مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال پنجم، شماره سوم، پیاپی نوزدهم، زمستان ۱۳۹۵ (۱۰۶-۹۷)

بررسی پویایی نیتریفیکاسیون و نقش فرایندهای مختلف تصفیه زیستی در بیوفیلترهای هوازی

عبدالجبار ایرانی[۱*]، عبدالمجید حاجی مرادلو[۲]، ناصر آق[۳]، رسول قربانی[۴]
۱. دانشجوی دکتری شیلات، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۲. استاد گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۳. دانشیار پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۳. دانشیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۲۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰)

چکیده
نرخ نیتریفیکاسیون در بیوفیلترها تابع غلظت آمونیاک است و مقادیر آمونیاک با توجه به زمان غذادهی در طول روز تغییر می‌کند. از طرف دیگر، به خاطر وجود شرایط مختلف در بیوفیلترها، احتمال حضور و فعالیت انواع باکتری‌ها دور از انتظار نیست. به همین دلیل در این تحقیق، پویایی نیتریفکاسیون در ساعات مختلف شبانه روز و همچنین نقش فرایندهای تصفیه زیستی (نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و آناموکس) در بیوفیلترهای هوازی مستقر در سیستم مدار بسته پرورش کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت. برای اجرای این تحقیق ۱۲ سیستم مدار بسته آزمایشی دارای بیوفیلترهای مبتنی بر کاه جو، پوشال چوب، اسفنج و لوله‌های مشبک پی‌وی‌سی طراحی گردید. پس از فعال شدن بیوفیلترها، در روزهای ۴۶ و ۶۱، نرخ نریفیکاسیون از هر ۴ ساعت تعیین گردید و در روز ۶۲ با نمونه‌گیری از بیوفیلترها، فرایندهای نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و آناموکس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نرخ نیتریفیکاسیون در ساعات مختلف شبانه روز متفاوت بوده و بیشترین مقدار آن با زمان‌های غذادهی در ارتباط بوده است. نرخ نیترفیکاسیون در گرانول‌های نمونه برداری شده از بیوفیلترها نسبت به حداکثر نرخ‌های به‌دست آمده برای بیوفیلترهای مستقر در سیستم‌ها بیشتر بوده است و در این گرانول‌ها علاوه بر نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون به مقدار زیاد و آناموکس به مقدار کمتر وجود داشت. بنابراین با مدیریت بهتر این بیوفیلترها می‌توان از همه فرایندهای دخیل در تصفیه زیستی ترکیبات معدنی نیتروژن استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آناموکس، بیوفیلتر، دنیتریفیکاسیون، نیتریفیکاسیون.

* نویسنده مسئول: عبدالجبار ایرانی E-mail: j_irani55@yahoo.com

Survey of nitrification dynamic and rules of different biofilteration process in aerobic biofilters

Abdoljabbar Irani[*1], Abdolmajid Hajimoradlo[2], Naser Agh[3], Rasul Ghorbani[4]
1. Ph.D. Student, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Associate Professor, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran
4. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
(Received: Aug. 15, 2015 - Accepted: Feb. 18, 2017)

Abstract
Nitrification rate of biofilters is influenced by ammonia concentration and levels of ammonia vary in response to feeding time. On the other hand, existence and activity of different groups of bacteria can be expected in the biofilters. Hence in this research, nitrification dynamic of biofilters during day hours and also rules of different biofilteration process (nitrification, denitrification and anamox) in aerobic biofilters of Common carp recirculating aquaculture system were surveyed. To conduct of this research 12 pilot recirculating aquaculture systems with barley straw, wood chip, sponge and PVC pure pipe based biofilters were designed. After activation of biofilters, nitrification rates measured at day 46 and 61 in 4 hour interval and via sampling of granules from biofilters at day 62, nitrification, denitrification and anamox process were surveyed. Results indicated that nitrification rates were different during day hours, as so peak rates observed in related to feeding time. Nitrification rates in batch culture of granules were greater than maximum rates obtained for biofilters established in recirculating aquaculture systems and these granules showed not only nitrification but also denitrification and relatively anamox activities. In conclude by modifying the management of biobilters all biofilteration process of inorganic nitrogen wastes can be useful.

Keywords: anamox, biofilter, denitrification, nitrification.

مقدمه

در بیوفیلترها گروه‌های مختلفی از باکتری‌ها فعالیت می‌کنند. مهمترین آنها باکتری‌های نیتریفیکاسیون هستند که کاملا هوازی و کمولیتواتوتروف می‌باشند (Michaud *et al*., 2006). به فرایند تبدیل آمونیاک به نیترات، نیتریفیکاسیون می گویند که شامل دو مرحله است. در مرحله اول آموناک توسط باکتری‌های اکسید کننده آمونیاک تبدیل به نیتریت و در مرحله دوم، نیتریت به‌وسیله باکتری‌های اکسیدکننده نیتریت تبدیل به نیترات می‌گردد (Schuster & Stelz, 1998). در نتیجه این فرایند ترکیبات سمی نیتروژن (آمونیاک و نیتریت) تبدیل به ترکیبی با سمیت بسیار پائین‌تر (نیترات) می‌گردد و آب تصفیه شده را می‌توان دوباره مورد استفاده قرار داد.

