

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології**

**ЗАСТОСУВАННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ МЕТОДІВ ЗМЕНШЕННЯ
КОНЦЕНТРАЦІЇ НІТРИТІВ У ВОДІ РИБОВОДНОЇ РЕЦИРКУЛЯЦІЙНОЇ
СИСТЕМИ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 407 групи

Говорун Валерія Олександрівна

Керівник:

кандидат біологічних наук,

доцент **Худа Л. В.**

До захисту допущено

на засіданні кафедри

протокол № _____ від _____ 2024 р.

Зав. кафедрою _____ проф Копильчук Г. П.

Чернівці – 2024

Анотація

Бакалаврська робота присвячена оцінці ефективності використання фізико-хімічних методів зменшення концентрації нітритів у воді рибоводної рециркуляційної системи та стійкості бактерій біофільтра за цих умов.

Встановлено, що за умов зменшення інтенсивності роботи аераторів вміст нітритів у воді з басейнів рециркуляційної системи на 20% перевищував нормативні показники, в той час, вміст амонію та нітратів знаходився у межах норми. Застосування пероксиду водню в кінцевій концентрації 0,003% призвело до зменшення концентрації нітрит-іонів у пробах з різних вузлів УЗВ в середньому на 33%. Використання активованого вугілля зменшує концентрацію NO_2^- у воді на 18% у порівнянні з контролем, базальтового туфу з родовища “Полицьке-2” призвело до зниження вмісту нітритів у воді з механічного фільтра (на 30%) та рибоводних басейнів (на 17%). 0,003% розчин пероксиду водню не спричиняє затримки росту та зменшення кількості КУО бактерій родів *Nitrosomonas* та *Nitrobacter*.

Ключові слова: нітрити, пероксид водню, активоване вугілля, базальтовий туф, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*.

Summary

The bachelor's thesis is devoted to the evaluation of the effectiveness of using physicochemical methods to reduce the concentration of nitrite in the water of the recirculation system and the stability of bacteria of the biofilter under these conditions.

It was found that the nitrite content in the water from the recirculation system pools was 20% higher than the standard values, while the ammonium and nitrate content was within the normal range. When applying the hydrogen peroxide water treatment method, it was determined that the concentration of nitrite ions in the samples decreased by 33% on average; with activated carbon - by 18%; with basalt tuff - in water from a mechanical filter (by 30%) and fish farming pools (by 17%). After adding 0.003% hydrogen peroxide to the wells of media inoculated with bacteria of the genera *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*, no zones of growth retardation and critical reduction in the number of CFU were detected.

Keywords: nitrites, hydrogen peroxide, activated carbon, basalt tuff, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ В.О. Говорун

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Принципи роботи рециркуляційної системи для вирощування риби	6
1.2. Вплив нітрогеновмісних сполук на життєдіяльність риб в УЗВ.....	9
1.3. Роль нітрифікуючих бактерій в здійсненні II стадії нітрифікації	13
1.4. Технології зменшення концентрації нітритів у воді з рециркуляційної системи	17
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
2. 1.Матеріали дослідження	18
2.2. Методи дослідження	19
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	
3.1. Визначення концентрації нітрогеновмісних сполук у воді з рециркуляційної системи	24
3.2. Оцінка життєздатності нітрифікуючих бактерій після взаємодії з найефективнішим очисним агентом.....	31
ВИСНОВКИ.....	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	36

ВСТУП

Підтримка оптимальних концентрацій нітрогеновмісних сполук у воді рибогосподарських підприємств є важливим етапом їх управління. Особливо це актуально для рециркуляційних систем (установок замкнутого водопостачання), які використовують для вирощування риби та інших водних організмів у закритих просторах, де вода постійно циркулює [34].

Наявність нітрогеновмісних сполук у воді, в якій вирощують рибу, зумовлена накопиченням продуктів її життєдіяльності, а також решток кормів. У таких системах нітрогеновмісні сполуки можуть швидко накопичуватися, що може призвести до погіршення якості води, де утримується риба. Зокрема, амоній і нітрити є токсичними для риб та інших гідробіонтів [27].

У рециркуляційних системах вода за допомогою насосів з басейнів, де утримується риба, спрямовується на систему фільтрів, зокрема, на механічний фільтр, де здійснюється седиментація крупних завислих частинок та надалі у біологічний фільтр, де відбуваються процеси амоніфікації та нітрифікації.

