

مقایسه عملکرد کربن فعال حاوی کشت باکتریایی و زئولیت (کلینوپتیلولیت) در حذف آمونیاک از پساب سیستم حمل بچه ماهی زنده قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

هادی پورباقر^{۱*}، سهیل ایگدیری^۲، محمد هرسیج^۳، امیرحسین حمیدیان^۴
۱. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۲. استادیار، گروه منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس
۳. استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۴. تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۲۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۲/۱۲

چکیده

تغییرات کیفیت آب، به ویژه افزایش غلظت آمونیاک، ممکن است به مرگ آبزیان منجر شود. این تحقیق به منظور مقایسه عملکرد کربن فعال حاوی کشت باکتریایی و زئولیت در حذف آمونیاک (نیترژن کل آمونیاکی TAN) از پساب یک سیستم حمل بچه ماهی قزل آلاهی رنگین کمان در کیسه های پلاستیکی ۴۰ لیتری انجام شد. میزان حذف آمونیاک در غلظت های تیمارهای حذف کننده آمونیاک ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم در لیتر طی دو زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت و با سه تراکم ۲۰، ۵۰ و ۸۰ بچه ماهی در هر کیسه مورد سنجش قرار گرفت. افزایش میزان حذف کننده های آمونیاک، تراکم ماهی و زمان، به طور معنی داری، به ترتیب سبب کاهش، افزایش و افزایش TAN می شود ($P < 0.001$). در این آزمایش اثر تراکم و زمان بسیار مشهود بود. بین زئولیت و کربن فعال حاوی کشت باکتریایی در حذف TAN، تفاوت بسیار معنی داری یافت شد ($P < 0.001$). زئولیت، در مقایسه با کربن فعال، نتایج رضایت بخش تری را نشان داد.

واژگان کلیدی

آمونیاک، تراکم، زئولیت، کربن فعال.

۱. مقدمه

کلینوپتیلولیت در کیسه های پلاستیکی حمل ماهیان زنده به کار گرفته شده و در حذف آمونیاک مؤثر بوده است (Turner & Bower, 1982). در زمان استفاده از زئولیت به آماده سازی پیش از استفاده نیاز نیست، اما کربن فعال به ارزان تر از کربن فعال است؛ از این رو، این تحقیق به منظور مقایسه تأثیر زئولیت و کربن فعال، در شرایط یکسان، از پساب یک سیستم حمل ماهی زنده انجام شد تا بتوانیم درک بهتری از روش های مؤثرتر در حذف آمونیاک از پساب سیستم های پرورش ماهی، به ویژه در طول فرآیند حمل ماهی زنده، به دست آوریم.

۲. مواد و روش ها

۱.۲. کشت باکتری روی زغال فعال

برای کشت باکتری های نیتريت کننده روی زغال فعال، از آکواریوم های شیشه ای مجهز به سنگ هوا و بخاری آکواریومی استفاده شد. برای این منظور، آکواریوم با نیم لیتر پساب حاصل از یک کانال پرورش قزل آلا پر شد و مطابق پروتکل Turner و همکاران (1982)، کلرید آمونیوم به مثابه منبع آمونیوم به آب افزوده شد تا باکتری ها بتوانند به ظرفیت اکسیداسیون ۵ میلی گرم بر لیتر TAN (مجموع نیتروژن آمونیومی) در ۲۴ ساعت برسند. درجه حرارت آب بین ۲۲-۲۴ درجه سانتی گراد ثابت نگه داشته شد. با توجه به اینکه pH آب حدود ۸ بود، هیچ گونه بافری به آب آکواریوم اضافه نشد. برای تسریع رشد باکتریایی روی کربن فعال، آنها به صورت غوطه ور در مخازن فیلتر آکواریوم (مجرای فیلتر) قرار داده شدند، به نحوی که آب بتواند از بین قطعات کربن فعال عبور کند (Landau, 1992). پس از استقرار سیستم و آماده شدن کشت باکتریایی، دمای آب به تدریج به محدوده ۱۳-۱۵ درجه سانتی گراد کاهش داده شد تا باکتری ها بتوانند با دمای آزمایش سازگار شوند.