ظرفیت نیتریفیکاسیونی یک بیوفیلتر به بیوفیلم آن وابسته است. بیوفیلم اغلب به‌عنوان یک ساختار لایه لایه توصیف می‌شود. لایه داخلی آن از بیوماس باکتریایی ثابت در نزدیک سطح بستر تشکیل می‌شود، که شامل جمعیت‌های باکتری‌های نیتریفایر است، اما در لایه خارجی باکتری‌های هتروترف غالب هستند (Ohashi *et al*., 1995). این لایه بندی در نتیجه تکثیر نسبتا بالای باکتری‌های هتروتروف ایجاد می‌گردد. به‌عنوان مثال FDZ-Polanco *et al.* (2000) نشان دادند کردند که نرخ رشد ویژه باکتری‌های هتروتروف ۴/۸ در روز است، در صورتی‌که در باکتری‌های اکسیدکننده آمونیاک و اکسیدکننده نیتریت تنها ۰/۷۶ و ۰/۸۴ در روز می‌باشد. این توانایی تولیدمثلی بالا، برای باکتری‌های هتروتروف این امکان را فراهم می‌کند که در قسمت‌های بالای بیوفیلم مستقر شوند. علاوه بر آن، باکتری‌های هتروتروف یکی از مهمترین عوامل تأثیرگذار در نرخ نیتریفیکاسیون هستند، چراکه ضخامت بیوفیلم و فاصله انتشار مواد مغذی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Zhang & Bishop, 1994). به‌طور کلی نرخ نیتریفیکاسیون در سیستم‌های مدار بسته پرورش آبزیان تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرد که از جمله مهمترین آنها: اکسیژن محلول، pH، درجه حرارت، قلیائیت، غلظت سوبسترا و تقاضای بیوشیمیایی اکسیژن می‌باشد (Ling & Chen, 2005).

در زمینه اکولوژی میکروارگانیسم‌های دخیل در فرایند نیتریفیکاسیون در سیستمهای مدار بسته اطلاعات اندکی وجود دارد (Van Rijn, 1996; Tal *et al*., 2003). بیشتر مطالعاتی که روی باکتری‌های حذف‌کننده ترکیبات نیتروژن در بیوفیلترهای سیستم‌های مدار بسته آبزی پروری و تاسیسات تصفیه فاضلاب انجام شده است، روی زیر گروه‌های آلفا و بتا باکتری‌های پروتئوباکتریا از قبیل نیتروزوموناس، نیتروباکتر و نیتروسپیرا بوده است (Juretschko *et al*., 1998; Kloep *et al*., 2000). ولی در خصوص اجتماعات تشکیل‌دهنده بیوفیلترهای هوازی و نقش آنها در فرایندهای حذف ترکیبات معدنی نیتروژن تحقیقات کمی انجام شده است. به‌عنوان مثال بیوفیلترها اغلب دارای مناطق بی‌هوازی هستند که در آنجا باکتری‌های بی‌هوازی اکسیده آمونیاک (Anammox) حضور داشته و به حذف آمونیاک کمک می کنند (Strous *et al*., 1999; Lahav *et al*., 2009)، که اینها کمتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند. دامنه وسیعی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی موجود در بیوفیلترها و نیز انواع مواد مغذی که در دسترس باکتری‌ها قرار دارد، این احتمال را تقویت می‌کند که علاوه بر نیتریفایرها، تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌های دخیل در فرایندهای مختلفی از قبیل دنیتریفیکاسیون و آناموکس فعالانه حضور داشته باشد. از طرف دیگر، با توجه به اینکه فعالیت نیتریفیکاسیونی به غلظت آموانیاک در دسترس باکتری‌ها وابسته است و مقادیر آمونیاک ورودی به سیستم با توجه به زمان غذادهی متفاوت می‌باشد، ممکن است نرخ نیتریفیکاسیون در ساعات مختلف شبانه روز متغیر باشد. به همین دلیل در تحقیق حاضر پویایی روزانه نیتریفیکاسیون و همچنین میزان فعالیت

مهمترین فرایندهای مؤثر در تصفیه زیستی ترکیبات معدنی نیتروژن (نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و آناموکس) در بیوفیلترهای مبتنی بر کاه جو، پوشال چوب، اسفنج و لوله‌های مشبک پی‌وی‌سی مستقر در سیستم مدار بسته پرورش کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بسترهای مورد استفاده و تیمارهای آزمایشی

برای اجرای این تحقیق چهار نوع بستر مختلف در قالب چهار تیمار و سه تکرار برای هر تیمار به شرح ذیل مورد استفاده قرار گرفت: تیمار۱- کاه جو (سطح ویژه: ۳۴۵ m^2/m^3): ساقه‌های کاه به اندازه حدود ۳ سانتی‌متر بریده شدند (Sailing *et al*., 2007). تیمار۲- پوشال چوب (سطح ویژه: ۴۵۹ m^2/m^3): پوشال چوب نراد الک شده و ذرات و تکه‌های کوچک‌تر از یک سانتی‌متر حذف و تکه‌های بزرگ و ضخیم برش داده شدند (Sailing *et al*., 2007). تیمار۳- اسفنج (سطح ویژه: ۲۳۰ m^2/m^3): اسفنج معمولی، در اندازه‌های ۲ – ۱ سانتی‌متری برش داده شدند (Nguyen *et al*., 2010). تیمار۴- بستر پی وی سی (سطح ویژه: ۲۱۰ m^2/m^3): بستر لوله‌ای مشبک مورد استفاده در برخی از سیستم‌های مدار بسته موجود در کشور به اندازه حدود ۱۲ سانتی‌متر برش داده و مورد استفاده قرار گرفت.

طراحی سیستم مدار بسته

برای اجرای این تحقیق ۱۲ سیستم مدار بسته آزمایشگاهی طراحی گردید. هر سیستم شامل یک تانک پلی اتیلن ۹۰ لیتری با حجم آبگیری ۸۰ لیتر برای پرورش ماهیان و یک تانک ۴۵ لیتری با حجم آبگیری ۳۰ لیتر به‌عنوان راکتور بیوفیلتر بود. در این تانک‌ها آب بعد عبور از یک فیلتر توری ساده، به وسیله مکانیسم ایر- واتر لیفت به داخل تانک بیوفیلتر منتقل و به صورت ثقلی مجددا به داخل تانک پرورش بر می‌گشت. بسترها در حجم‌های یکسان (۰/۰۱۲ مترمکعب) در داخل آنها قرار داده شدند. دمای آب هر سیستم به وسیله بخاری آکواریومی در محدوده‌ی ۲۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. ذخیره سازی بچه ماهیان (با میانگین وزن ۴/۸ گرم) با تراکم ۵۰ قطعه در هر تانک (۳ کیلوگرم در مترمکعب) انجام و مقدار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر باکتری‌های نیتریفایر به هر تانک بیوفیلتر اضافه گردید.

