ja HPSEC meetodiga saadud kontsentratsioonide tulemusi, siis millegi pärast tulid UV₂₅₄ saadud kontsentratsioonid väiksemad kui HPSEC-iga. Mõlema meetodi kalibreerimisgraafiku ja proovide andmed võeti lainepikkuselt 254 nm. Loogiliselt võttes oleks pidanud UV-Vis spektrofotomeetriaga saadud tulemused olema kõrgemad kui HPSEC-iga, kuna HPSEC-iga saab selekteerida ainult DOM-i.

DOC-i kasutatakse tihti DOM surrogaat väärtusena. Selleks, et DOC-i arvutades saada täpsemad kontsentratsioonid oleks mõistlik kasutada UV-Vis spektroskoopia asemel elementanalüsaatorit, millele ligipääs antud töö vältel puudus. Antud töös sobib UV-Vis spektroskoopia tulemuste alusel arvutatud DOC-i kontsentratsioon kontsentratsiooni muutuse hindamiseks.

Tabelist 4 on näha, et kõige suuremad kontsentratsioonid esinesid Pirita jõe ja 29.05.18 Russalka proovides (värvuselt tume punased. Kõige väiksemates kogustes oli DOM-i Lauluväljaku juures olevates veeproovides (värvuselt rohelised). Kontsentratsiooni tõus Pirita jõe suudmes on tõenäoliselt tingitud Pirita jõe läbimisest läbi tihedalt asustatud piirkonna ning Botaanikaia äravoolu suunamisest jõkke ja sissevooludega suurelt valgalalt. Lisaks võib eeldada, et

botaanikaaias ja elamukvartalites kasutatakse väetisi, et edendada taimede kasvu. FA on põhikomponent kvaliteetsetes väetistes.

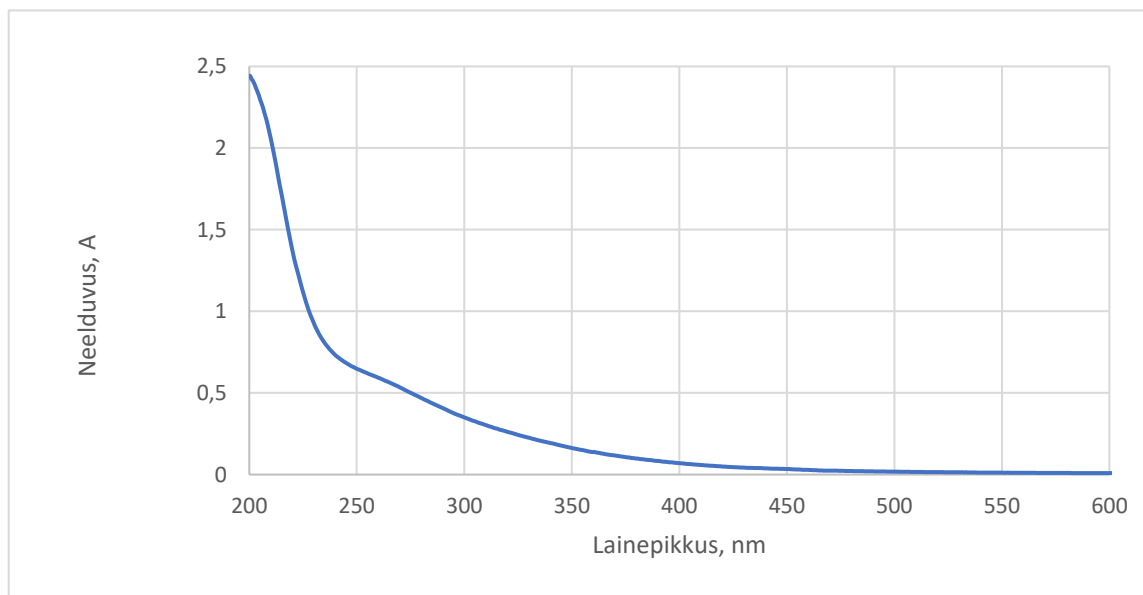
Erinevate meetodite kasutamisel saadi samas asukohas erinevaid kontsentratsioone, mistõttu kasutati kontsentratsioonide hindamiseks korrelatsiooni koefitsiente, mis on toodud tabelis 5. Korrelatsiooni koefitsientide järgi on erinevate meetoditega saadud kontsentratsioonide muutused omavahel tugevas lineaarses seoses.

Tabel 5. Erinevate meetoditega määratud kontsentratsioonide korrelatsiooni koefitsiendid.

Korrelatsiooni koefitsient	UV ₂₅₄	RP-HPLC	SEC	DOC
UV ₂₅₄	-	0,977	0,987	1,000
RP-HPLC	0,977	-	0,959	0,977
SEC	0,987	0,959	-	0,987
DOC	1,000	0,977	0,987	-

3.5 DOM-i iseloomustamine kasutades UV-Vis spektroskoopiat

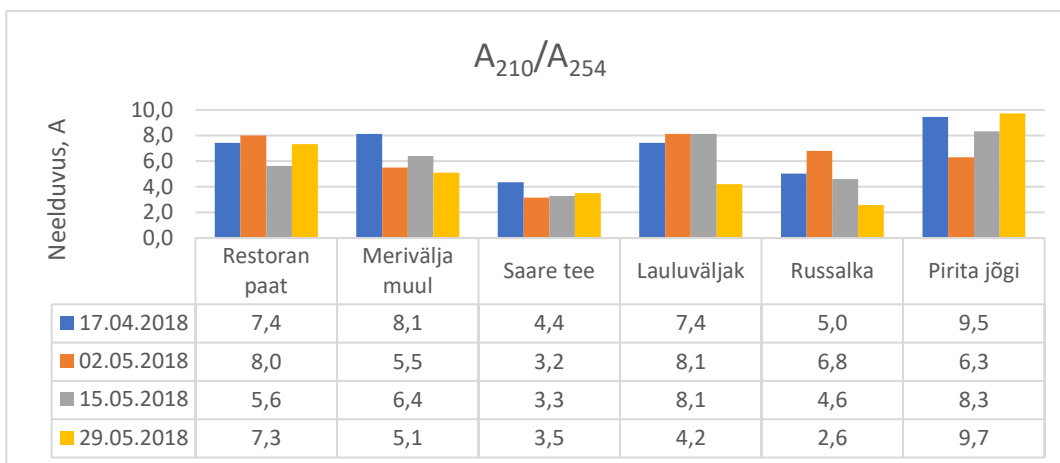
DOM on optiliselt aktiivne, mistõttu on teda võimalik erinevate optiliste meetoditega määrata. Rannikuveeproovide neeldumisspekter sarnanes punktis 1.4 kirjeldatud DOM-i neeldumisspektrile (joonis 10).



Joonis 10. DOM-i UV-Vis neeldumisspektri näide Pirita jõgi 15.05.18

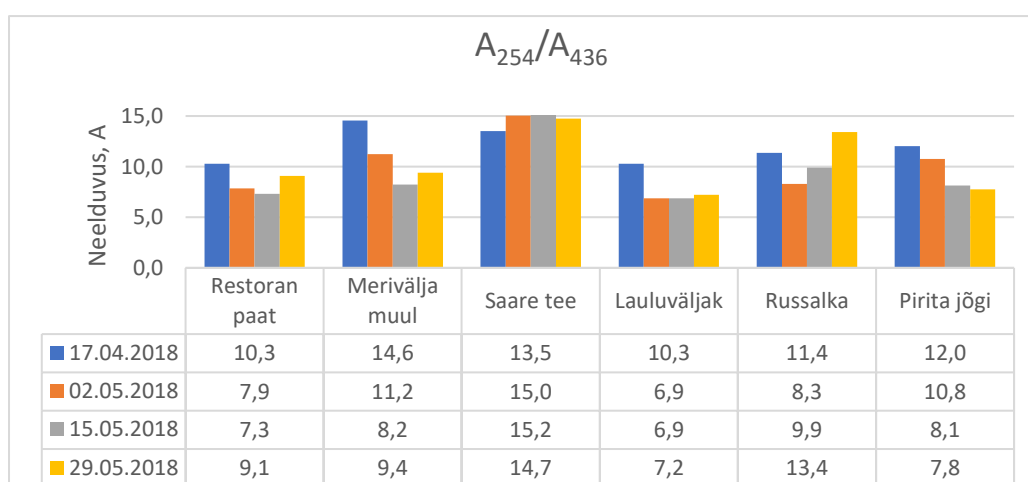
DOM-i struktuur ja omadused on varieeruvad sõltuvalt keskkonnast ning enda päritolult, mistõttu saab kasutada optilise tiheduse suhteid DOM-i erinevate omaduste hindamiseks. Optilised tihedused suhte arvutamiseks sai määratud lainepikkustel 205, 210, 254, 280, 350, 436, 470 ja 665 nm.