۲.۲. اجرای آزمایش

کربن فعال و زئولیت مورد استفاده در این آزمایش درجه بندی شدند و قطر متوسط آنها بین ۱-۲ میلی متر بود. زئولیت (کلینوپتیلولیت) مورد استفاده محصول شرکت افرند توسکا بود. کیسه های پلاستیکی مورد

پساب آمونیومی ناشی از کشاورزی و آبی پروری ممکن است سبب یوتروفیکاسیون آب های دریافت کننده شود و به واسطه سمی بودن، حتی در غلظت های پایین نیز ممکن است اثرهای منفی ای بر بافت ها و فاکتورهای فیزیولوژیکی ماهی و سایر آبزیان، از قبیل نرخ رشد، میزان مصرف اکسیژن و مقاومت در برابر بیماری، داشته باشد (Piper & Smith, 1984; Berka, 1986). در سیستم های پرورشی و حمل ماهی و سایر آبزیان، آمونیوم به واسطه متابولیسم پروتئین و فعالیت باکتریایی مواد دفعی تولید می شود (Boyd & Tucker 1998; Zhang & Perschbacher, 2003). افزایش غلظت آمونیوم در طول حمل یکی از چالش های اصلی در سیستم حمل بچه ماهی زنده قزل آلاست. امروزه، برای کاهش غلظت آن طی حمل ماهی، از دو روش ۱. کاهش نرخ تولید نیتروژن از طریق سرد کردن آب، سکون و گرسنه نگه داشتن ماهیان قبل از انتقال و ۲. حذف آمونیوم تولید شده طی فرآیند تبادل یونی یا نیتریفیکاسیون باکتریایی استفاده می شود (Philips & Brockway, 1954; Amend et al., 1982; Teo et al., 1989; Chiayvareesajja & Boyd 1993; Cole et al. 1999; Emadi et al., 2001).

تبادل یونی فرآیندی است که طی آن یون های خاص یک ماده با یون های مورد نظر آب تبادل می کند. رزین های مصنوعی و طبیعی متعددی برای حذف آمونیوم با استفاده از تبادل یونی در دسترس اند که زئولیت کلینوپتیلولیت (Clinoptilolite) از جمله مؤثرترین رزین های طبیعی برای این منظور است. در ضمن، فرآیند نیتریفیکاسیون فرآیند دومرحله ای اکسیداسیون آمونیوم است که توسط باکتری های اتوتروف انجام می پذیرد (Turner & Bower, Zhang & Perschbacher, 2003)؛ در این روش، از موادی از قبیل کربن فعال، پوسته صدف، سنگ، ماسه و غیره به مثابه بستر باکتریایی استفاده می شود که در این بین کربن فعال بیشترین سطح استقرار باکتریایی را، با حدود یک میلیون میلی مترمربع به ازای هر کیلوگرم از آن، فراهم می کند (Wheaton, 1977). از آنجایی که کربن فعال به تنهایی در فرآیند نیتریفیکاسیون هیچ نقشی ندارد، نیاز است، قبل از استفاده، باکتری ها روی آنها استقرار یابند.

۳. نتایج

بین میزان باقیمانده TAN در کلیه تیمارها در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت تفاوت معنی‌داری یافت شد ($P < 0.001$) و این میزان در زمان ۲۴ ساعت تقریباً دو برابر زمان ۱۲ ساعت بود. همچنین بین تراکم‌های گوناگون (۲۰ و ۵۰ و ۸۰ عدد در هر کیسه حمل ماهی) تفاوت بسیار معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.001$)؛ بدین معنی که با افزایش تراکم، میزان باقیمانده آمونیاک نیز افزایش یافت (شکل ۱).

نتایج این تحقیق نشان داد که کیسه‌های حاوی ژئولیت، به‌طور معنی‌دار، TAN بیشتری را در مقایسه با کربن فعال حاوی کشت باکتریایی جذب کرده‌اند ($P < 0.001$). بین میزان مواد جذب‌کننده آمونیاک نیز تفاوت معنی‌دار بسیار بالایی وجود داشت ($P < 0.001$)؛ بدین معنی که با افزایش میزان ژئولیت و کربن فعال حاوی کشت باکتریایی، میزان جذب TAN افزایش یافت. بالاترین میزان جذب آمونیاک در سطوح ۱۵ گرم در لیتر مواد جذب‌کننده آمونیاک حاصل شد. افزایش میزان هر دو جذب‌کننده آمونیاک (ژئولیت و کربن فعال) در ۱۵ گرم در لیتر افزایش چشمگیری را در جذب TAN، در مقایسه با ۱۰ گرم در لیتر، نشان نداد. در طول دوره آزمایش تلفاتی دیده نشد. pH کیسه‌های حمل حاوی کربن فعال دارای کشت باکتریایی و ژئولیت، در انتهای دوره آزمایش، به‌ترتیب کمتر از ۷ ($6-6/5$) و بین ۷-۸ ثبت شد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