بررسی پویایی نیتریفیکاسیون

پس از سپری شدن دوره سازگاری بیوفیلترها و فعال شدن آنها، دو بار (یکی در روز ۴۶ و دیگری در روز ۶۱) از هر چهار ساعت (از ساعت ۹ صبح تا ساعت ۸ صبح روز بعد) از ورودی و خروجی همه بیوفیلترها نمونه‌گیری و مقادیر آمونیاک آنها به وسیله فتومتر هک اندازه‌گیری گردید. به منظور بررسی تغییرات مقادیر آمونیاک سیستم‌ها در صورت عدم وجود بیوفیلترها، در روز ۶۲ بیوفیلترهای همه سیستم‌ها را برداشته و از هر ۴ ساعت آمونیاک آنها اندازه‌گیری گردید.

بررسی فرایند نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و آناموکس

در روز ۶۲ برای بررسی میزان حضور و فعالیت باکتری‌های دخیل در مهمترین فرایندهای تأثیرگذار در حذف آمونیاک، نیتریت و نیترات، یعنی نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و آناموکس مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از هر بیوفیلتر چهار سری نمونه هرکدام با منطقه سطح ویژه ۰/۰۴۲ مترمربع (۱۵۷ قطعه کاه جو، ۴۷ قطعه تراشه چوب، ۴۲ قطعه اسفنج و ۰/۶ قطعه (۷/۲ سانتی‌متر) لوله پی‌وی‌سی برداشته و پس از شستشو در داخل بطری‌های نیم لیتری قرار داده شدند. برای بررسی فعالیت نیتریفیکاسیون به هر یک از بطری‌ها ۲۵۰ سی سی آب غنی شده (جدول۱) به همراه ۱۰ میلی‌گرم در

لیتر نیتروژن آمونیاکی ریخته و در شرایط هوازی به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شدند. برای بررسی فعالیت دنیتریفیکاسیون دو سری بطری با ۲۵۰ سی سی آب غنی شده اختصاص داده شد. در سری اول ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیتروژن نیترات اضافه گردید و در سری دوم علاوه بر ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیتروژن نیترات، ۱۰ میلی‌مول استات سدیم (به‌عنوان منبع کربن خارجی) نیز اضافه شد. این بطری‌ها به مدت ۱۶ ساعت در شرایط بی‌هوازی نگهداری شدند. برای بررسی حضور و فعالیت باکتری‌های دخیل در فرایند آناموکس به هر یک از بطری‌ها آب غنی شده حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیتروژن آمونیاکی و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیتروژن نیتریت اضافه گردید و بدون اضافه کردن منبع کربن خارجی به مدت ۱۶ ساعت در شرایط بی‌هوازی نگهداری شدند. شرایط بی‌هوازی لازم برای فرایندهای دنیتریفیکاسیون و آناموکس از طریق تزریق گاز نیتروژن فراهم گردید. پس از ۱۶ ساعت مقادیر آمونیاک، نیتریت و نیترات در این بطری‌ها اندازه‌گیری گردید.

جدول۱. ترکیب شیمیایی آب غنی شده به کار رفته در تحقیق حاضر (زو و چن، ۱۹۹۹)

ماده شیمیایی	مقدار (گرم)
بی‌کربنات سدیم ($NaHCO_3$)	۱۲۹
سولفات منیزیم ($MgSO_4.7H_2O$)	۱/۳۲
فسفات سدیم (Na_2HPO_4)	۵/۸۵
فسفات پتاسیم (KH_2PO_4)	۵/۶۳
کلرید آهن ($FeCl_3.6H_2O$)	۰/۱۸
آب (لیتر)	۱۳۲۵

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نرخ حذف نیتروژن آمونیاکی کل به ازاء سطح ویژه (گرم بر مترمربع در روز) از فرمول زیر به‌دست آمد:

$$STR = \frac{Q(TAN\ A - TAN\ E)}{S}$$

که در آن، Q دبی آب در بیوفیلتر (مترمکعب در روز)، TAN_A مقدار نیتروژن آمونیاکی آب ورودی بیوفیلتر (گرم در مترمکعب)، TAN_E مقدار نیتروژن آمونیاکی آب خروجی بیوفیلتر (گرم در مترمکعب) و S سطح ویژه بیوفیلتر (مترمربع) می‌باشد (Colt *et al.*, 2006). نرخ حجمی حذف نیتروژن آمونیاکی کل (گرم بر مترمکعب در روز) از فرمول زیر به‌دست آمد:

$$VTR = \frac{Q(TAN\ A - TAN\ E)}{V}$$

که در آن V حجم بیوفیلتر (مترمکعب) می‌باشد (Timmons & Ebeling, 2007). بازده حذف نیتروژن آمونیاکی کل با فرمول زیرمحاسبه گردید:

$$RE = \frac{(C\ i - C\ e)}{C\ i} * 100$$

که در آن RE بازده حذف (برحسب درصد)، C_i غلظت پسماند در آب ورودی بیوفیلتر (گرم در مترمکعب) و C_e غلظت پسماند در آب خروجی بیوفیلتر (گرم در مترمکعب) می‌باشد (Liu *et al.*, 2013).