A_{210}/A_{254} suhte väärtused jäid kõikides Tallinna Lahe veeproovides 2-10 vahele. Russalka ja Saare tee veeproovides esines madalaid A_{210}/A_{254} suhte väärtusi, viidates sellele, et antud veeproovides esines makromolekule, millel on teistest veeproovidest kõrgem aromaatsus. Kõrge aromaatsusega humiainete A_{210}/A_{254} väärtused jäävad 1,6 juurde. Samad suhte väärtused madala aromaatsusega valkudel jäävad 13,5 lähedusse. [44] Kuna DOM ei koosne ainult aromaatsetest humiainetest, siis on loogiline, et tema A_{210}/A_{254} suhte väärtused on humiainete omast kõrgemad. Rannikuvee proovidest kõrgemaid väärtusi esines Pirita jõe, Lauluvaljaku, Merivälja ja restoran Paat piirkonnas.



Joonis 11. Laine pikkuste A_{210}/A_{254} sõltuvus proovivõtu asukohast ja ajast.

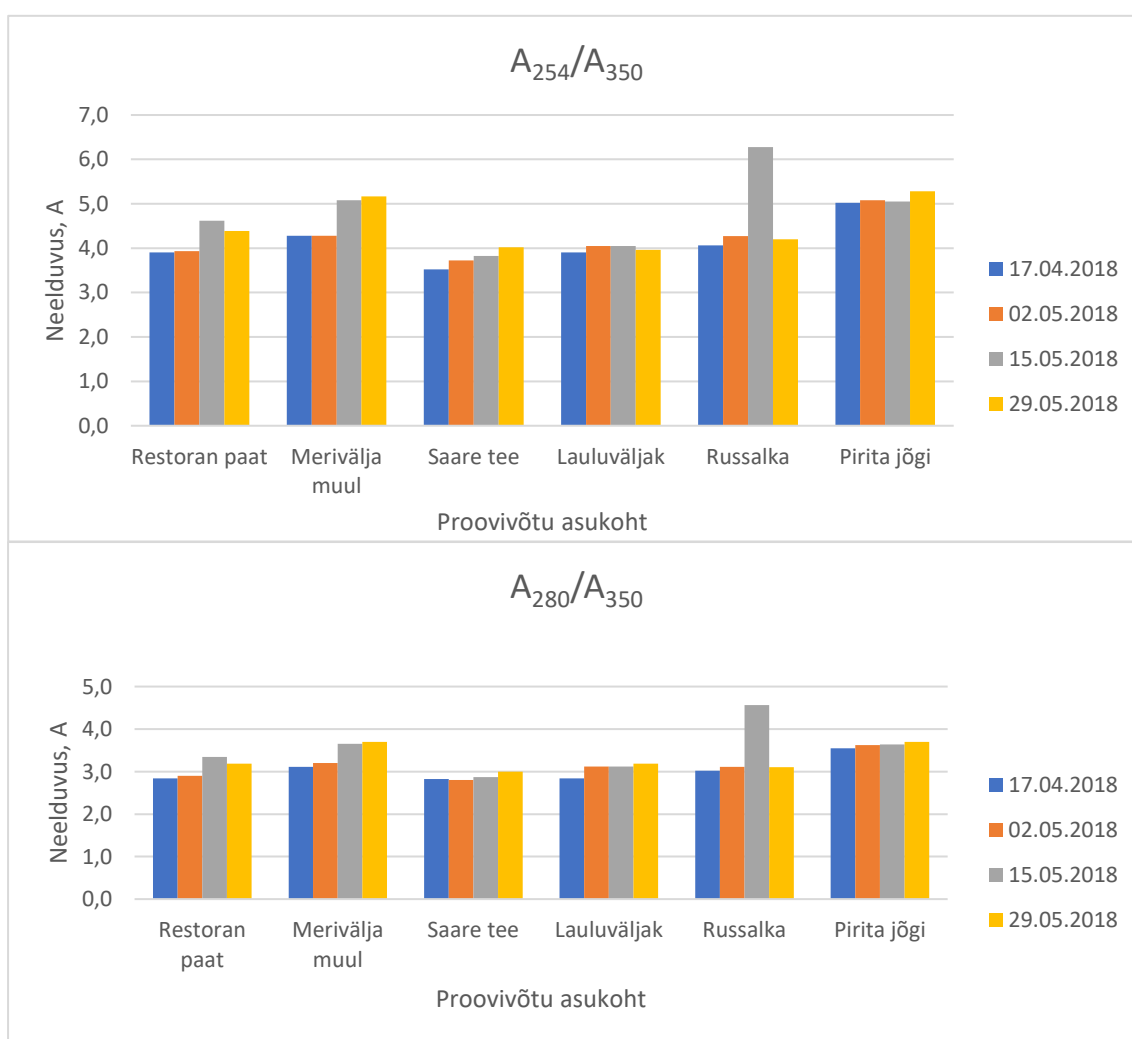
A_{254}/A_{436} suhte väärtused jäid Tallinna lahe proovidel 6-16 vahele, kuna maiset/allohtonset päritolu looduslikule DOM-ile on iseloomulikud 4-14 A_{254}/A_{436} suhte väärtused. [44] Sellest võib järeldada, et enamus lahustunud orgaanilisest ainest Tallinna lahe ranniku vees on pärit maismaalt. 17.04.18 Merivälja ja kõikides Saare tee veeproovides esines kõrgemaid A_{254}/A_{436} väärtusi, mis võib viidata kõrgeenenud mikroobide tegevusele antud piirkonnas. Saare tee proovi võtukohas oli tunda ka kohapeal halba lõhna.



Joonis 12. Laine pikkuste A_{254}/A_{436} sõltuvus proovivõtu asukohast ja ajast.

Molekulmassi ja aromaatsuse hindamiseks kasutatakse suhet A_{254}/A_{350} ja A_{280}/A_{350} . Molekulmass kasvab A_{254}/A_{350} väärtuse langemisega ehk siis mida suurem saadud suhte väärtus, seda väiksem on molekulmass. Humiainete lahuste puhul on täheldatud väärtustele 4,5 ja 5,7 on molekulmass vastavalt 3380 Da ja 1180 Da. [46] Tallinna lahe veeproovide lahuste väärtused A_{254}/A_{350} jäävad 3,5 ja 6,2 vahele. Kõige väiksema molekulmassiga on Russalka vee orgaaniline aine, mis eristub märkimisväärselt teistest proovivõtu kohtadest ning kuupäevadest oma kõrge A_{254}/A_{350} suhte väärtusega. Kui võrrelda molekulmassi muutust ajas, siis pigem püsivad molekulmassid samad või esines kuupäevade muutumisega molekulmassi langust.

