

## Survey of nitrification dynamic and rules of different biofiltration process in aerobic biofilters

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

Abdoljabbar Irani<sup>\*1</sup>, Abdolmajid Hajimoradloo<sup>2</sup>,  
Naser Agh<sup>3</sup>, Rasul Ghorbani<sup>4</sup>

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)

عبدالجبار ایرانی<sup>\*۱</sup>، عبدالمجید حاجی مرادلو<sup>۲</sup>، ناصر آق<sup>۳</sup>،  
رسول قربانی<sup>۴</sup>

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)

### 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 biofiltration 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 biofiltration process of inorganic nitrogen wastes can be useful.

**Keywords:** anamox, biofilter, denitrification, nitrification.

### چکیده

نرخ نیتریفیکاسیون در بیوفیلترها تابع غلظت آمونیاک است و مقادیر آمونیاک با توجه به زمان غذایی 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 نیتریفیکاسیون 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 نیتریفیکاسیون 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 غذایی در ارتباط بوده است. نرخ نیتریفیکاسیون 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.

## مقدمه

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 پروتئوباکتیریا از قبیل نیتروزوموناس، نیتروباکتر و نیتروسیپرا بوده است (Juretschko *et al.*, 2000; Kloep *et al.*, 1998). 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 می‌کنند (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 آمونیاک در دسترس باکتری‌ها وابسته است و مقادیر آمونیاک ورودی به سیستم با توجه به زمان غذایی 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

در بیوفیلترها گروه‌های مختلفی از باکتری‌ها فعالیت می‌کنند. مهمترین آنها باکتری‌های نیتریفیکاسیون هستند که کاملاً هوازی و کمولیتوتروف می‌باشند (Michaud *et al.*, 2006). به فرایند تبدیل آمونیاک به نیترات، نیتریفیکاسیون می‌گویند که شامل دو مرحله است. در مرحله اول آمونیاک توسط باکتری‌های اکسیدکننده آمونیاک تبدیل به نیتريت و در مرحله دوم، نیتريت به‌وسیله باکتری‌های اکسیدکننده نیتريت تبدیل به نیترات می‌گردد (Schuster & Stelz, 1998). در نتیجه این فرایند ترکیبات سمی نیتروژن (آمونیاک و نیتريت) 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 هتروتروف غالب هستند (Ohashi *et al.*, 1995). این لایه بندی در نتیجه تکثیر نسبتاً 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 نیتريت 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

بر می‌گشت. بسترها در حجم‌های یکسان (۰/۱۲ 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 فوتومتر 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، نیتريت و نیترات، یعنی نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و آناموکس مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از هر بیوفیلتر چهار سری نمونه هر کدام با منطقه سطح ویژه ۰/۴۲ 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 (جدول ۱) به همراه ۱۰ میلی‌گرم در

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

#### بستریهای 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: تیمار ۱- کاه جو (سطح ویژه:  $345 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ): ساقه‌های کاه به اندازه حدود ۳ سانتی‌متر بریده شدند (Sailing et al., 2007). تیمار ۲- پوشال چوب (سطح ویژه:  $459 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ): 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). تیمار ۳- اسفنج (سطح ویژه:  $230 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ): اسفنج معمولی، در اندازه‌های ۲ - ۱ سانتی‌متری برش داده شدند (Nguyen et al., 2010). تیمار ۴- بستر پی وی سی (سطح ویژه:  $210 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ): 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 مجدداً به داخل تانک پرورش

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 به دست 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 زیر محاسبه 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 (در صورت وجود اختلاف معنی‌دار، تست تعقیبی دانکن) یا آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر (در صورت وجود اختلاف معنی‌دار، تست تعقیبی بونفرونی) استفاده گردید.

## نتایج

### پویایی بیوفیلتراسیون در روز ۴۶

میانگین روزانه بازده حذف نیتروژن آمونیاکی در تیمار ۳ ( $12/83 \pm 0/49$  درصد) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای ۲ و ۴ بود و کمترین مقدار آن ( $7/02 \pm 0/31$  درصد) در تیمار ۴ مشاهده گردید، که نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد ( $p < 0/05$ ). 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 نیتريت 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، نیتريت و نیترات در این بطری‌ها اندازه‌گیری گردید.