برای سازماندهی داده‌ها و انجام محاسبات از برنامه Excel 2010 و برای تجزیه و تحلیل‌های آماری از برنامه SPSS 22 استفاده گردید. برای بررسی توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو–ویلک، برای بررسی برابری واریانس‌ها از آزمون لون، برای مقایسه میانگین‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (درصورت وجود اختلاف معنی‌دار، تست تعقیبی دانکن) یا آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر (درصورت وجود اختلاف معنی‌دار، تست تعقیبی بونفرونی) استفاده گردید.

نتایج

پویایی بیوفیلتراسیون در روز ۴۶

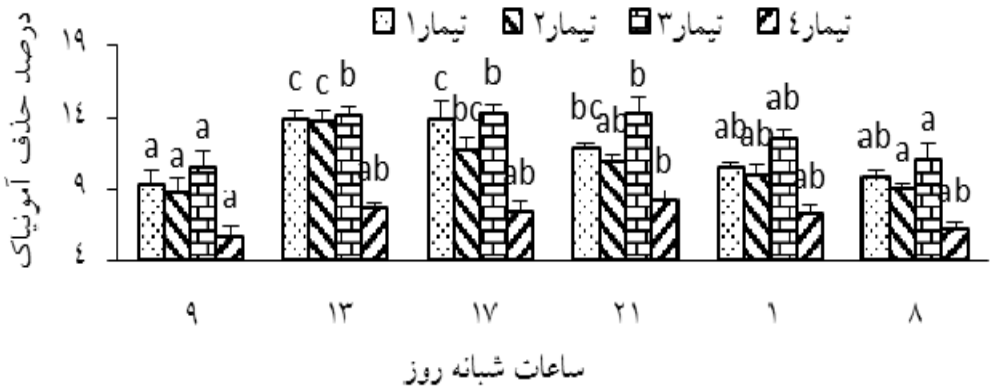
میانگین روزانه بازده حذف نیتروژن آمونیاکی در تیمار ۳ (۱۲/۸۳±۰/۴۹ درصد) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای ۲ و ۴ بود و کمترین مقدار آن (۷/۰۲±۰/۳۱ درصد) در تیمار ۴ مشاهده گردید، که نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$). در

تیمار ۱، بازده حذف در ساعات ۱۳ و ۱۷ (۱۳/۹۵ درصد) نسبت به ساعات ۹، ۱ و ۸ اختلاف معنی‌داری نشان داد. در تیمار ۲، بازده حذف در ساعت ۱۳ و ۱۷ (به ترتیب ۱۳/۷ و ۱۱/۸۲ درصد) به‌طور معنی‌داری از ساعات ۹ و ۸ بیشتر بود. در تیمار ۳ بازده حذف ساعات ۱۳، ۱۷ و ۲۱ (به‌ترتیب ۱۴/۱۶، ۱۴/۳۶ و ۱۴/۲۳ درصد) نسبت به ساعات ۹ و ۸ اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل ۴-۱۲). در تیمار ۴ بازده حذف در ساعت ۲۱ (۸/۱۸ درصد) به‌طور معنی‌داری بیشتر از ساعت ۹ بود ($p<۰/۰۵$). از نظر نرخ حذف حجمی نیتروژن آمونیاکی کل بین هیچکدام از تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (جدول۲)، ولی از نظر نرخ حذف به ازاء واحد سطح بیوفیلتر، تیمارهای ۳ و ۴ (به ترتیب ۱۳±۱۷۳/۹۷ و ۱۷/۱۸±۲۰۳/۶۵ میلی‌گرم بر مترمربع در روز) نسبت به تیمارهای ۱ و ۲ به‌طور معنی‌داری مقادیر بیشتری داشتند ($p<۰/۰۵$).

جدول۲. میانگین روزانه درصد حذف نیتروژن آمونیاکی، نرخ حذف حجمی و نرخ حذف به ازاء واحد سطح ویژه بیوفیلتر در روز ۴۶ دوره تحقیق*

تیمار	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار۴
بازده حذف (درصد)	۱۱/۵۹±۰/۵۱^{cb}	۱۰/۷±۰/۴۹^{b}	۱۲/۸۳±۰/۴۹^{c}	۷/۰۲±۰/۳۱^{a}
نرخ حذف حجمی**	۳۸/۲۵±۳/۱۸^{a}	۴۰/۸۸±۴/۱۹^{a}	۴۰/۰۱±۲/۹۹^{a}	۳۶/۳۲±۳/۰۶^{a}
نرخ حذف به ازاء سطح***	۱۱۰/۸۸±۹/۲۳^{b}	۸۹/۰۴±۹/۱۳^{a}	۱۷۳/۹۷±۱۳^{c}	۲۰۳/۶۵±۱۷/۱۸^{c}

* در هر ردیف حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$). ** حذف روزانه نیتروژن آمونیاکی کل (گرم) توسط یک مترمکعب حجم بیوفیلتر *** حذف روزانه نیتروژن آمونیاکی کل (میلی‌گرم) به ازاء هر مترمربع سطح ویژه بیوفیلتر



شکل ۱. پویایی نیتریفیکاسیونی بیوفیلترها در روز ۴۶ دوره تحقیق. مقادیر به صورت میانگین ± خطای معیار هستند. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) در هر تیمار می‌باشد.