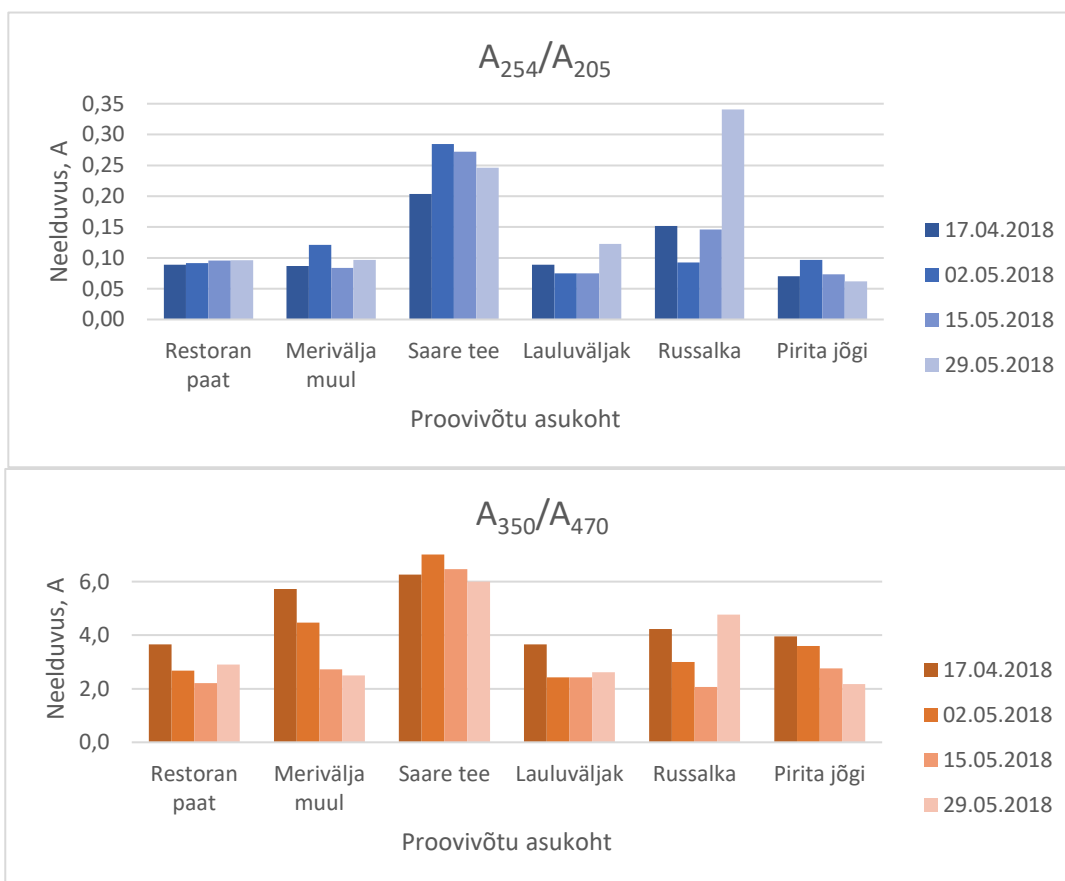
Sarnaseid muutusi võis märgata ka A_{280}/A_{350} suhte väärtuste puhul, mis näitab aromaatsete süsinike kogusisaldust DOM-is. Lainepikkusi 280 ja 254 nm kasutatakse tihti DOM-i kvantitatiivseks hindamiseks, mistõttu on loogiline, et neelduvuste muutused mõlema lainepikkuse juures sarnased on.



Joonis 13. Lainepikkuste suhete A_{280}/A_{350} ja A_{254}/A_{350} sõltuvus proovivõtu kohast ja ajast.

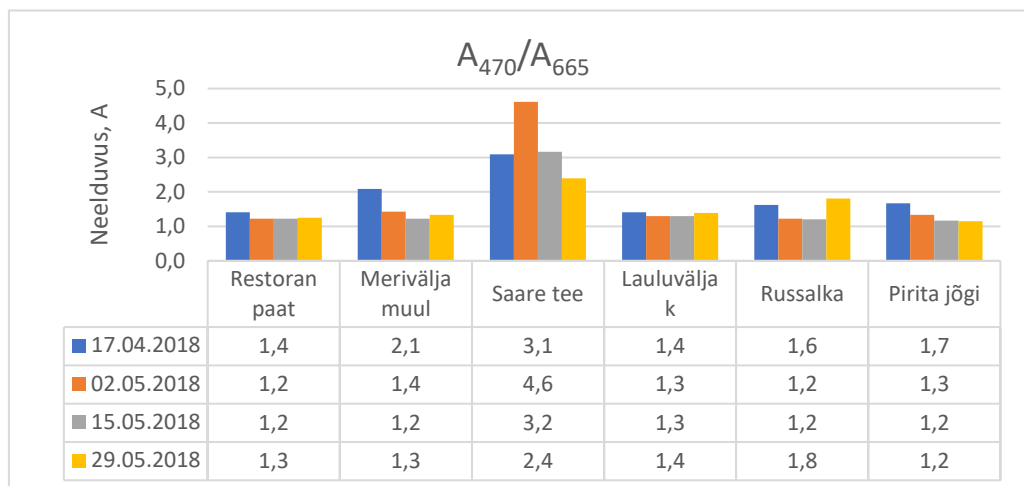
Pirita jõe, Lauluväljaku, Restoran paat ning Merivälja muuli juurest võetud veeproovide A_{254}/A_{205} suhted jäid $<0,1$ või selle lähedusse, viidates sellele, et DOM-i aromaatsed tsüklid on peamiselt asendatud alifaatsete funktsionaalsete rühmadega. Kõrgemaid A_{254}/A_{205} suhteid esines Saare tee ja 29.05.18 Russalka veeproovides, mis tähendab, et antud piirkonnas DOM-is esines rohkem aromaatsed tsükleid, mis sisaldas asendatud hüdroksüül, karbonüül, estri ja karboksüül rühmi ning olles nii ka reaktsiooni võimelisemad.

Kui võrrelda A_{254}/A_{205} suhteid A_{350}/A_{470} suhetega, mis iseloomustas UV-nähtava valguse piirkonnas neelduvaid funktsionaalrühmi, siis on näha sarnasusi antud suhete väärtustes. Mõlemal parameetril esineb kõrgemaid väärtusi kõikides Saare tee ja Russalka 29.05.18 proovides, toetades nii teooriat, et antud asukohtades oli rohkem aromaatsed süsinike, hüdroksüül- ja karboksüül rühmi. Selliste keemiliste omadustega orgaaniline aine viitab tema päritolule pinnasest. Kahte suhet võrreldes saab täheldada, et märgatavateks erinevusteks on 17.04.18 kuupäeva Merivälja ja Lauluväljaku ja Pirita jõe proovid, kus suhte A_{254}/A_{205} järgi sisaldab DOM rohkem alifaatsete rühmi, kuid A_{350}/A_{470} suhte kohaselt, sisaldavad veeproovid UV ja nähtava valguse piirkonnas absorbeeruvaid rühmi.



Joonis 14. A_{254}/A_{205} ja A_{350}/A_{470} suhete sõltuvused proovivõtu kohast ja ajast.

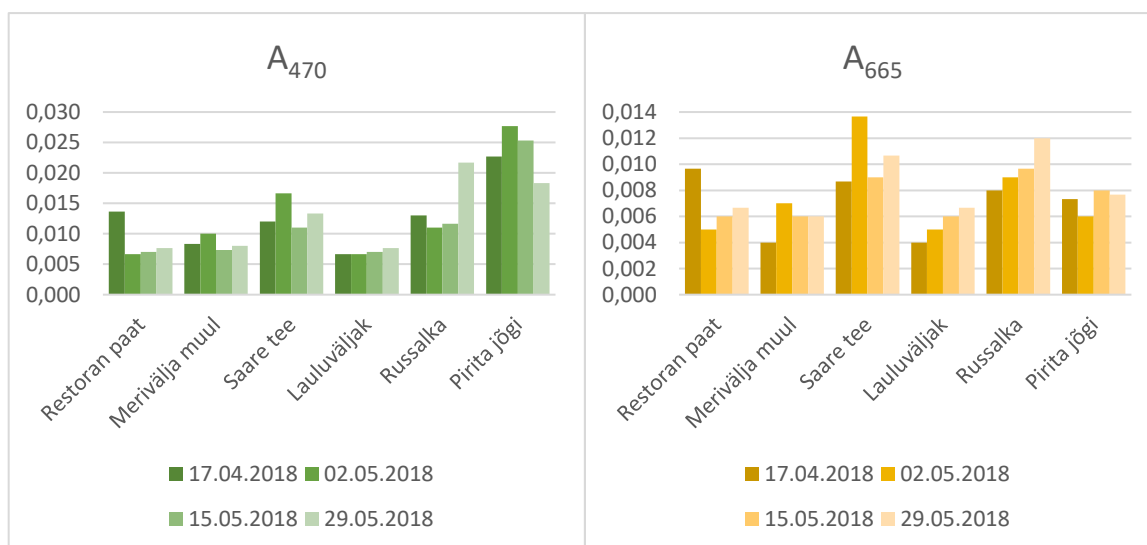
Kui vaadelda joonist 15, siis näeme, et ka siin eristub Saare tee proovikoht selgelt teistest, omades teistest märgatavalt kõrgemat A_{470}/A_{665} väärtust, viidates nii madalale kondensatsiooni ja humifitseerimis astmele. Kui teistes proovi kohtades jäävad väärtused kogu mõõtmisperioodi vältel suhteliselt muutumatuks 1-2 vahele, siis Saare tee 2. mai proovis küündivad A_{470}/A_{665} suhte väärtused lausa 4,6 ni.