جدول ۱. ترکیب شیمیایی آب غنی شده به کار رفته در تحقیق حاضر (زو و چن، ۱۹۹۹)

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

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

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

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

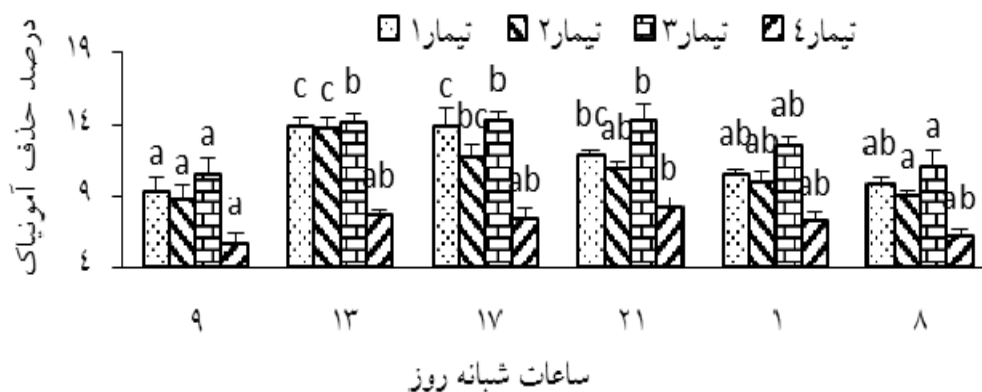
حذف در ساعت ۲۱ (۸/۱۸ درصد) به طور معنی داری بیشتر از ساعت ۹ بود ( $p < 0.05$ ). از نظر نرخ حذف حجمی نیتروژن آمونیاکی کل بین هیچکدام از تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده نگردید (جدول ۲)، ولی از نظر نرخ حذف به ازاء واحد سطح بیوفیلتر، تیمارهای ۳ و ۴ (به ترتیب  $173/97 \pm 13$  و  $203/65 \pm 17/18$  میلی گرم بر مترمربع در روز) نسبت به تیمارهای ۱ و ۲ به طور معنی داری مقادیر بیشتری داشتند ( $p < 0.05$ ).

تیمار ۱، بازده حذف در ساعات ۱۳ و ۱۷ ( $13/95$  درصد) نسبت به ساعات ۹، ۱ و ۸ اختلاف معنی داری نشان داد. در تیمار ۲، بازده حذف در ساعات ۱۳ و ۱۷ (به ترتیب  $13/7$  و  $11/82$  درصد) به طور معنی داری از ساعات ۹ و ۸ بیشتر بود. در تیمار ۳ بازده حذف ساعات ۱۳، ۱۷ و ۲۱ (به ترتیب  $14/16$ ،  $14/36$  و  $14/23$  درصد) نسبت به ساعات ۹ و ۸ اختلاف معنی داری نشان داد (شکل ۴-۱۲). در تیمار ۴ بازده

جدول ۲. میانگین روزانه درصد حذف نیتروژن آمونیاکی، نرخ حذف حجمی و نرخ حذف به ازاء واحد سطح ویژه بیوفیلتر در روز ۴۶ دوره تحقیق\*

تیمار	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
بازده حذف (درصد)	$11/59 \pm 0/51^{cb}$	$10/7 \pm 0/49^b$	$12/83 \pm 0/49^c$	$7/02 \pm 0/31^a$
نرخ حذف حجمی***	$38/25 \pm 3/18^a$	$40/88 \pm 4/19^a$	$40/01 \pm 2/99^a$	$36/32 \pm 3/06^a$
نرخ حذف به ازاء سطح***	$110/88 \pm 9/23^b$	$89/04 \pm 9/13^a$	$173/97 \pm 13^c$	$203/65 \pm 17/18^c$

\* در هر ردیف حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است ( $p < 0.05$ ). \*\* حذف روزانه نیتروژن آمونیاکی کل (گرم) توسط یک مترمکعب حجم بیوفیلتر\*\*\* حذف روزانه نیتروژن آمونیاکی کل (میلی گرم) به ازاء هر مترمربع سطح ویژه بیوفیلتر



شکل ۱. پویایی نیتروفیکاسیونی بیوفیلترها در روز ۴۶ دوره تحقیق. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار هستند. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار ( $p < 0.05$ ) در هر تیمار می باشد.