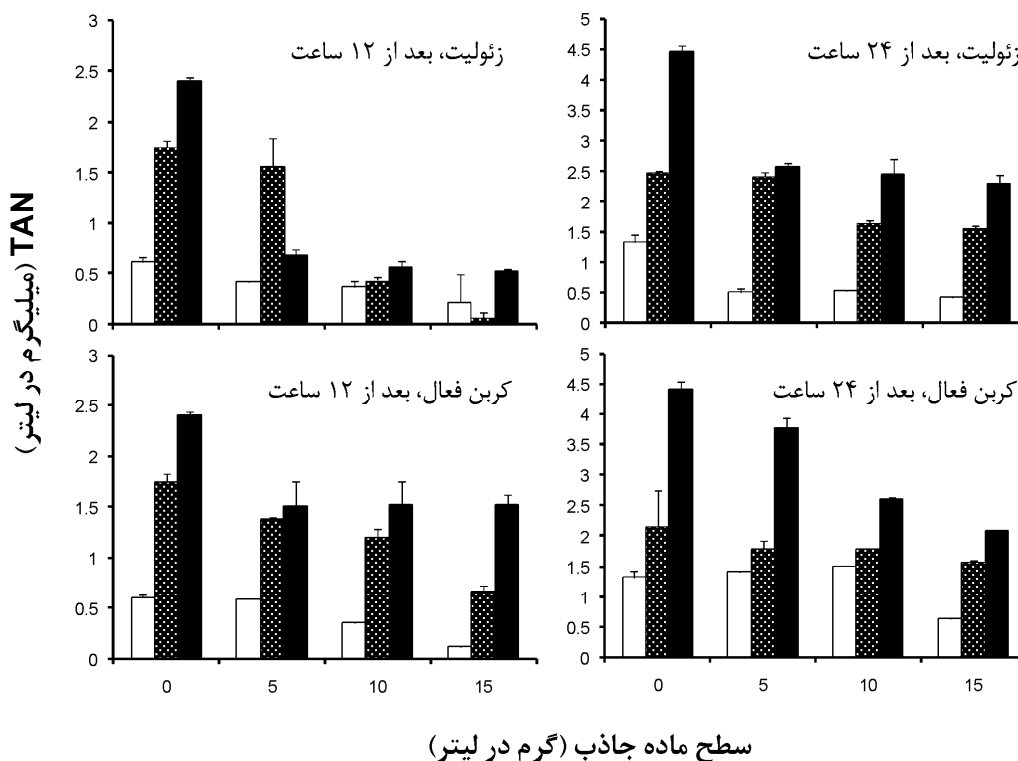
تفاوت میزان TAN باقیمانده در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت در کلیه تیمارها نشان داد که کوتاه‌کردن زمان حمل ماهی روش مطمئنی برای کاهش غلظت آمونیاک در کیسه‌های حمل ماهی است و باید راهکاری مهم در نظر گرفته شود. ازسوی دیگر، افزایش میزان آمونیاک کل با افزایش تراکم در این آزمایش، مسلماً، ضرورت کاهش تعداد بچه‌ماهیان را به‌منظور کاهش سطوح آمونیاک نشان می‌دهد. به‌عبارت دیگر، پرورش‌دهندگان می‌توانند با کاهش تراکم بچه‌ماهی حمل مطمئنی داشته باشند، اما کاهش زمان حمل همیشه امکان‌پذیر نیست.

استفاده برای حمل ماهی نیز دولایه در ابعاد 60×90 سانتی‌متر بودند (Woyanarovich & Horvath, 1980). به هر کیسه پلاستیکی حمل ماهی ۲۰ لیتر آب رودخانه اضافه شد که حاوی مقداری آب کانال‌های پرورشی نیز بود. دمای طبیعی آب بین ۱۳-۱۵ درجه سانتی‌گراد و گونه مورد استفاده در این آزمایش بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ۴ گرمی ($0.3 \text{ g } [\bar{x} \pm SD]$) بود که برای تخلیه محتوای روده آنها، تغذیه‌شان 24 ± 4 ساعت قبل از شروع آزمایش متوقف شده بود.