Joonis 15. A_{470}/A_{665} suhte sõltuvus proovivõtu ajast ja kohast.

Vaadeldes 470 nm juures mõõdetud optilisi tihedusi, siis on jooniselt näha, et Pirita jõe veeproovides esineb kõrgemaid väärtusi. Sellest võib järeldada, et võrreldes teiste proovi kohtadega on tegemist humifitseerimis protsessi alguses oleva orgaanilise ainega. Kõrgemaid 470 nm neelduvuse väärtusi leidub ka 29.05.18 Russalka ja 02.05.18 Saare tee proovis. Kõikidest proovikohtadest kõige madalamat A_{470} väärtusi esines Lauluväljaku juures.

A_{665} viitab hästi humifitseerunud orgaanilisele ainele, millel on palju aromaatsid ja kondenseerunud rühmi. Jällegi eristub teistest proovidest oma kõrgete väärtustega Saare tee proovivõtu koht. Kõrgemaid väärtusi esineb ka restoran Paat ja Russalka proovi võtukohtade juures.



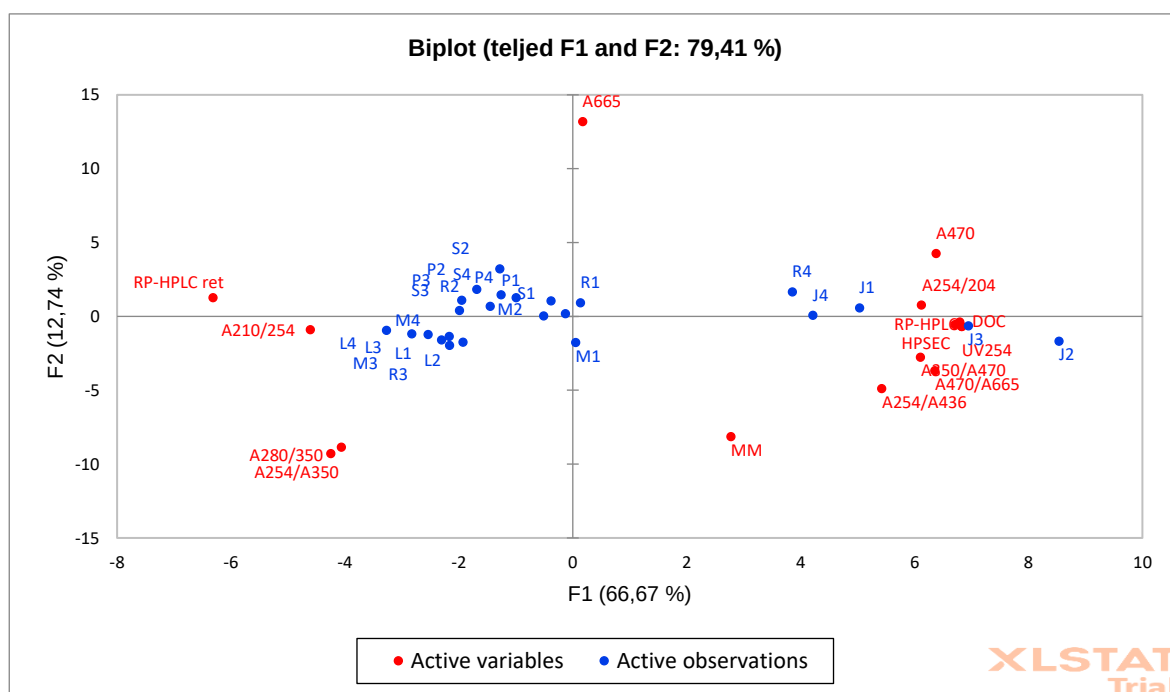
Joonis 16. Lainepikkuste A_{470} ja A_{665} sõltuvus proovivõtu kohast ja ajast.

Kõiki saadud eksperimentaalseid andmeid omavahel võrreldes sai täheldatud, et kõikide proovivõtu kohtade 17.04.18 kuupäeva proovides esines kõrgemaid A254/A436, A350/A470 ja A470/A665 väärtusi. Sellest saab järeldada, et antud kuupäeval oli suurem bakterite aktiivsus ning DOM sisaldas rohkem UV-Vis neelduvaid rühmi ning madalamat kondensatsiooni astet.

3.6 UV-Vis spektrofotomeetria ja kromatograafiliste tulemuste võrdlus

3.6.1 Peakomponentide analüüs

Selleks, et UV-Vis spektrofotomeetria ja kromatograafilistest tulemustest kergemini järeldusi teha, kasutati andmetetöötlemiseks Exceli Add-in-i XLSTAT. Antud Exceli lisaga teostati peakomponentide analüüs lootes leida seoseid erinevate proovivõtu kohtade, aegade ning määratud omaduste vahel.



Joonis 17. Proovi andmete peakomponentide analüüs. Proovide tähistamiseks kasutati numbrit ja tähe kombinatsioone: L- Lauulväljak, M-Merivälja muul, P-Restoran Paat, J- Pirita Jõgi, R- Russalka, S-Saare tee. 1- 17.04.18, 2- 02.05.18, 3- 15.05.18, 4- 29.05.18.

PCA analüüsi järgi on näha, et erinevate meetoditega mõõdetud kontsentratsioonid on koondunud üksteise peale „biplot“-il F1 positiivsete ja F2 negatiivsete väärtuste sektorisse, mis on ka loogiline. Peatükis 3.4 on väljatoodud ka erinevate kontsentratsioonide omavahelised korreleerumiskoeffitsendid. Ühte piirkonda on koondunud parameetrid A₂₅₄/A₂₀₅, A₄₇₀, A₂₅₄/A₄₃₆, A₄₇₀/A₆₆₅ ning A₃₅₀/A₄₇₀. F1 muutuja positiivsesse osasse olid koondunud parameetrid, mis olid enamuse seotud aromaatsusega.

PCA „biploti“ F1 ja F2 negatiivses osas on väärtused, mis on pigem negatiivses korrelatsioonis aromaatsusega. A₂₁₀/A₂₅₄ ja A₂₅₄/A₂₀₅ asuvad telgedel üksteisest umbes 180° nurga all. Lainepikkused A₂₁₀ ja A₂₀₅ asuvad spektril üksteisele väga lähedal, mistõttu võib lugeda A₂₁₀/A₂₅₄ suhet parameetri A₂₅₄/A₂₁₀ pöördväärtuseks. Tulemused on lähedased ka A₂₅₄/A₃₅₀ ja A₂₈₀/A₃₅₀

parameetritel, mis tähendab, et tulevikus piisab DOM-i kirjeldamiseks valikuliselt ainult ühest. Mõlemad väärtused kirjeldavad aine aromaatsust ja molekulmassi suurust.

Kui võrrelda oma vahel erinevaid Tallinn lahe proove, siis selget grupeerumist asukohtade ja kuupäevade vahel enamuses proovides näha ei ole. Ainukesena on asukoha järgi grupeerunud erinevatel kuupäevadel võetud Pirita jõe veeproovid (J1, J2, J3, J4). PCA analüüsi järgi tulid kõrgemad kontsentratsioonid ning suuremad polaarsused kõikides Pirita jõe veeproovides ning Russalka 29.05.18 (R4) proovis, mida nad ka eksperimentaalsete tulemuste järgi tulid. Üksteise lähedikkust paigutumist võib märgata ka Lauluväljaku proovidel. „Biplot-i“ andmetel on tegu vähem aromaatsuste ühenditega. PCA analüüsil ei ole märgata süstemaatilist muutust kuupäevade lõikes. Lisaks pole jooniselt ka näha Saare tee ja 29.05.18 Russalka proovipunktide eristumist, mida iga parameetri eraldi analüüsimisel märgata oli.