پویایی بیوفیلتراسیون در روز ۶۱

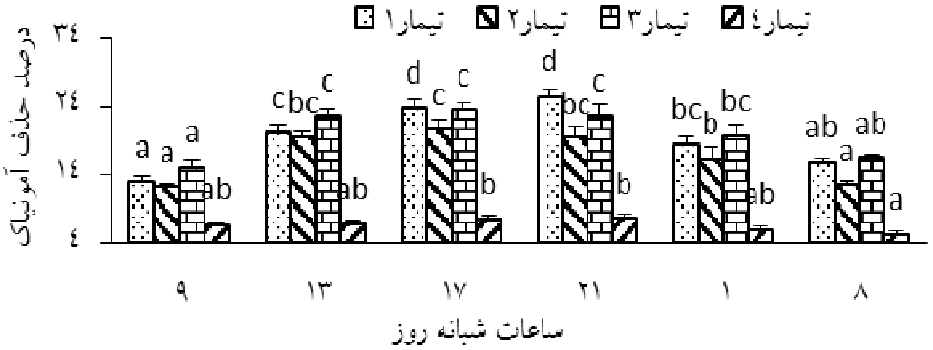
بررسی پویایی بیوفیلترها در روز ۶۱ (جدول۳) نشان داد که میانگین روزانه بازده حذف نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای ۱ و ۳ (به‌ترتیب ۰/۴۱±۱۹/۴۵ و ۰/۵۲±۱۹/۹۸ درصد) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای ۲ و ۴ (به‌ترتیب ۰/۴۹±۱۶/۷۹ و ۰/۲۴±۶/۶۶ درصد) بود ($p<۰/۰۵$). در تیمار ۱ بازده حذف در ساعات ۱۷ و ۲۱ (به‌ترتیب ۲۳/۷۱ و ۲۵/۵۱ درصد) به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر ساعات شبانه روز بود. در تیمار ۲ بازده حذف در ساعت ۱۷ (۲۰/۶۶ درصد) به‌طور معنی‌داری بیشتری ساعات ۹، ۱ و ۸ بود و بازده حذف در ساعات ۹ و ۸ (۱۲/۳۲ و ۱۲/۵۳ درصد) به‌طور معنی‌داری از سایر تیمارها کمتر بود ($p<۰/۰۵$). در تیمار ۳ بازده حذف در ساعات ۱۳، ۱۷

و ۲۱ (به‌ترتیب ۲۲/۵۳، ۲۳/۴۵ و ۲۲/۵۶ درصد) نسبت به ساعات ۹ و ۸ به‌طور معنی‌داری بیشتر بود، ولی اختلاف آماری باهم نداشتند (p<۰/۰۵). در تیمار ۴ بازده حذف ساعات ۱۷ و ۲۱ (به ترتیب ۷/۴۴ و ۷/۶ درصد) نسبت به ساعت ۸ (۵/۳ درصد) اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل۴-۱۳)، ولی در سایر ساعات اختلاف آماری مشاهده نگردید (p<۰/۰۵). میانگین نرخ حذف حجمی در تیمار ۳ (۶۶/۲۵±۵/۷۴ گرم بر مترمکعب در روز) بیشتر از سایر تیمارها بود و نسبت به تیمارهای ۱ و ۴ اختلاف معنی‌داری نشان داد. کمترین مقدار آن (۴۵/۰۵±۴/۱۹ گرم بر مترمکعب در روز) مربوط به تیمار۴ بود که نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵). از نظر نرخ حذف نیتروژن آمونیاکی به ازاء واحد سطح بیوفیلتر همه تیمارها باهم اختلاف معنی‌دار نشان دادند (p<۰/۰۵) و تیمار ۳ (۲۸۸/۰۳±۲۴/۹۴ میلی‌گرم بر مترمربع در روز) و تیمار ۲ (۱۳۱/۶۲±۱۳/۸۲ میلی‌گرم بر مترمربع در روز) به ترتیب بیشترین و کمترین میانگین روزانه را به خود اختصاص دادند (جدول۳).

جدول۳. میانگین روزانه درصد حذف نیتروژن آمونیاکی، نرخ حذف حجمی و نرخ حذف به ازاء واحد سطح ویژه بیوفیلتر در روز ۶۱ دوره تحقیق*

تیمار	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار۴
بازده حذف (درصد)	۱۹/۴۵±۰/۴۱^{c}	۱۶/۷۹±۰/۴۹^{b}	۱۹/۹۸±۰/۵۲^{c}	۶/۶۶±۰/۲۴^{a}
نرخ حذف حجمی**	۵۸/۶۶±۵/۶۷^{c}	۶۰/۴۴±۶/۳۵^{cd}	۶۶/۲۵±۵/۷۴^{d}	۴۵/۰۵±۴/۱۹^{a}
نرخ حذف به ازاء سطح***	۱۷۰/۰۲±۱۶/۴۳^{b}	۱۳۱/۶۲±۱۳/۸۲^{a}	۲۸۸/۰۳±۲۴/۹۴^{d}	۲۵۲/۶۲±۲۳/۵^{c}

* در هر ردیف حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵). ** حذف روزانه نیتروژن آمونیاکی کل (گرم) توسط یک مترمکعب حجم بیوفیلتر، *** حذف روزانه نیتروژن آمونیاکی کل (میلی‌گرم) به ازاء هر مترمربع سطح ویژه بیوفیلتر



شکل۲. پویایی نیتریفیکاسیونی بیوفیلترها در روز ۶۱ دوره تحقیق. مقادیر به صورت میانگین ±خطای معیار هستند. حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) در هر تیمار می‌باشد

بررسی فعالیت نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و آناموکس

بررسی بسترهای مورد آزمایش با سطح ویژه یکسان نشان داد که نرخ نیتریفیکاسیون در تیمار ۳ (۳۳۴/۸۸±۲/۸۹ میلی‌گرم نیتروژن آمونیاکی بر مترمربع در روز) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای ۲ و ۴ (به ترتیب ۲۹۲/۷۴±۷/۰۵ و ۳۱۷/۸۶±۲/۹۹ میلی‌گرم نیتروژن آمونیاکی بر مترمربع در روز) بود و نرخ نیتریفیکاسیونی تیمار ۲ به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود (p<۰/۰۵).