سه تیمار حاوی ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم در لیتر، هم برای ژئولیت و هم کربن فعال حاوی کشت باکتریایی، به همراه تیمار شاهد، برای آزمایش انتخاب شدند و برای هر تیمار نیز از سه تراکم، به ترتیب حاوی ۲۰، ۵۰ و ۸۰ عدد بچه‌ماهی، با سه تکرار استفاده شد. به‌دلیل احتمال تأثیر زیان‌بار بافرها روی باکتری‌های نیتريت‌کننده، هیچ‌گونه بافری به تیمارها اضافه نشد. پس از انتقال ماهیان به کیسه‌های حمل ماهی، بقیه حجم کیسه‌ها با تزریق اکسیژن خالص پر شد و سپس کیسه‌ها در آب سرد (۱۳-۱۵ درجه سانتی‌گراد) کانال‌های پرورش قرار داده شدند. به‌ترتیب، پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از استقرار ماهیان، نمونه ۱۰۰ میلی‌لیتری آب از کیسه‌های محل ماهی گرفته شد و در بطری‌های تیره حاوی اسید سولفوریک ریخته شد تا pH آن به ۲ کاهش یابد. بطری‌های حاوی نمونه‌های آب در یخ، برای اندازه‌گیری‌های عوامل فیزیوشیمیایی بعدی، به یخچال (۴- درجه سانتی‌گراد) انتقال یافتند. میزان TAN (کل نیتروژن آمونیاکی) نمونه‌ها با استفاده از روش غیرمستقیم نسلریزاسیون (Indirect Nesslerisation) (Clesceri *et al.*, 1989) اندازه‌گیری شدند.

۳.۲. تحلیل آماری

طرح آزمایش در این تحقیق اسپلیت-اسپلیت پلات در زمان با سه تکرار بود و تفاوت آماری بین مقادیر میانگین تیمارهای گوناگون با آزمون دانکن و نرم‌افزار SPSS تعیین شد. نرمال‌بودن و همگنی واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون‌های Kolmogorov-Smirnov بررسی شد (Zar, 1974). به‌دلیل فقدان نرمالیت تمام داده از روش تغییر شکل Box-Cox استفاده شد.



شکل ۱. تغییرات غلظت TAN (+ SD) در سطوح گوناگون ماده جاذب بعد از ۱۲ و ۲۴ ساعت حمل شبیه سازی شده (ستون های سفید، هاشورزده و تیره، به ترتیب، تراکم های ۲۰،۵۰ و ۸۰ عدد بچه ماهی)

دارد، در کیسه های حاوی کربن فعال، بازدارندگی نیتریفیکاسیون در زیر $pH=7$ تا حدودی شروع شد و این می توانست به کاهش کارایی آن در حذف آمونیاک منجر شود. در pH زیر $7/3-8$ رشد باکتری ها کاهش می یابد، به طوری که این فرآیند در pH زیر ۶ متوقف می شود (Allison & Prosser, 2003). با وجود این، برخی از سویه های باکتری های نیتريت کننده در pH زیر $6/5$ بیشترین میزان یونیزاسیون آمونیاک را دارند (Kumari et al., 2011). در ضمن، با توجه به اینکه نیتریفیکاسیون فرآیندی اکسیژن خواه است (Bower & Belser & Schmidt, 1978; Turner, 1982)، کاهش اکسیژن در کیسه ها نیز ممکن است به کاهش این فرآیند منجر شود.

علی رغم افزایش میزان جذب کننده های آمونیاک در تیمارها، جذب آمونیاک به نسبت افزایش میزان این جاذب ها افزایش چشمگیری نیافت. این امر ممکن است به دلیل کاهش آمونیاک آب باشد، چراکه با افزایش میزان جاذب ها، آمونیاک به شدت کاهش یافته و همراه با

پایین بودن میزان جذب TAN در کشت باکتریایی، در مقایسه با ژئولیت، ممکن است به عوامل گوناگونی بستگی داشته باشد، زیرا نیتریفیکاسیون فرآیندی بیولوژیکی است و تحت تأثیر عوامل گوناگون محیطی به ویژه درجه حرارت است (Turner & Bower, 1982). از آنجایی که درجه حرارت آب مورد استفاده برای حمل ماهیان $13-15$ درجه سانتی گراد و کمتر از دامنه دمایی اپتیمم برای فرآیند نیتریفیکاسیون بود، ممکن است این امر دلیل پایین بودن کارایی این فرآیند باشد. به طور معمول، دامنه دمایی اپتیمم برای رشد باکتری های نیتريت کننده و فرآیند نیتریفیکاسیون بین $25-30$ درجه سانتی گراد گزارش شده است و با کاهش دما به حدود 18 درجه سانتی گراد، این فرآیند با کاهش 50 درصدی مواجه خواهد شد (Berounsky & Nixon, 1993).