حذف در ساعات ۱۷ و ۲۱ (به ترتیب  $23/71$  و  $25/51$  درصد) به طور معنی داری بیشتر از سایر ساعات شبانه روز بود. در تیمار ۲ بازده حذف در ساعت ۱۷ ( $20/66$  درصد) به طور معنی داری بیشتری ساعات ۹، ۱ و ۸ بود و بازده حذف در ساعات ۹ و ۸ ( $12/32$  و  $12/53$  درصد) به طور معنی داری از سایر تیمارها کمتر بود ( $p < 0.05$ ). در تیمار ۳ بازده حذف در ساعات ۱۳، ۱۷

#### پویایی بیوفیلتراسیون در روز ۶۱

بررسی پویایی بیوفیلترها در روز ۶۱ (جدول ۳) نشان داد که میانگین روزانه بازده حذف نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای ۱ و ۳ (به ترتیب  $19/45 \pm 0/41$  و  $19/98 \pm 0/52$  درصد) به طور معنی داری بیشتر از تیمارهای ۲ و ۴ (به ترتیب  $16/79 \pm 0/49$  و  $6/66 \pm 0/24$  درصد) بود ( $p < 0.05$ ). در تیمار ۱ بازده

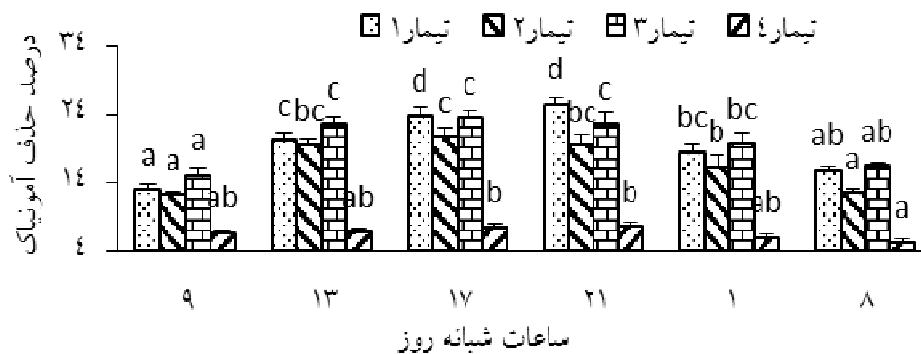
داد. کمترین مقدار آن  $(45/05 \pm 4/19)$  گرم بر مترمکعب در روز) مربوط به تیمار ۴ بود که نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت ( $p < 0/05$ ). از نظر نرخ حذف نیتروژن آمونیاکی به ازاء واحد سطح بیوفیلتر همه تیمارها باهم اختلاف معنی‌دار نشان دادند ( $p < 0/05$ ) و تیمار ۳  $(288/03 \pm 24/94)$  میلی‌گرم بر مترمربع در روز) و تیمار ۲  $(131/62 \pm 13/82)$  میلی‌گرم بر مترمربع در روز) به ترتیب بیشترین و کمترین میانگین روزانه را به خود اختصاص دادند (جدول ۳).

و ۲۱ (به ترتیب ۲۲/۵۶ و ۲۳/۴۵، ۲۲/۵۳ درصد) نسبت به ساعات ۹ و ۸ به‌طور معنی‌داری بیشتر بود، ولی اختلاف آماری باهم نداشتند ( $p < 0/05$ ). 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 (شکل ۴-۱۳)، ولی در سایر ساعات اختلاف آماری مشاهده نگردید ( $p < 0/05$ ). میانگین نرخ حذف حجمی در تیمار ۳  $(66/25 \pm 5/74)$  گرم بر مترمکعب در روز) بیشتر از سایر تیمارها بود و نسبت به تیمارهای ۱ و ۴ اختلاف معنی‌داری نشان

**جدول ۳.** میانگین روزانه درصد حذف نیتروژن آمونیاکی، نرخ حذف حجمی و نرخ حذف به ازاء واحد سطح ویژه بیوفیلتر در روز ۶۱ دوره تحقیق\*

تیمار	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
بازده حذف (درصد)	$19/45 \pm 0/41^c$	$16/79 \pm 0/49^b$	$19/98 \pm 0/53^c$	$6/66 \pm 0/24^a$
نرخ حذف حجمی**	$58/66 \pm 5/67^c$	$60/44 \pm 6/35^{cd}$	$66/25 \pm 5/74^d$	$45/05 \pm 4/19^a$
نرخ حذف به ازاء سطح***	$170/02 \pm 16/43^b$	$131/62 \pm 13/82^a$	$288/03 \pm 24/94^d$	$252/62 \pm 23/5^c$