باکتری‌های دخیل در فرایند دنیتریفیکاسیون برای فعالیت نیاز به یک منبع کربن دارند، به همین دلیل

این آزمایش با حضور و بدون حضور استات (به‌عنوان منبع کربن) انجام شد. در حضور استات، نرخ دنیتریفیکاسیون در همه تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵)، به‌طوری که بیشترین و کمترین مقدار (به‌ترتیب ۱۰/۶۷±۲۵۵/۵۹ و ۸/۵۲±۶۵/۰ میلی‌گرم نیتروژن نیترات بر مترمربع در روز) مربوط به تیمارهای ۳ و ۴ بود (جدول۴). بدون حضور استات بیشترین نرخ دنیتریفیکاسیون در تیمارهای ۱ و ۲ (به ترتیب ۹/۳۸±۹۸/۱۰ و ۶/۴۱±۶۳/۸۱ میلی‌گرم بر مترمربع در روز) اتفاق افتاد، که نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان دادند (p<۰/۰۵).

بیشترین نرخ حذف نیتروژن آمونیاکی طی فرایند آناموکس (۳/۹۶±۷۰/۹۵ میلی‌گرم بر مترمربع در روز) در تیمار ۳ اتفاق افتاد که نسبت به تیمارهای ۲ و ۴ اختلاف معنی‌داری نشان داد و کمترین مقدار آن مربوط به تیمار ۴ (۶/۰۸±۳۳/۰۹ میلی‌گرم بر مترمربع در روز) بود، که فقط با تیمار ۲ اختلاف معنی‌دار نشان نداد (p<۰/۰۵). بیشترین نرخ حذف نیتروژن نیتریت مربوط به فرایند آناموکس مربوط به تیمار ۳ (۴/۶۵±۶۶/۵۵ میلی‌گرم بر مترمربع در روز) بود که نسبت به تیمارهای ۲ و ۴ اختلاف معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵) و کمترین مقدار آن (۷/۹۴±۲۹/۶۴ میلی‌گرم بر مترمربع در روز) مربوط به تیمار ۴ بود (جدول۴).

جدول ۴. نرخ حذف نیتروژن آمونیاکی کل، نیتریت و نیترات (میلی‌گرم بر مترمربع در روز) در شرایط مختلف*

تیمار	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار۴
نیتریفیکاسیون	۵/۰۶±۳۲۱/۹۱^{bc}	۷/۰۵±۲۹۲/۷۴^{a}	۲/۸۹±۳۳۴/۸۸^{c}	۲/۹۹±۳۱۷/۸۶^{b}
دنیتریفیکاسیون با استات	۱۲/۸۷±۲۴۶/۹۱^{c}	۱۱/۱۵±۱۸۶/۴۳^{b}	۱۰/۶۷±۲۵۵/۵۹^{c}	۸/۵۲±۶۵/۰^{a}
دنیتریفیکاسیون بدون استات	۹/۳۸±۹۸/۱۰^{c}	۶/۴۱±۶۳/۸۱^{b}	۴/۴۳±۳۱/۹۱^{a}	۴/۴±۱۲/۰۲^{a}
آناموکس- نرخ حذف آمونیاک	۳/۵۴±۵۵/۱۲^{bc}	۸/۱±۴۲/۸۵^{ab}	۳/۹۶±۷۰/۹۵^{c}	۶/۰۸±۳۳/۰۹^{a}
آناموکس- نرخ حذف نیتریت	۳/۴±۶۰/۵۹^{bc}	۴/۹۸±۴۶/۹^{ab}	۴/۶۵±۶۶/۵۵^{c}	۷/۹۴±۲۹/۶۴^{a}

* در هر ردیف حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵). مقادیر به صورت میانگین ±خطای معیار هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، در طول روز مقادیر بازده حذف، نرخ حذف به ازای سطح و نرخ حذف حجمی نیتروژن آمونیاکی افزایش پیدا کرد، به‌طوری‌که نرخ نیتریفیکاسیون طی روز تا ساعت ۲۱ نسبت به ساعات اوایل صبح و اواسط شب به‌طور قابل توجه‌ای بیشتر بود، که نشان‌دهنده تغییرات تولید و دفع آمونیاک توسط ماهیان در ساعات مختلف شبانه روز (با توجه به زمان غذادهی) می‌باشد، چراکه واکنش نیتریفیکاسیونی باکتری‌های نیتریفایر، به غلظت آمونیاک موجود در دسترس بیوفیلم بستگی دارد (Zhoe & Chen, 2002). از طرف دیگر مقایسه پویایی بیوفیلتراسیون در روزهای ۴۶ و ۶۱ نشان داد که در روز ۶۱ افزایش نرخ نیتریفیکاسیون در طول روز به‌طور قابل توجه‌ای بیشتر از روز ۴۶ می‌باشد، دلیل این امر نیز به افزایش تولید آمونیاک ناشی از افزایش غذادهی مربوط می‌باشد. در بیوفیلتر پی‌وی‌سی تغییرات شبانه روزی نرخ نیتریفیکاسیون کمتر از سایر تیمارها بود. به‌نظر می‌رسد این بیوفیلتر به حداکثر ظرفیت خود (برای افزایش جمعیت باکتری‌های نیتریفایر) نزدیک شده است. چراکه اگر غلظت‌های آمونیاک نسبت به جمعیت باکتری‌های نیتریفایر به اندازه کافی وجود داشته باشد، افزایش آمونیاک تأثیر چندانی در نرخ نیتریفیکاسیون نخواهد گذاشت (Tchobanaglous *et al*., 2003).

با وجودی‌که در سال‌های اخیر روی بیوفیلترهای سیستم‌های آبزی پروری تحقیقات متعددی انجام شده، اطلاعات کمی در زمینه اجتماعات تشکیل

دهنده بیوفیلترها و نقش آنها در فرایند حذف نیتروژن وجود دارد (Tal *et al*., 2003). با استفاده از اطلاعات مربوط به حضور گروه‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها در بیوفیلترها و میزان فعالیت آنها، می‌توان از طریق بهینه سازی شرایط اجرایی بیوفیلترها از قبیل مقادیر اکسیژن، جریان آب، درجه حرارت و بارگذاری مواد مغذی، باعث افزایش کارایی آنها گردید.