به علاوه، pH کیسه های حمل حاوی کربن فعال دارای کشت باکتریایی، بعد از دوره ای معین، کمتر از 7 بود. با توجه به اینکه pH اپتیمم برای نیتریفیکاسیون به طور معمول در بخش قلیایی ($pH < 7$) قرار

حرارت پایین تر حتی ممکن است به ۶۰ روز نیز برسد (Turner & Bower, 1981).

جذب آمونیاک توسط ژئولیت به درجه حرارت بستگی ندارد، اما این فرآیند در کربن فعال حاوی کشت باکتریایی فرآیندی بیولوژیکی به شرایط محیطی مناسب از قبیل درجه حرارت و pH وابسته است (Bower, 1981). ژئولیت از کربن فعال ارزان تر است و می تواند دوباره توسط آب شور ۲ درصد با pH=۱۲ برای استفاده مجدد بازیابی شود (Horsch & Holway, 1984). با وجود این، علی رغم پایین بودن pH در زیر ۷، در کیسه های حاوی کربن فعال، کمیت آمونیاک کاهش می یابد. در نتیجه، هم کیسه های حاوی ژئولیت و هم کربن فعال دارای معایب و محاسن خاص خودند، اما ارزانی و سهولت استفاده از ژئولیت می تواند آن را به کاندید بهتری در حمل و نقل ماهیان زنده تبدیل کند.

۵. تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب سپاسگزاری خود را به کارشناسان محترم کارگاه پرورش قزل آلابی جاجرود، به ویژه مهندسان رستگار، اندرخواه و جاذبی زاده، عنوان می دارند. پژوهش حاضر با حمایت مالی شرکت صنایع آبرزی پژوهان آریا صورت گرفته و بدین وسیله مراتب سپاسگزاری به هیئت مدیره این شرکت به خصوص جناب آقای دکتر محمد رستگاری ابراز می شود.

آن احتمال تماس آمونیاک با جاذب ها نیز کاهش می یابد. از سوی دیگر، از آنجایی که جاذب ها در کف کیسه های حمل ماهی قرار داشتند، تماس مناسبی با آمونیاک آب تصور پذیر نبود. بنابراین این احتمال وجود دارد که افزایش میزان جذب کننده آمونیاک نتوانسته سبب حذف کامل آمونیاک در کیسه ها شود. در شرایط حقیقی، با به هم خوردن کیسه ها و در نتیجه گردش آب ممکن است نتیجه بهتری با میزان بالایی از جاذب های آمونیاک حاصل شود.

تفاوت در نتایج حاصله بین ژئولیت و کربن فعال حاوی کشت باکتریایی ممکن است نشان دهنده برتر بودن ژئولیت نباشد و این امر به شرایط نامناسب محیطی مربوط باشد، زیرا باکتری های نیتريت کننده، به مثابه شیمولیتوتروف های اجباری با دوره طولانی تکثیر (به دلیل بازده پایین در واکنش اکسیداسیون)، به شدت تحت تأثیر فاکتورهای محیطی اند (Belser & Schmidt, 1978). بنابراین، در شرایط محیطی مناسب، کربن فعال با کیفیت بهتر و سوبه های باکتریایی مؤثر (با دوره تکثیر سریع تر و فعالیت در pH کمتر) ممکن است حتی بهتر از ژئولیت عمل کند.

در کل، ژئولیت، در مقایسه با کربن فعال، به مثابه ماده ای مؤثر برای کاهش TAN در طول فرآیند حمل ماهی زنده مزایایی دارد. برای مثال، ژئولیت، برخلاف کربن فعال، نیازی به فراهم کردن شرایط مناسب کشت باکتریایی قبل از استفاده ندارد و از سوی دیگر، فراهم آوردن شرایط مناسب برای کربن فعال به زمان طولانی در دمای اپتیمم (۲۰-۲۲ درجه سانتی گراد) برای کشت باکتریایی نیاز دارد و این زمان در درجه