\* در هر ردیف حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ( $p < 0/05$ ). \*\* 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 ۲.** پویایی نیتریفیکاسیونی بیوفیلترها در روز ۶۱ دوره تحقیق. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار هستند. حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) در هر تیمار می‌باشد

۲ و ۴ (به ترتیب  $292/74 \pm 7/05$  و  $317/86 \pm 2/99$  میلی‌گرم نیتروژن آمونیاکی بر مترمربع در روز) بود و نرخ نیتریفیکاسیونی تیمار ۲ به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود ( $p < 0/05$ ).

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

**بررسی فعالیت نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون و آناموکس**

بررسی بسترهای مورد آزمایش با سطح ویژه یکسان نشان داد که نرخ نیتریفیکاسیون در تیمار ۳ میلی‌گرم نیتروژن آمونیاکی بر مترمربع در روز) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای

آناموکس ( $70/95 \pm 3/96$  میلی گرم بر مترمربع در روز) در تیمار ۳ اتفاق افتاد که نسبت به تیمارهای ۲ و ۴ اختلاف معنی داری نشان داد و کمترین مقدار آن مربوط به تیمار ۴ ( $33/09 \pm 6/08$  میلی گرم بر مترمربع در روز) بود، که فقط با تیمار ۲ اختلاف معنی دار نشان نداد ( $p < 0/05$ ). بیشترین نرخ حذف نیتروژن نیتريت مربوط به فرایند آناموکس مربوط به تیمار ۳ نسبت به تیمارهای ۲ و ۴ اختلاف معنی داری نشان داد ( $p < 0/05$ ) و کمترین مقدار آن ( $29/64 \pm 7/94$  میلی گرم بر مترمربع در روز) مربوط به تیمار ۴ بود (جدول ۴).

این آزمایش با حضور و بدون حضور استات (به عنوان منبع کربن) انجام شد. در حضور استات، نرخ دنیتریفیکاسیون در همه تیمارها اختلاف معنی داری نشان داد ( $p < 0/05$ )، به طوری که بیشترین و کمترین مقدار (به ترتیب  $10/67 \pm 10/59$  و  $65/0 \pm 8/52$  میلی گرم نیتروژن نترات بر مترمربع در روز) مربوط به تیمارهای ۳ و ۴ بود (جدول ۴). بدون حضور استات بیشترین نرخ دنیتریفیکاسیون در تیمارهای ۱ و ۲ (به ترتیب  $9/38 \pm 9/10$  و  $63/81 \pm 6/41$  میلی گرم بر مترمربع در روز) اتفاق افتاد، که نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی داری نشان دادند ( $p < 0/05$ ). بیشترین نرخ حذف نیتروژن آمونیاکی طی فرایند

جدول ۴. نرخ حذف نیتروژن آمونیاکی کل، نیتريت و نترات (میلی گرم بر مترمربع در روز) در شرایط مختلف\*

تیمار	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
نیتریفیکاسیون	$321/91 \pm 5/06^{bc}$	$292/74 \pm 7/05^a$	$334/88 \pm 2/89^c$	$317/86 \pm 2/99^b$
دنیتریفیکاسیون با استات	$246/91 \pm 12/87^c$	$186/43 \pm 11/15^b$	$255/59 \pm 10/67^c$	$65/0 \pm 8/52^a$
دنیتریفیکاسیون بدون استات	$98/10 \pm 9/38^c$	$63/81 \pm 6/41^b$	$31/91 \pm 4/43^a$	$12/02 \pm 4/4^a$
آناموکس - نرخ حذف آمونیاک	$55/12 \pm 3/54^{bc}$	$42/85 \pm 8/1^{ab}$	$70/95 \pm 3/96^c$	$33/09 \pm 6/08^a$
آناموکس - نرخ حذف نیتريت	$60/59 \pm 3/4^{bc}$	$46/9 \pm 4/98^{ab}$	$66/55 \pm 4/65^c$	$29/64 \pm 7/94^a$

\* در هر ردیف حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است ( $p < 0/05$ ). مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار هستند.