فعالیت نیتریفیکاسیون در گرانول‌های حاصل از تیمارهای ۱ و ۲ (به ترتیب ۳۲۱/۹۱ و ۲۹۲/۷۴ میلی‌گرم بر مترمربع در روز) نسبت به حداکثر نرخ‌های ارائه‌شده برای بیوفیلترهای مستقر در سیستم (میانگین به‌دست آمده در روز ۶۱ به‌ترتیب ۱۷۰/۰۲ و ۱۳۱/۶۲ میلی‌گرم بر مترمربع در روز) خیلی بیشتر بود. در صورتی که در تیمار ۳ و ۴ (به ترتیب ۳۳۴/۸۸ و ۳۱۷/۸۶ میلی‌گرم بر مترمربع در روز) نسبت به حداکثر فعالیت نیتریفیکاسیونی بیوفیلترهای مزبور در داخل سیستم‌ها (به‌ترتیب ۲۸۸/۰۳ و ۲۵۲/۶۲ میلی‌گرم بر مترمربع در لیتر) اختلاف فاحشی مشاهده نگردد. این امر می‌تواند نشان‌دهنده ظرفیت بیوفیلترهای با بستر کاه و تراشه چوب برای افزایش نرخ نیتریفیکاسیون در صورت افزایش غلظت آمونیاک و یا بهبود شرایط باشد. در آزمایش مشابه انجام شده توسط Tal *et al*. (2003)، حداکثر نرخ حذف نیتروژن آمونیاکی ۷۵۶–۶۰۰ میلی‌گرم بر مترمربع در روز بوده، که نسبت به تحقیق حاضر، این مقادیر بالاتر بوده است. علت آن می‌تواند ناشی از استفاده این محققین از گرانول‌های بیوفلتر بستر متحرک باشد، چراکه در این بیوفیلترها نرخ نیتریفیکاسیون نزدیک دو برابر بیوفیلترهای گرانولی ثابت است (Crab *et al*., 2007).

انکوباسیون گرانول‌ها در شرایط بی‌هوازی نشان داد که حتی بدون حضور منبع کربن خارجی امکان فعالیت دنیتریفیکاسیون وجود دارد و نرخ آن در کاه جو نسبت به اسفنج و لوله‌های پی‌وی‌سی به ترتیب حدود ۳ و ۸ برابر بیشتر بود. همچنین نرخ دنیتریفیکاسیون در پوشال چوب نسبت به اسفنج و پی‌وی‌سی به‌ترتیب حدود ۲ و ۳ برابر بیشتر بود. باکتری‌های هتروتروف دخیل در فرایند دنیتریفیکاسیون برای فعالیت نیاز به منبع کربن آلی دارند (Van Rijn *et al*., 2006)، بنابراین آلی بودن منشاء کاه جو و پوشال چوب شرایط را برای فعالیت این باکتری‌ها مساعد نموده است. Tal *et al*. (2003) گزارش کردند که گرانول‌های انکوبه شده با مقادیر نیترات پائین و بدون منبع کربن خارجی فعالیت دنیتریفیکاسیون نشان ندادند و تنها زمانی که مقادیر نیترات را تا ۱۳۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش دادند، اندکی فعالیت دنیتریفیکاسیون وجود داشت.

در تحقیق حاضر در حضور استات فعالیت دنیتریفیکاسیونی قابل توجه‌ای انجام شد، که نشان‌دهنده حضور و فعالیت اجتماع بزرگ دنیتریفایرها در بیوفیلترهای بررسی شده می‌باشد. Tal *et al*. (2003) نرخ دنیتریفیکاسیون در حضور استات را حداکثر ۲۳۷/۶ میلی‌گرم بر مترمکعب در روز گزارش کرده‌اند، که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

فرایند دیگری که در شرایط بی‌هوازی ممکن است در بیوفیلترها انجام شود، آناموکس است. فرایندی که آمونیاک به وسیله نیتریت به‌عنوان پذیرنده الکترون به نیتروژن گازی احیاء می‌گردد (Strous *et al*., 1999). باکتری‌های آناموکس از اعضای اتوتروفی جدید راسته پلانکتومیست هستند. این نوع پلانکتومیست‌ها، از نیتریت به جای اکسیژن، به‌عنوان پذیرنده الکترون و از CO_2 به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. این فرایند در چرخه جهانی نیتروژن اهمیت زیادی دارد، چراکه باکتری‌های آناموکس مسئول ۵۰–۳۰ درصد آزاد شدن روزانه نیتروژن دریاها می‌باشند (Brandes *et al*., 2007; Lam *et al*., 2009). وجود باکتری‌های آناموکس در بیوفیلتر بستر متحرک در سیستم مدار بسته دریایی قبلاً ثابت شده است (Tal *et al*., 2006; Lahav *et al*., 2009). این بدان معنی است که آمونیاک دفع شده توسط

ماهی به‌وسیله باکتری‌های اکسید کننده آمونیاک در شرایط هوازی به نیتریت تبدیل می‌گردد. سپس نیتریت تولید شده به‌همراه باقیمانده آمونیاک توسط باکتری‌های آناموکس در بخش بی‌هوازی بیوفیلتر به ازت گازی تبدیل می‌گردد. بنابراین آمونیاک و نیتریت به‌طور همزمان بدون نیاز به فرایندهای نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون از سیستم خارج می‌گردند (Van Rijn *et al*., 2006). آزمایش انجام شده در تحقیق حاضر نشان داد که فعالیت آناموکس در همه سیستم‌ها وجود داشت، ولی نرخ‌های آن در مقایسه با فعالیت نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون پائین بود (۷۰/۹۵–۳۳/۰۹ میلی‌گرم بر مترمربع در روز نرخ حذف آمونیاک و ۶۶/۵۵–۲۹/۶۴ میلی‌گرم بر مترمربع در روز نرخ حذف نیتریت). ولی این مقادیر نسبت به مقادیر گزارش شده توسط Tal *et al.* (2003) برای بیوفیلتر بستر متحرک (۷/۹۲–۶/۹۶ میلی‌گرم نیتروژن آمونیاکی و ۷/۹۲ میلی‌گرم نیتروژن نیتریت بر مترمربع در روز) به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود، که نشان‌دهنده تأثیر نوع بیوفیلتر و نوع بستر در فعالیت باکتری‌های دخیل در فرایند آناموکس می‌باشد.