3.6.2 Eksperimentaalsete tulemuste võrdlus kirjanduses leiduvate andmetega

Eestis DOM-i ega DOC-i kontsentratsiooni otseselt ei määrata, mistõttu oli raske leida võrdlusandmeid. Peamiselt hinnatakse Eestis orgaanilise aine kontsentratsiooni kaudsete näitajate nagu BHT või satelliitinfo töötlemisel. [53] 2000. aastal kasutati UV-Vis spektroskoopia lainepikkust 254 nm Tallinna lahes ja Pirita jões HS kontsentratsiooni määramiseks. Tol hetkel saadi HS kontsentratsiooniks Tallinna lahes 0,2-0,4 mg/L ja Pirita jões 0,8-1,1 mg/L. [54] Antud töös olid kõik UV₂₅₄ nm saadud kontsentratsioonid märgatavalt suuremad kui 19 aastat tagasi viidates sellega märgatavalt DOM-i kontsentratsiooni suurenemisele.

Orgaanilise aine kontsentratsiooni seiret on teostatud Soome lahe ranniku alalt. 1985-2010 vahemikus on TOC-i kontsentratsioon jäänud 3-6 mg/L vahemikus. Kõrgemaid väärtusi esines jõe suudmetes, kus TOC-i kontsentratsioon ulatus kuni 31 mg/L. [55]

Eestis on kõige hiljutisemaid mõõtmisi tehtud Saare tee, Lauluväljaku ja Russalka sademevee toru väljavoolust. 2017 aastal saadi keskmisteks üldise orgaanilise süsiniku (TOC-i) tulemusteks vastavalt eelnimetatud kohtadele 9,9 mg/L, 6,3 mg/L ja 12,6 mg/L. Antud uuringus hinnati saadud tulemused vee elukondliku reoveega reostumise seisukohalt suhteliselt madalaks. [3] Lahustunud orgaaniline süsinik (DOC), mida kasutatakse tihti loodusliku DOM-i kontsentratsiooni surrogaadina, moodustab umbes 80-90% TOC-ist. [6] Kui võrrelda DOC-i arvutamisel sademevee toru väljavoolust saadud TOC-i väärtustega, siis võiks hinnata enamuses tabelis roheliselt või valgelt värvunud proovi punktide kontsentratsioonid madalaks. Kui võtta arvesse kalibreerimisgraafikutega määratud kontsentratsioonide tulemused, siis võiks tabelis roheliselt värvunud kontsentratsioone hinnata pigem keskmiseks või madalaks, valgeid keskmisteks või kõrgeteks ning punaseid väga kõrgeteks kontsentratsioonideks.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli iseloomustada ja kvantifitseerida lahustunud orgaanilist ainet Tallinna lahe äärses rannikumere veeproovides. Hinnata lahustunud orgaanilise aine seire vajalikust Tallinna lahe vees. Uuriti veeproove, mis sai võetud 6. erinevast kohast Tallinna lahe rannikult ning 4 erineval kuupäeval. Veeproovide analüüsiks kasutati vedelikkromatograafia aparatuuri koos eksklusioonkromatograafia ja pööratud faasi kolonni ning diod-maatriks detekteerimisega. UV-Vis spektrofotomeetria kasutati analüüdi neeldumissuhete määramiseks erinevatel ultraviolet- ja nähtava valguse kiirguse lainel. Neeldumissuhteid kasutati lahustunud orgaanilise aine erinevate omaduste hindamiseks.

Pööratud faasi kromatograafia kromatogrammide analüüsi kasutati lahustunud orgaanilise aine polaarsuse hindamiseks. Selgus, et kõige polaarsemad lahustunud orgaanilise aine ühendid leidsid Pirita jõe ja 29.05.18 Russalka proovis. Nendes proovides oli analüüt lahustunud kaheks hüdofiilseks ja hüdfoobseks osaks. Teistes Tallinna lahe proovides esines peamiselt üks hüdfoobsem piik.

Molekulmassi määramiseks kalibreeriti HPSEC süsteemi erinevate molekulmassidega polüstüreensulfonaatide lahustega. Kõige kõrgema lahustunud orgaanilise aine molekulmassiga tulemused tulid Pirita jõe 15.05.18 ja 02.05.18 proovides. Ülejäänud veeproovides jäid tulemused peamiselt 1500-2100 Da vahemikku. Süsteemset muutust proovide molekulmassides märgata ei olnud.

Lahustunud orgaanilise aine kvantitatiivseks määramiseks kalibreeriti RP-HPLC, HPSEC ja UV-Vis spektrofotomeetria aparatuure erinevate kontsentratsioonidega loodusliku orgaanilise aine standardlahustega. Lisa kontsentratsiooni määramise meetodina kasutati lahustunud orgaanilise süsiniku arvutamise valemit. Lahustunud orgaanilist süsinikku kasutatakse tihti lahustunud orgaanilise aine kontsentratsiooni surrogaadina. Üldiselt olid kontsentratsioonid teiste kirjanduses leiduvate andmetega võrreldes kõrgemad. Kõikide kasutatud kontsentratsiooni mõõtmiste meetoditega tulid kõrged kontsentratsioonid Pirita jõe ja 29.05.18 Russalka veeproovides. Kõrged kontsentratsioonid olid tõenäoliselt põhjustatud valgalt pinnasesse leostuvast orgaanilisest materjalist kuid ka väetises kasutatavast fulvohappest. Sõltuvalt kuupäevast oli märgata kontsentratsioonide kõikumisi. Huvitava seaduspärasusena leidsid kõikides proovipunktides 17.04.18 kuupäeval teistest päevadest veidikene kõrgemat kontsentratsiooni.

UV-Vis spektroskoopia meetodit kasutati lahustunud orgaanilise aine omaduste hindamiseks. Selleks määrati ainete neelduvused ja nende suhted lainepikkustel: 205, 210, 254, 280, 350, 436, 470, 665. Neelduvussuhete analüüsimisel selgus, et kõik Tallinna lahe rannikuvee proovid olid allohtoonset päritolu. Saare tee ja 17.04.18 kuupäeva Merivälja muuli juurest võetud proovides võis esineda ka mikroobset päritolu lahustunud orgaanilist ainet., kuid siiski oli tegemist peamiselt maismaalt pärit oleva orgaanilise ainega. Optilise tiheduse suhte põhjal võis järeldada, et Saare tee ja 29.05.18 kuupäeva Russalka proovid sisaldasid rohkem UV-Vis valgust neelavaid funktsionaalrühmi ning olid suurema aromaatsusega. Lauluvaljaku proovipunkt paistis silma oma madala aromaatsusega orgaanilise aine poolest.

Antud töö tulemusena ei olnud võimalik kõikide muutuste põhjuslikkuse või seaduspärasuse kohta järeldusi teha. Silma paistis Russalka proovivõtu koht, kus viimasel proovivõtu päeval toimus suur kontsentratsiooni ja omaduste muutus. Selleks, et paremini aru saada, millest see muutus tingitud võis olla oleks mõistlik rakendada pikemaajalist lahustunud orgaanilise aine seiret. Seire tulemusena tuleks välja ka lahustunud orgaanilise aine kontsentratsiooni ja omaduste muutus sõltuvalt aastaajast ning tõenäoliselt annaks ka paremat aimu selle allikate kohta. Lahustunud orgaanilise aine omaduste uurimine annaks märku kui on toimunud, mõni suurem muutus lahustunud orgaanilise aine omadustes. See võimaldab tulevikus paremini kindlaks määrata võimalikke lahustunud orgaanilise aine tekke allikaid, mida on väikse vaatlusperioodi puhul keerulisem leida.

UV-Vis spektrofotomeetria kasutamisel lahustunud orgaanilise aine seirel soovitaksin kasutada lainepikkust 254 nm kontsentratsiooni hindamiseks ning suhteid A_{254}/A_{350} (aromaatse süsiniku ja molekulmassi hindamiseks), A_{254}/A_{436} (orgaanilise aine päritolu hindamiseks) ja A_{470}/A_{665} (humifitseerumisastme hindamiseks). Antud lainepikkuste suhted katavad suuremalt osalt ära peamised lahustunud orgaanilise aine omadused, mida antud töös põhjalikult määratud sai.