Нітрифікація відбувається у два етапи: спочатку бактерії роду *Nitrosomonas* окислюють амоній до нітритів, далі нітрити за участю бактерій роду *Nitrobacter* доокислюються до нітратів [15]. Оскільки нітрифікація – аеробний процес, виключно важливо підтримувати в системі необхідний для її нормального перебігу рівень насичення води розчинним киснем. В звичайних умовах функціонування УЗВ це забезпечується роботою аератора. Проте, тривалі відключення електроенергії викликають необхідність жорсткої економії заряду акумуляторів сонячних батарей УЗВ, які забезпечують, в основному, лише роботу насосів. Через це робота аератора часто ускладнена, що призводить до зменшення вмісту кисню у воді та гальмує процеси перетворення нітритів у менш токсичні нітрати.

Отже, особливої уваги заслуговують методи екстреного зниження вмісту нітритів у воді рециркуляційних систем. Як відомо, очищення води від нітрогеновмісних сполук можна здійснювати за допомогою різних методів, включно з біологічним, механічним, хімічним очищенням та комбінованими методами.

Найбільш ефективним методом є біологічна очистка, яка забезпечує зменшення кількості нітрогеновмісних сполук у воді за допомогою мікроорганізмів [16].

Серед можливих ефективних методів очищення води при підвищених значеннях нітрогеновмісних сполук – фізико-хімічні, зокрема додавання потужних окислювачів, здатних сприяти швидкому перетворенню нітритів у нітрати та застосування адсорбентів, що мають велику питому поверхню та поглинаючі властивості [11, 23, 35].

Проте постає питання щодо стійкості бактерій біофільтра до такого типу обробки, адже нітрифікуючі бактерії біоплівки в біофільтрі відіграють ключову роль в конвертації азотних сполук, таких як аміак та нітрити, у менш токсичні нітрати [15].

Метою роботи є оцінка ефективності використання фізико-хімічних методів зменшення концентрації нітритів у воді рециркуляційної системи та стійкості бактерій біофільтра за цих умов.

Задля досягнення мети було поставлено такі **завдання**:

- Визначити концентрації нітрогеновмісних сполук у воді з різних вузлів рециркуляційної системи;
- Оцінити ефективність зниження концентрації нітритів у воді з установки замкнутого водопостачання при застосуванні пероксиду водню ;
- Визначити концентрацію нітритів у воді з різних вузлів УЗВ за умов застосування активованого вугілля;
- Визначити концентрацію нітритів у воді з різних вузлів УЗВ за умов використання базальтових туфів з родовища «Полицьке-2»;
- Оцінити життєздатність нітрифікуючих бактерій біофільтра рециркуляційної системи за умов використання пероксиду водню.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Принципи роботи рециркуляційної системи для вирощування риби

Рециркуляційна система (RAS - Recirculating Aquaculture System, УЗВ – установка замкнутого водопостачання) для вирощування риби є інноваційним методом аквакультури, який дозволяє ефективно вирощувати водні організми в контрольованих умовах. У такій системі вода постійно циркулює, що дозволяє зменшити її споживання та контролювати якість.

Рециркуляційні системи вирощування риби є екологічно ефективними, оскільки вони зменшують споживання води та викиди забруднень в навколишнє середовище. Вони дозволяють забезпечити оптимальні умови для росту та розвитку риби, контролювати температуру, рівень кисню та інші параметри [24].

Повний контроль та оптимізація всіх факторів середовища гідробіонтів в установці замкнутого водопостачання дає змогу скоротити терміни вирощування риби, мінімізувати стресові фактори та прогнозувати всі етапи росту та розвитку рибопосадкового матеріалу. Рециркуляційна технологія дає можливість складання чітких виробничих планів та передбачення часу реалізації готової продукції. Ці аспекти сприятливо впливають на управління установкою.

Такий вид господарства має перевагу щодо проблем захворюваності риби. Система зводить до мінімуму попадання інвазійних збудників з довкілля за рахунок обмеженого водопостачання. При високій щільності посадки збільшується рибопродуктивність порівняно із ставовими господарствами, що дає змогу зменшувати виробничі площі. Таким чином, рециркуляційні системи є компактними об'єктами господарства, які можуть функціонувати безпосередньо біля точок водного споживання [6].

Система представлена резервуарами (басейнами), де знаходиться вода та утримуються об'єкти аквакультури. Резервуари зазвичай зроблені із спеціального матеріалу, що не взаємодіє з водою, такого як фіберглас або поліетилен.

Вода з басейнів проходить через різні етапи фільтрації, а саме: механічну фільтрацію, біологічну фільтрацію та хімічну фільтрацію (використання адсорбентів

для видалення забруднення). Це забезпечує видалення відходів, шкідливих речовин, амонію, нітритів та інших забруднень. Схема рециркуляційної системи представлена на рис. 1.1. [5].



Рис. 1.1 Рециркуляційна система для вирощування риби [5]

Механічну фільтрацію використовують для видалення твердих часток та великих забруднень з води. Біологічна фільтрація залучає бактерії, які перетворюють аміак та нітрити на менш токсичні сполуки. Хімічна фільтрація передбачає застосування іонообмінних матеріалів та окисників [24].