به طور قابل توجهی بیشتر از روز ۴۶ می باشد، دلیل این امر نیز به افزایش تولید آمونیاک ناشی از افزایش غذادهی مربوط می باشد. در بیوفیلتر پی وی سی تغییرات شبانه روزی نرخ نیتریفیکاسیون کمتر از سایر تیمارها بود. به نظر می رسد این بیوفیلتر به حداکثر ظرفیت خود (برای افزایش جمعیت باکتری های نیتريفایر) نزدیک شده است. چراکه اگر غلظت های آمونیاک نسبت به جمعیت باکتری های نیتريفایر به اندازه کافی وجود داشته باشد، افزایش آمونیاک تأثیر چندانی در نرخ نیتريفیکاسیون نخواهد گذاشت (Tchobanaglou et al., 2003).

با وجودی که در سال های اخیر روی بیوفیلترهای سیستم های آبی پروری تحقیقات متعددی انجام شده، اطلاعات کمی در زمینه اجتماعات تشکیل

## بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، در طول روز مقادیر بازده حذف، نرخ حذف به ازای سطح و نرخ حذف حجمی نیتروژن آمونیاکی افزایش پیدا کرد، به طوری که نرخ نیتريفیکاسیون طی روز تا ساعت ۲۱ نسبت به ساعات اوایل صبح و اواسط شب به طور قابل توجهی بیشتر بود، که نشان دهنده تغییرات تولید و دفع آمونیاک توسط ماهیان در ساعات مختلف شبانه روز (با توجه به زمان غذادهی) می باشد، چراکه واکنش نیتريفیکاسیونی باکتری های نیتريفایر، به غلظت آمونیاک موجود در دسترس بیوفیلم بستگی دارد (Zhou & Chen, 2002). از طرف دیگر مقایسه پویایی بیوفیلتراسیون در روزهای ۴۶ و ۶۱ نشان داد که در روز ۶۱ افزایش نرخ نیتريفیکاسیون در طول روز

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 ارائه شده برای بیوفیلترهای مستقر در سیستم (میانگین به دست آمده در روز ۶۱ به ترتیب 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 (به ترتیب 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 بی‌هوایی نشان داد که حتی بدون حضور منبع کربن خارجی امکان فعالیت نیتریفیکاسیون 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 نیتریفیکاسیون در پوشال چوب نسبت به اسفنج و پی‌وی‌سی به ترتیب حدود ۲ و ۳ برابر بیشتر بود. باکتری‌های هتروتروف دخیل در فرایند نیتریفیکاسیون 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 نیتریفیکاسیون نشان ندادند و تنها زمانی که مقادیر نیترات را تا ۱۳۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش دادند، اندکی فعالیت نیتریفیکاسیون وجود داشت.

در تحقیق حاضر در حضور استات فعالیت نیتریفیکاسیونی قابل توجه‌ای انجام شد، که نشان‌دهنده حضور و فعالیت اجتماع بزرگ نیتریفایرها در بیوفیلترهای بررسی شده می‌باشد. Tal et al. (2003) نرخ نیتریفیکاسیون 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 بی‌هوایی ممکن است در بیوفیلترها انجام شود، آناموکس است. فرایندی که آمونیاک به وسیله نیتريت 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 نیتريت به جای اکسیژن، به‌عنوان پذیرنده الکترون و از CO<sub>2</sub> 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



فعالیت نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون پائین بود (۳۳/۰۹-۷۰/۹۵) میلی‌گرم بر مترمربع در روز نرخ حذف آمونیاک و ۲۹/۶۴-۶۶/۵۵ میلی‌گرم بر مترمربع در روز نرخ حذف نیتريت). ولی این مقادیر نسبت به مقادیر گزارش شده توسط Tal *et al.* (2003) برای بیوفیلتر بستر متحرک (۶/۹۶-۷/۹۲) میلی‌گرم نیتروژن آمونیاکی و ۷/۹۲ میلی‌گرم نیتروژن نیتريت 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.

ماهی به‌وسیله باکتری‌های اکسید کننده آمونیاک در شرایط هوازای به نیتريت تبدیل می‌گردد. سپس نیتريت تولید شده به‌همراه باقیمانده آمونیاک توسط باکتری‌های آناموکس در بخش بی‌هوازای بیوفیلتر به ازت گازی تبدیل می‌گردد. بنابراین آمونیاک و نیتريت 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

## 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.; García, 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 *Nitospira*-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.; Wobken, 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 recirculated mariculture 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.