Kasutatud kirjandus

- [1] Paalme T. Tallinna lahe rannikumere seisundi hinnang bioloogiliste indikaatorite alusel aruanne. Tallinn: 2012.
- [2] Gromova J, Ruiso K, Ruubel A, Annus A, Zahharov A. Pirita ranna suplusvee profiil. Tallinn: 2012.
- [3] Künnis-Beres K. Tallinna lahe seisundi parandamise meetmete katsetamine ja mõju hindamine. Tallinn: 2017.
- [4] Pachel K, Ütt M, Piirsalu A, Koor M. Tallinna lahe keskkonnaseisundi parandamise teostatavusuuringu eskiisprojekti koostamine. Tallinn: 2015.
- [5] Nebbioso A, Piccolo A. Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review. *Anal Bioanal Chem* 2013;405:109–24. doi:10.1007/s00216-012-6363-2.
- [6] Crittenden, John C. Trussell, R. Rhodes Hand, David W. Howe KJ. *MWH's Water Treatment - Principles and Design*. 3rd tr. John Wiley & Sons; 2012.
- [7] Sillanpää M. *Natural Organic Matter in Water*. 2015. doi:10.1016/c2013-0-19213-6.
- [8] Mostofa KMG, Liu C, Mottaleb MA, Wan G, Ogawa H, Vione D, et al. *Dissolved Organic Matter in Natural Waters*. Mostofa KMG, Yoshioka T, Mottaleb A, Vione D, toimetajad. *Photobiogeochemistry Org. Matter Princ. Pract. Water Environ.*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013, lk 1–137. doi:10.1007/978-3-642-32223-5_1.
- [9] Singh BK, Bardgett RD, Smith P, Reay DS. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:779–90. doi:10.1038/nrmicro2439.
- [10] Bloomfield JP, Williams RJ, Gooddy DC, Cape JN, Guha P. Impacts of climate change on the fate and behaviour of pesticides in surface and groundwater—a UK perspective. *Sci Total Environ* 2006;369:163–77. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.05.019.
- [11] Sjerps RMA, ter Laak TL, Zwolsman GJJG. Projected impact of climate change and chemical emissions on the water quality of the European rivers Rhine and Meuse: A drinking water perspective. *Sci Total Environ* 2017;601–602:1682–94. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.250.
- [12] Whitehead PG, Wilby RL, Battarbee RW, Kernan M, Wade AJ. A review of the potential impacts of climate change on surface water quality. *Hydrol Sci J* 2009;54:101–23. doi:10.1623/hysj.54.1.101.
- [13] Paul VJ. *Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms*. *Cyanobacterial Harmful Algal Bloom. State Sci. Res. Needs*, New York, NY: Springer New York; s.a., lk 239–57. doi:10.1007/978-0-387-75865-7_11.
- [14] Chapra SC, Boehlert B, Fant C, Bierman VJ, Henderson J, Mills D, et al. *Climate Change Impacts on Harmful Algal Blooms in U.S. Freshwaters: A Screening-Level Assessment*.

- Environ Sci Technol 2017;51:8933–43. doi:10.1021/acs.est.7b01498.
- [15] Bertilsson S, Tranvik LJ. Photochemical transformation of dissolved organic matter in lakes. *Limnol Oceanogr* 2000;45:753–62. doi:10.4319/lo.2000.45.4.0753.
 - [16] Kelton N, Molot LA, Dillon PJ. Effect of ultraviolet and visible radiation on iron lability in boreal and artificial waters. *Aquat Sci* 2007;69:86–95. doi:10.1007/s00027-006-0869-7.
 - [17] Shiller AM, Duan S, van Erp P, Bianchi TS. Photo-oxidation of dissolved organic matter in river water and its effect on trace element speciation. *Limnol Oceanogr* 2006;51:1716–28. doi:10.4319/lo.2006.51.4.1716.
 - [18] Kallenborn R, Halsall C, Dellong M, Carlsson P. The influence of climate change on the global distribution and fate processes of anthropogenic persistent organic pollutants. *J Environ Monit* 2012;14:2854. doi:10.1039/c2em30519d.
 - [19] Ripszam M, Paczkowska J, Figueira J, Veenaas C, Haglund P. Dissolved Organic Carbon Quality and Sorption of Organic Pollutants in the Baltic Sea in Light of Future Climate Change. *Environ Sci Technol* 2015;49:1445–52. doi:10.1021/es504437s.
 - [20] Kosobucki P, Buszewski B. Natural organic matter in ecosystems - A review. *Nov Biotechnol Chim* 2014;13:109–29. doi:10.1515/nbec-2015-0002.
 - [21] Paul A, Hackbarth S, Vogt RD, Röder B, Burnison BK, Steinberg CEW. Photogeneration of singlet oxygen by humic substances: comparison of humic substances of aquatic and terrestrial origin. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:273–80. doi:10.1039/B312146A.
 - [22] Thurman EM. *Organic Geochemistry of Natural Waters*, Dordrecht: Springer Netherlands; 1985, 1k 273–361. doi:10.1007/978-94-009-5095-5.
 - [23] Peuravuori J. NMR spectroscopy study of freshwater humic material in light of supramolecular assembly. *Environ Sci Technol* 2005;39:5541–9. doi:10.1021/es05034li.
 - [24] Peuravuori J, Bursáková P, Pihlaja K. ESI-MS analyses of lake dissolved organic matter in light of supramolecular assembly. *Anal Bioanal Chem* 2007;389:1559–68. doi:10.1007/s00216-007-1553-z.
 - [25] Piccolo A, Conte P. Molecular size of humic substances. Supramolecular association versus macromolecular polymers. *Adv Environ Res* 3 2000:508–21.
 - [26] Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci* 2001;166:810–32.
 - [27] Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron*, vol. 75, 2002, 1k 57–134. doi:10.1016/S0065-2113(02)75003-7.
 - [28] Lepane V, Tönno I, Alliksaar T. HPLC approach for revealing age-related changes of aquatic dissolved organic matter in sediment core. *Procedia Chem* 2010;2:101–8. doi:10.1016/j.proche.2009.12.016.

- [29] Steinberg CEW. Ecology of Humic Substances in Freshwaters. Springer Berlin Heidelberg; 2003.
- [30] Demirel-Uyguner C, Bekbolet M, Swietlik J. Natural organic matter : Definitions and characterization. Control Disinfect By-Products Drink Water Syst 2007;253–77.
- [31] Rodríguez FJ, Núñez LA. Characterization of aquatic humic substances. Water Environ J 2011;25:163–70. doi:10.1111/j.1747-6593.2009.00205.x.
- [32] Lepane V, Depret L, Väli A-L, Suursööt K. Impact of seasonal climate change on optical and molecular properties of river water dissolved organic matter by HPLC-SEC and UV-vis spectroscopy. Chem Biol Technol Agric 2015;2:14. doi:10.1186/s40538-015-0040-6.
- [33] Lepane V, Leeben A, Malashenko O. Characterization of sediment pore-water dissolved organic matter of lakes by high-performance size exclusion chromatography. Aquat Sci - Res Across Boundaries 2004;66:185–94. doi:10.1007/s00027-004-0703-z.
- [34] Harris DC. Quantitative Chemical Analysis. 8. tr. New York: W.H. Freeman and Company; 2010.
- [35] Petrova OE, Sauer K, Biofilm B. High-Performance liquid chromatography (HPLC)-based detection and quantitation of cellular c-di-GMP. Methods Mol Biol 2017;33–43. doi:10.1007/978-1-4939-7240-1_4.
- [36] Harvey D. Modern Analytical Chemistry. Boston, Burr Ridge, IL, Dubuque, IA, Madison, WI, New York, San Francisc, St. Louis, Bangkok, Bogota, Caracas, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, Seoul, Singapore, Sydney, Taipei, Toronto: The McGraw-Hill Companies, Inc.; 2000.
- [37] Kealey D, Haines PJ. Analytical Chemistry. Farham: Bios Scientific Publishers Limited; 2002.
- [38] Kaljurand M, Kuldvee R. Instrumentaalanalüüs III. Tallinn: TTÜ; 1997.
- [39] Ham BM, Maham A. Analytical Chemistry: A Chemist and Laboratory Technician's Toolkit. New Jersey: John Wiley & Sons; 2016.
- [40] Meyer VR. Practical High-Performance Liquid Chromatography. 4th tr. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons; 2004.
- [41] Mori, S. , Barth HR. Size-Exclusion Chromatography. New York: Springer Berlin Heidelberg; 1999.
- [42] Aaron J-J, Abel PU, Achterberg EP, Adams F, Adams MJ, Adeloju SB, et al. Spectrophotometry. Encycl. Anal. Sci., Elsevier Ltd; 2005, lk 318–21.
- [43] Wang GS, Hsieh ST. Monitoring natural organic matter in water with scanning spectrophotometer. Environ Int 2001;26:205–12. doi:10.1016/S0160-4120(00)00107-0.
- [44] Rodríguez FJ, Schlenger P, García-Valverde M. Monitoring changes in the structure and properties of humic substances following ozonation using UV-Vis, FTIR and ¹H NMR

techniques. *Sci Total Environ* 2016;541:623–37. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.127.