REFERENCES

- Allison, S.M., Prosser, J.I (2003) "Ammonia oxidation at low pH by attached populations of nitrifying bacteria," *Soil Biology and Biochemistry*, 25: 935-941.
- Amend, D.F., Croy, T.R., Goven, B.A., Johnson, K.A., McCarthy, D.H (1982) "Transportation of fish in closed systems: methods to control ammonia, carbon dioxide, pH, and bacterial growth," *Transactions of the American Fisheries Society*, 111: 603-611.
- Belser, L.W., Schmidt, E.L (1978) "Diversity in the ammonium-oxidizing nitrifier population," *Applied Environmental Microbiology*, 36: 584-588.
- Berka, R (1986) "The transport of live fish," a review. EIFAC Tech. Pap., (48) 52p.
- Berounsky, V.M., Nixon, S.W (1993) "Rates of nitrification along an estuarine gradient in Narragansett Bay," *Estuaries*, 16: 718-730.
- Bower, C.E., Turner, D.T (1981) "Accelerated nitrification in new seawater culture systems," *Aquaculture*, 24: 1-9.
- (1982) "Ammonia removal by clinoptilolite in the transport of ornamental freshwater fishes," *Progress in Fish Culture*, 4(1):19-23.

8. Boyd, C.E., Tucker, C.S (1998) *Pond aquaculture water quality management*, Boston, Kluwer Academic Publishers.
9. Chiayvareesajja, S., Boyd, C.E (1993) "Effects of zeolite, formalin, bacterial augmentation, and aeration on total ammonia nitrogen concentrations," *Aquaculture*, 116: 33-45.
10. Clesceri, L.S., Greenberg A.E., Trussell R.R (1989) *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 17th edition. DHA-AWWA-WPCK. Washington D.C.
11. Cole, B., Tamaru, C.S., Bailey, R., Brown, C., Ako, H (1999) "Shipping practices in the ornamental fish industry," Center for Tropical and Subtropical Aquaculture publication number 131.
12. Emadi, H., Nezhad, J.E., Poorbagher, H (2001) "In vitro comparison of zeolite (clinoptilolite) and activated carbon as ammonia absorbents in fish culture," *The ICLARM Quarterly, Naga*, 24: 18-20.
13. Froese, R (1986) "How to transport live fish in plastic bags," *Infofish Marketing Digest*, (4): 35-36.
14. Horsch, M.C., Holway, J.E (1984) "Use of clinoptilolite for salmon rearing," In: Pond, W.G., Mumpton, F.A. (Eds.), *Zeo-agriculture, use of natural zeolites in agriculture and aquaculture*, Western Press, p. 235-243
15. Landau, M (1992) *Introduction to aquaculture*, John Wiley and Sons Inc, Singapore, 440.
16. Kumari, V., Rathore, G., Chauhan, U.K., Pandey, A.K., Lakra, W.S (2011) "Seasonal variations in abundance of nitrifying bacteria in fish pond ecosystem," *Journal of Environmental Biology*, 32: 153-159.
17. Lawson, T.B (1994) *Fundamental of aquacultural engineering*, Chapman and Hall, 355.
18. Martin, M (1980) "Plastic bag hauling of small live fish," *Aquaculture Magazine*, 7(1): 40.
19. Martin, M (1981) "Plastic bag hauling of small live fish," *Aquaculture Magazine*, 7(2): 42.
20. Philips, A.M., Brockway, D.R (1954) "Effect of starvation, water temperature, and sodium amytal on the metabolic rate of brook trout," *Progress in Fish Culture*, 16: 65-68.
21. Piper, R.G., Smith, C.E (1984) "Use of clinptilolite for ammonia removal in fish culture system," In: Pond, W.G., Mumpton, F.A. (Eds.), *Zeo-agriculture, use of natural zeolites in agriculture and aquaculture*, Western Press, 224-234.
22. Swann, L (1993) Transportation of fish in bags North Central Regional Aquaculture Center Fact Sheet Series #104.
23. Teo, L.H., Chen, T.W., Lee, B.H (1989) "Packaging of the guppy, *Poecilia reticulata*, for air transport in a closed system," *Aquaculture*, 78: 321-332.
24. Turner, D.T., Bower, C.E (1982) "Removal of ammonia by bacteriological nitrification during the simulated transport of marine fishes," *Aquaculture*, 29: 347-357.
25. Wheaton, F.W (1977) *Aquacultural engineering*, New York, Willey-interscience (cited in Lawson, 1994).
26. Woynarovich, E., Horvath, L (1980) "The artificial propagation of warmwater finfishes: a manual for extension," *FAO Fisheries Technology Publications*, 201: 138-47.
27. Zhang, Z., Perschbacher, P (2003) "Comparison of the Zeolite Sodium Chabazite and Activated Charcoal for Ammonia Control in Sealed Containers," *Asian Fisheries Science*, 16: 141-145.
28. Zar, J.H (1974) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Eaglewood Cliffs. NJ.