REFERENCES

1. Brandes, J. A.; Devol, A. H.; Deutsch, C.; (2007). New developments in the marine nitrogen cycle. Chemical Reviews; 107: 577-589.
2. Colt, J.; Lamoureux, J.; Patterson, R.; Rogers, G.; (2006). Reporting standards for biofilter performance studies. Aquaculture Engineering; 34: 377-388.
3. Crab, R.; Avnimelech, Y.; Defoirdt, T.; Bossier, P.; Verstraete, W.; (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for sustainable production. Aquaculture; 270, 1-14.
4. FDZ-Polanco, F.; Mndez, E.; Uruena, M. A.; Villaverde, S.; Garcła, P. A.; (2000). Spatial distribution of heterotrophic and nitrifiers in a submerged biofilter for nitrification. Water Research; 34: 4081-4089.
5. Juretschko, S.; Timmermann, G.; Schmid, M.; Schleifer, K. H.; Pommerening, A.; Koops, H. P.; Wagner, M.; (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: Nitrosococcus mobilis and Nitrospira-like bacteria as dominant populations. Applied and Environmental Microbiology; 64: 3042-3051.
6. Kloep, F.; Roske, I.; Neu, R. T.; (2000). Performance and microbial structure of a nitrifying fluidized-bed reactor. Water Research; 34: 311-319.
7. Lam, P.; Lavik, G.; Jensen, M. M.; van de Vossenberg, J.; Schmid, M.; Woebken, D.; Gutiérrez, D.; Amann, R.; Jetten, M. S. M.; Kuypers, M. M. M.; (2009). Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 106: 4752-4757.
8. Lahav, O.; Bar Massada, I.; Yackoubov, D.; Zelikson, R.; Mozes, N.; Tal, Y.; Tarre, S.; (2009). Quantification of anammox activity in a denitrification reactor for a recirculating aquaculture system. Aquaculture; 288, 76-82.
9. Ling, J.; Chen, S.; (2005). Impact of organic carbon on nitrification performance of different biofilters. Aquacultural Engineering; 33(2): 150-162.
10. Liu, H.; Che, X.; Zhang, Y.; (2013). Performance of sequencing microbead biofilters in a recirculating aquaculture system. Aquacult. Eng.; 52: 80-86.
11. Michaud, L.; Blancheton, J. P.; Bruni, V.; Piedrahita, R.; (2006). Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. Aquaculture

Engineering; 34: 224-233.
12. Nguyen, T. T.; Ngo, H. H.; Guo, W.; Johnston, A.; Listowski, A.; (2010). Effects of sponge size and type on the performance of an up-flow sponge bioreactor in primary treated sewage effluent treatment. Bioresource Technology; 101: 1416-1420.
13. Ohashi, A.; Viraj de Silva, D. G.; Mobarry, B.; Manem, J. A.; Stahl, D. A.; Rittman, B. E.; (1995). Influence of substrate C/N ratio on the structure of multi species biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophs. Water Science and Technology; 32: 75-84.
14. Saliling, W. J. B.; Westerman, P. W.; Losordo, T. M.; (2007). Wood chips and wheat straw as alternative biofilter media for denitrification reactors treating aquaculture and other wastewaters with high nitrate concentrations. Aquacultural Engineering; 37, 222-233.
15. Schuster, C.; Stelz, H.; (1998). Reduction in the makeup water in semi closed recirculating aquaculture systems. Aquaculture Engineering; 17: 167-174.
16. Strous, M.; Fuerst, J. H.; Kramer, E. H. M.; Logemann, S.; Muyzer, G.; van de Psa-Schoonen, K. T.; Webb, R.; Kuenen, J. G.; Jetten, M. S. M.; (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. Nature; 400: 446-449.
17. Tal, Y.; Watts, J. E. M.; Schreier, S. B.; Sowers, K. R.; Schreier, H. J.; (2003). Characterization of the microbial community and nitrogen transformation process associated with moving bed bioreactors in a closed recirculatedmariculture system. Aquaculture; 215: 187-202.
18. Tal, Y.; Watts, J. E. M.; Schreier, H. J.; (2006). Anaerobic ammonium oxidizing (Anammox) bacteria and associated activity in fixed film biofilters of a marine recirculating aquaculture system. Applied and Environmental Microbiology; 72: 2896-2904.
19. Timmons, M. B.; Ebeling, J. M.; (2007). Recirculating aquaculture. Cayuga Aqua Ventures, New York, 769 p.
20. Van Rijn, J.; (1996). The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture. Aquaculture; 139: 181-201.
21. Van Rijn, J.; Tal, Y.; Schreier, H. J.; (2006). Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. Aquaculture Engineering; 34: 364-376
22. Zhang, C.; Bishop, P.; (1994). Evaluation of tortuosity and effective diffusivities in biofilms. Water Research; 28(11): 2279-2287.
23. Zhu, S.; Chen, S.; (2002). Impact of temperature on nitrification rate in fixed film biofilters. Aquacultural Engineering; 26: 221-237.