- [45] Bikovens O, Lepane V, Makarõtsheva N, Dizhbite T, Telysheva G. The Complementary Use of UV, EPR and SEC to Study the Structural Changes of Humic Substances During Wood Waste Composting. Xu J, Wu J, He Y, toimetajad. *Funct. Nat. Org. Matter Chang. Environ.*, vol. 9789400756, Dordrecht: Springer Netherlands; 2013, lk 113–7. doi:10.1007/978-94-007-5634-2_20.
- [46] Ilina SM, Yu O, Lapitskiy SA, Alekhin Y V, Demin V V, Zavgorodnyaya YA, et al. Size fractionation and optical properties of dissolved organic matter in the continuum soil solution-bog-river and terminal lake of a boreal watershed. *Org Geochem* 2014;66:14–24. doi:10.1016/j.orggeochem.2013.10.008.
- [47] Enev V, Pospíšilová L, Klučáková M, Liptaj T, Doskočil L. Spectral characterization of selected humic substances. *Soil Water Res* 2014;9:9–17.
- [48] Purmalis O, Klavins M, Maris Klavins C, Chem H. Comparative study of peat humic acids by using UV spectroscopy. *1st Annu Int Interdiscip Conf* 2013:24.
- [49] Arnvidarson B. PhD Thesis. Copenhagen University, 1986.
- [50] Jokubauskaitė I, Amaleviciute K, Lepane V, Slepeliene A, Slepetyš J, Liaudanskiene I, et al. High-performance liquid chromatography (HPLC)-size exclusion chromatography (SEC) for qualitative detection of humic substances and dissolved organic matter in mineral soils and peats in Lithuania. *Int J Environ Anal Chem* 2015;95:1–12. doi:10.1080/03067319.2015.1048435.
- [51] Addinsoft X by. Principle Component Analysis 2017. <https://www.xlstat.com/en/solutions/features/principal-component-analysis-pca> (vaadatud 26. mai 2018).
- [52] Kabral K. Veest lahustunud orgaanilise aine analüüs tahke faasi ekstraksiooni ja pööratud faasi HPLC meetoditega Maardu järve näitel. Tallinna Tehnikaülikool, 2017.
- [53] Instituut EM. Eesti mereala keskkonnaseisundi esialgne hindamine. 2016.
- [54] Lepane V. Characterisation of humic substances from Estonian waters by capillary electrophoresis. *Nord IHSS Symp Humic Subst Characterisation, Dynamics, Transp Eff* 2001:33–8.
- [55] Fleming-lehtinen V, Räsänen A. Organic Carbon Concentration in the Northern Coastal Baltic Sea between 1975 and 2011. *Estuaries and Coasts* 2015;38:466–81. doi:10.1007/s12237-014-9829-y.

Lisad

Lisa 1 Tallinna lahe rannikuvee RP-HPLC kromatogrammide andmed.

Kuupäev	Proovivõtu koht	Paralleel	1. piigi pindala, mAU	2. piigi pindala, mAU	1. piigi retentsiooniaeg, min	2. piigi, min	Kõrgeima piigi kõrgus
02.05. 2018	Pirita jõgi	1	1252,40	623,30	5,45	6,31	23,10
		2	926,00	718,20	5,61	6,43	15,70
		3	1044,90	573,50	5,69	6,39	16,10
		Keskvääratus	1074,43	638,33	5,58	6,38	18,30
		Standardhälve	165,19	73,51	0,12	0,06	4,16
15.05. 2018	Pirita jõgi	1	1164,60	537,20	5,55	6,63	13,70
		2	920,30	518,90	5,56	6,24	14,60
		3	960,20	525,40	5,57	6,26	15,50
		Keskvääratus	1015,03	527,17	5,56	6,38	14,60
		Standardhälve	131,06	9,28	0,01	0,22	0,90
17.04. 2018	Pirita jõgi	1	1009,40	394,50	5,71	6,39	19,10
		2	731,30	549,10	6,01	6,65	12,30
		3	702,90	414,80	6,23	6,77	10,20
		Keskvääratus	814,53	452,80	5,98	6,60	13,87
		Standardhälve	169,36	84,01	0,26	0,19	4,65
29.05. 2018	Pirita jõgi	1	295,90	655,30	6,01	7,42	3,00
		2	362,30	641,80	6,06	7,43	3,80
		3	402,40	647,60	6,14	7,45	4,00
		Keskvääratus	353,53	648,23	6,07	7,44	3,60
		Standardhälve	353,53	648,23	6,07	7,44	3,60
02.05. 2018	Lauluväljak	1	509,60		8,32		22,40
		2	526,50		8,35		24,30
		3	516,60		8,31		24,50
		Keskvääratus	517,57		8,33		23,73
		Standardhälve	8,49		0,02		1,16
15.05. 2018	Lauluväljak	1	364,40		8,10		21,10
		2	332,60		8,13		19,20
		3	328,10		7,57		17,30
		Keskvääratus	341,70		7,93		19,20

		Standar dhälve	19,79		0,32		1,90
17.04. 2018	Lauluvälj ak	1	402,50		8,39		20,20
		2	393,20		8,64		19,70
		3	397,90		8,63		20,80
		Keskvää rtus	397,87		8,55		20,23
		Standar dhälve	4,65		0,14		0,55
29.05. 2018	Lauluvälj ak	1	332,10		7,73		18,30
		2	334,20		7,67		18,10
		3	339,80		7,88		17,70
		Keskvää rtus	335,37		7,76		18,03
		Standar dhälve	3,98		0,11		0,31
02.05. 2018	Merivälja muul	1	583,80		8,18		27,40
		2	582,60		8,25		25,30
		3	595,20		8,31		26,80
		Keskvää rtus	587,20		8,24		26,50
		Standar dhälve	6,95		0,07		1,08
17.04. 2018	Merivälja muul	1	503,40		7,77		23,70
		2	491,10		7,88		25,30
		3	466,10		7,92		23,50
		Keskvää rtus	486,87		7,86		24,17
		Standar dhälve	19,01		0,07		0,99
15.05. 2018	Merivälja muul	1	383,30		8,18		20,20
		2	369,60		8,19		20,80
		3	358,60		8,17		20,00
		Keskvää rtus	370,50		8,18		20,33
		Standar dhälve	12,37		0,01		0,42
29.05. 2018	Merivälja muul	1	369,20		7,82		20,20
		2	375,60		7,82		20,60
		3	358,10		7,82		20,90
		Keskvää rtus	367,63		7,82		20,57
		Standar dhälve	8,85		0,00		0,35
02.05. 2018	Restoran Paat	1	541,60		7,96		20,10
		2	509,70		8,10		22,30