Вода в системі повинна бути насиченою киснем, щоб забезпечити оптимальний газовий стан середовища існування для риби. Для цього в систему долучають аератори або системи обміну газу, які забезпечують потік повітря або кисню.

Регулювання температури є важливим аспектом вирощування гідробіонтів. Рециркуляційна система може бути обладнана системою підігріву та охолодження, яка допомагає підтримувати оптимальну температуру води для риб.

Також дуже важливо постійно контролювати рівні амонію, нітритів, рН, розчиненого кисню та інших параметрів води. Це дозволяє операторам системи вчасно вживати заходи для збереження товарної риби.

В установці замкнутого водопостачання використовується система збору й очищення води, що дозволяє повторно використовувати воду, зменшуючи споживання прісної води і відведення рідини.

Рибу в рециркуляційній системі годують спеціально розробленими раціонами, які містять необхідні поживні речовини для росту та розвитку [5].

Біофільтр в системі замкнутого водопостачання в аквакультурі відіграє ключову роль у підтриманні відповідної якості води, необхідної для життя риби. Зазвичай він представлений циліндричним реактором, у якому перебуває наповнювач, що є носієм біоплівки. Саме наповнювач є головною структурною одиницею біофільтра. Найпоширенішим в аквакультурі наповнювачем для біофільтру є пластикове плаваюче завантаження.

Одними з головних складових біоплівки у біофільтраційній установці є бактерії роду *Nitrosomonas* та *Nitrobacter*. Розмноження колоній *Nitrosomonas* розпочинається з потрапляння амонію в біофільтр. За рахунок окислення сполук амонію бактеріями утворюються нітрити, що слугують джерелом енергії для *Nitrobacter*, які в свою чергу окислюють NO_2^- до нітратів. Ці реакції проходять лише в присутності кисню.

Під час запуску біофільтра біоплівка покриває не тільки наповнювач, але і всю внутрішню поверхню установки, які контактують із циркулюючою водою.

Термін завершення запуску біофільтра лежить в межах від 40 до 70 діб при температурі $+16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Цей процес здійснюється при щільності посадки риби $2\text{--}3\text{ кг/м}^3$, за рахунок чого концентрація токсичних сполук у воді не збільшується до летальних значень [8].

Як зазначено вище, основною функцією біофільтра є біологічна фільтрація, де бактерії, що знаходяться в біофільтрі, розкладають аміак, нітрити та інші азотні сполуки, що виникають внаслідок обробки відходів риб та інших організмів. Цей процес відомий як нітрифікація. Він сприяє формуванню біологічного середовища, яке підтримує різноманіття мікроорганізмів, що допомагають утримувати баланс екосистеми в рециркуляційній системі.

Біофільтр також відіграє роль у підтриманні стабільності системи замкнутого водопостачання, допомагаючи уникнути коливань параметрів води, таких як рН та рівень кисню [12].

1.2. Вплив нітрогеновмісних сполук на життєдіяльність риб в УЗВ

Нітрогеновмісні сполуки – це хімічні речовини, що в своїй структурі містять атом нітрогену (N). Такі сполуки бувають неорганічні (які складаються з атома нітрогену та різної кількості атомів гідрогену (H) або оксигену (O)) та органічні (в яких нітроген входить до складу органічних речовин, а саме білків, амінокислот, нуклеїнових кислот та інших біомолекул. Вони утворюються в результаті метаболізму живих організмів.

До неорганічних нітрогеновмісних сполук належать: аміак (сполука NH_3 токсична для багатьох організмів та присутня у водних середовищах внаслідок розкладання органічної речовини); амоній (NH_4^+ є іонізованою формою аміаку, що утворюється в залежності від рівня pH середовища); нітрити (NO_2^- являє собою проміжний продукт нітрифікації); нітрати (NO_3^- утворюються за рахунок окислення нітритів).

До органічних нітрогеновмісних сполук належать азотні гази, а саме діазот (N_2 є основним компонентом атмосфери) та оксиди азоту (NO_x є продуктами спалювання викопного палива та можуть бути забруднювачами повітря) [26].

Вплив нітрогеновмісних сполук (таких як амоній та нітрити), що завжди присутні у воді рециркуляційних систем, може мати серйозні наслідки для життєдіяльності гідробіонтів, які в них вирощуються, особливо за умов їх щільної посадки. На різних етапах їхнього життєвого циклу риба може бути чутливою до високих рівнів нітрогенових сполук, що може призвести до негативних наслідків.