		3	491,70		8,84		22,10
		Keskväärtus	514,33		8,30		21,50
		Standar dhälve	25,27		0,47		1,22
15.05. 2018	Restoran Paat	1	630,30		8,06		29,40
		2	437,10		8,10		22,10
		3	405,00		8,15		21,10
		Keskväärtus	490,80		8,10		24,20
		Standar dhälve	121,87		0,05		4,53
17.04. 2018	Restoran Paat	1	527,80		7,62		23,00
		2	456,80		8,01		22,70
		3	439,80		7,99		22,00
		Keskväärtus	474,80		7,87		22,57
		Standar dhälve	46,68		0,22		0,51
29.05. 2018	Restoran Paat	1	521,90		7,33		23,90
		2	428,10		7,79		21,60
		3	394,80		7,80		21,20
		Keskväärtus	448,27		7,64		22,23
		Standar dhälve	65,91		0,27		1,46
02.05. 2018	Russalka	1	535,90		8,31		22,00
		2	400,50		7,65		18,30
		3	398,80		7,77		20,20
		Keskväärtus	445,07		7,91		20,17
		Standar dhälve	78,67		0,35		1,85
15.05. 2018	Russalka	1	444,20		7,55		22,50
		2	442,30		7,56		22,90
		3	445,30		7,58		23,20
		Keskväärtus	443,93		7,56		22,87
		Standar dhälve	1,52		0,02		0,35
17.04. 2018	Russalka	1	508,00		8,34		23,40
		2	484,00		8,44		24,70
		3	501,00		8,20		24,30
		Keskväärtus	497,67		8,33		24,13
		Standar	12,34		0,12		0,67

		dhälve					
29.05. 2018	Russalka	1	521,50	663,20	6,35	7,10	8,20
		2	364,90	708,50	6,40	7,06	5,20
		3	451,40	597,00	6,64	7,09	5,50
		Keskvää rtus	445,93	656,23	6,46	7,08	6,30
		Standar dhälve	78,44	56,08	0,15	0,02	1,65
02.05. 2018	Saare tee	1	585,40		8,25		26,30
		2	587,60		8,28		26,40
		3	582,50		8,28		25,20
		Keskvää rtus	585,17		8,27		25,97
		Standar dhälve	2,56		0,02		0,67
15.05. 2018	Saare tee	1	363,80		8,11		20,50
		2	379,60		8,14		21,70
		3	362,30		8,11		20,80
		Keskvää rtus	368,57		8,12		21,00
		Standar dhälve	9,58		0,02		0,62
17.04. 2018	Saare tee	1	453,20		7,48		27,70
		2	480,80		7,71		26,20
		3	474,40		7,79		26,20
		Keskvää rtus	469,47		7,66		26,70
		Standar dhälve	14,45		0,16		0,87
29.05. 2018	Saare tee	1	477,20		7,49		
		2	486,30		7,51		25,40
		3	493,00		7,59		25,80
		Keskvää rtus	485,50		7,53		25,60
		Standar dhälve	7,93		0,05		0,28

Lisa 2 Tallinna lahe rannikuvee HPSEC kromatogrammide andmed

Kuupäev	Proovivõtu koht	Paralleel	Pindala mAU	Kõige kõrgema piigi retentsiooniaeg, min	Kõrgeima piigi kõrgus
02.05.2018	Pirita jõgi	1	1561,10	15,34	13,20
		2	1261,00	15,34	11,20
		3	1364,70	15,30	12,30
		Keskväärtsus	1395,60	15,33	12,23
		Standardhälve	152,42	0,02	1,00
15.05.2018	Pirita jõgi	1	1227,30	15,50	11,20
		2	1279,90	15,54	11,80
		3	1210,60	15,51	11,00
		Keskväärtsus	1239,27	15,52	11,33
		Standardhälve	36,17	0,02	0,42
17.04.2018	Pirita jõgi	1	1103,60	16,06	9,90
		2	1041,30	16,16	9,40
		3	1106,00	16,25	9,80
		Keskväärtsus	1083,63	16,16	9,70
		Standardhälve	36,68	0,10	0,26
29.05.2018	Pirita jõgi	1	1172,20	16,14	7,90
		2	983,30	16,09	6,70
		3	1178,20	16,08	8,30
		Keskväärtsus	1111,23	16,10	7,63
		Standardhälve	110,83	0,03	0,83
02.05.2018	Lauluväljak	1	298,70	15,94	2,50
		2	304,70	15,87	2,50
		3	306,20	15,82	2,50
		Keskväärtsus	303,20	15,88	2,50
		Standardhälve	3,97	0,06	0,00
15.05.2018	Lauluväljak	1	245,10	15,89	2,20
		2	220,00	15,87	2,00
		3	253,40	15,90	2,20
		Keskväärtsus	239,50	15,88	2,13

		us			
		Standardh älve	17,39	0,02	0,12
17.04.2 018	Lauluväljak	1	310,20	16,32	2,70
		2	301,90	16,25	2,70
		3	311,00	16,23	2,70
		Keskväärt us	307,70	16,26	2,70
		Standardh älve	5,04	0,05	0,00
29.05.2 018	Lauluväljak	1	246,10	16,11	2,10
		2	252,60	16,04	2,10
		3	249,20	15,96	2,02
		Keskväärt us	249,30	16,04	2,07
		Standardh älve	3,25	0,07	0,05
02.05.2 018	Merivälja muul	1	455,30	16,06	3,70
		2	459,60	16,08	3,80
		3	458,90	16,09	3,80
		Keskväärt us	457,93	16,08	3,77
		Standardh älve	2,31	0,01	0,06
17.04.2 018	Merivälja muul	1	448,10	15,64	3,90
		2	418,30	15,93	3,50
		3	457,40	15,79	3,80
		Keskväärt us	441,27	15,79	3,73
		Standardh älve	20,43	0,15	0,21
15.05.2 018	Merivälja muul	1	306,00	15,89	2,30
		2	299,50	15,82	2,30
		3	248,60	15,84	1,90
		Keskväärt us	284,70	15,85	2,17
		Standardh älve	31,43	0,04	0,23
29.05.2 018	Merivälja muul	1	283,20	15,89	2,03
		2	283,70	15,87	2,01
		3	287,00	15,88	2,40
		Keskväärt us	284,63	15,88	2,15
		Standardh älve	2,06	0,01	0,22
02.05.2	Restoran	1	294,50	16,43	2,60

018	Paat	2	312,60	16,44	2,70
		3	322,10	16,36	2,70
		Keskväärtus	309,73	16,41	2,67
		Standardhälve	14,02	0,04	0,06
15.05.2018	Restoran Paat	1	293,30	15,79	2,20
		2	289,00	15,98	2,10
		3	295,20	15,92	2,30
		Keskväärtus	292,50	15,90	2,20
		Standardhälve	3,18	0,10	0,10
17.04.2018	Restoran Paat	1	440,40	15,71	3,70
		2	429,30	15,76	3,60
		3	424,90	15,78	3,50
		Keskväärtus	431,53	15,75	3,60
		Standardhälve	7,99	0,04	0,10
29.05.2018	Restoran Paat	1	319,10	15,93	2,70
		2	316,90	15,94	2,70
		3	333,60	15,93	2,80
		Keskväärtus	323,20	15,93	2,73
		Standardhälve	9,07	0,01	0,06
02.05.2018	Russalka	1	332,40	15,83	2,70
		2	335,60	15,83	2,70
		3	322,70	15,80	2,60
		Keskväärtus	330,23	15,82	2,67
		Standardhälve	6,72	0,02	0,06
15.05.2018	Russalka	1	320,40	15,85	3,10
		2	332,50	15,84	3,20
		3	329,50	15,86	3,20
		Keskväärtus	327,47	15,85	3,17
		Standardhälve	6,30	0,01	0,06
17.04.2018	Russalka	1	473,10	16,14	4,20
		2	476,50	16,57	4,20
		3	439,40	16,01	4,00
		Keskväärtus	463,00	16,24	4,13

		Standardh älve	20,51	0,29	0,12
29.05.2 018	Russalka	1	1060,50	16,23	7,90
		2	1003,80	16,19	7,70
		3	1008,90	16,19	7,70
		Keskväärt us	1024,40	16,20	7,77
		Standardh älve	31,37	0,02	0,12
02.05.2 018	Saare tee	1	380,10	16,35	3,40
		2	365,70	16,29	3,10
		3	361,90	16,19	3,20
		Keskväärt us	369,23	16,28	3,23
		Standardh älve	9,60	0,08	0,15
15.05.2 018	Saare tee	1	297,30	15,84	2,30
		2	304,70	15,80	2,30
		3	283,20	15,84	2,10
		Keskväärt us	295,07	15,83	2,23
		Standardh älve	10,92	0,03	0,12
17.04.2 018	Saare tee	1	493,80	15,86	4,60
		2	471,00	15,90	4,50
		3	437,20	16,14	4,40
		Keskväärt us	467,33	15,97	4,50
		Standardh älve	28,48	0,15	0,10
29.05.2 018	Saare tee	1	353,70	16,06	3,20
		2	356,50	16,07	3,30
		3	360,60	16,44	3,20
		Keskväärt us	356,93	16,19	3,23
		Standardh älve	3,47	0,22	0,06