Серед основних впливів нітрогеновмісних сполук на рибу в рециркуляційній системі слід відмітити те, що високі рівні амонію та аміаку є токсичними для риби, оскільки викликають патологічні зміни у зябрах, нирках та інших органах, що може призвести до зниження їхньої виживаності. Також надмірна кількість нітритів та нітратів можуть пригнічувати імунну систему риби, що призводить до більшої схильності до захворювань та інфекцій.

У табл. 1 подані гідрохімічні показники, що характеризують роботу нітрифікуючих бактерій і біологічного фільтра.

Таблиця 1.

Показники якості води в установках замкнутого водопостачання для вирощування риби [6]

Показник	ДСТУ для поступаючої води	Норма	Тимчасово допустимі значення
Зважені речовини, мг/л	до 10	до 30	-
pH	від 7 до 8	від 6,8 до 8,2	від 6,5 до 8,5
Нітрити, мг/л	до 0,02	до 0,1	до 1
Нітрати, мг/л	від 2 до 3	до 60	100
Амоній, мг/л	1	до 4	до 10
Вільний аміак, мг/л	до 0,05	до 0,05	до 0,1
Біхроматна окислювальність, $\text{MgO}_2/\text{л}$	до 30	від 20 до 60	від 70 до 100
Перманганатна окислювальність, $\text{MgO}_2/\text{л}$	до 10	від 10 до 15	до 40
Кисень на виході із рибницьких басейнів, $\text{MgO}_2/\text{л}$	-	від 5 до 12	від 2 до 3
Кисень на виході із біофільтра, $\text{MgO}_2/\text{л}$	-	4,8	не менше 2

Велика концентрація нітрогенових сполук може мати негативний вплив на репродуктивну функцію риби, зменшуючи їхню здатність до розмноження та спричиняючи втрату рибопосадкового матеріалу.

Надмірна кількість нітрогеновмісних сполук у воді призводить до зміни вмісту розчиненого кисню, рівня pH та інших параметрів водного середовища, що може призвести до погіршення здоров'я та зростання смертності риб та же негативно вплинути на економічні показники рибного господарства [16].

Першими ознаками отруєння амонієм є пришвидшення дихання риб. Вони збираються близько до поверхні води. На більш пізніх стадіях гідробіонти хапають

повітря та дихання стає нерегулярним. Риба бурхливо реагує на зовнішні подразники. Вони втрачають рівновагу, вистрибують із води а м'язи постійно спазмують. Уражені риби переводять тіло горизонтально та спазматично широко відкривають рот та зяброві кришки. Далі настає короткий період візуального одужання, коли тварина повертається до нормального плавання і виглядає здоровою, проте ця стадія змінюється періодом високої активності. Поверхня тіла стає блідою і все завершується загибеллю організму [32].

Шкіра риби, отруєної амонієм, має світлий колір і покрита товстим або надмірним шаром слизу. У деяких випадках виникають невеликі крововиливи, головним чином, біля основи грудних плавників і в передній частині очної порожнини. Зябра сильно закупорені і містять значну кількість слизу. Можлива сильна кровотеча зябер. Інтенсивне виділення слизу спостерігається на внутрішній стороні зябрової кришки, переважно на задньому кінці. Органи риби зазнають дистрофічних змін. Також отруєння амонієм призводить до некрозу зябер. Цей стан супроводжується відривом епітелію від зябрових пластинок. Стовпчасті клітини на зябрах повністю оголені по всій пластинчастій поверхні. На пізніх стадіях захворювання некротичні зяброві пластини відшаровуються, а краї зябер спотворюються [32].

При гістологічному та патологоанатомічному дослідженні виявляють веностаз, набряк, вакуолізацію та відрив респіраторних епітеліальних клітин від базальної мембрани в зябрах. З цими ефектами пов'язане підвищення активності хлоридних клітин у пластинчастому епітелії. Дистрофічні та некробіотичні клітини респіраторного епітелію (включаючи хлоридні клітини) створюють компактну масу уламків у міжпластинковому просторі зябер. Поширені ураження характеризуються тотальним лізисом і некротичними змінами клітинного ядра. Особливістю цих ефектів є значне підвищення рівня аміаку в сироватці крові риб [32].

Нітрити негативно впливають на хімічні і гідробіологічні показники води, що, в кінцевому підсумку, позначається на гідробіонтах. Зокрема відомо, що нітрит натрію, починаючи з концентрацій 0,25 мг/л, знижує вміст кисню у воді [3]. Інтوکсикація нітритами спричиняє гемічну і гістотоксичну гіпоксію, яка

супроводжується ланцюгом важких порушень метаболізму, з наступними деструктивними процесами на рівні ферментативних систем, гуморальних факторів регуляції і клітинних мембран.

Токсичність нітритів обумовлена метгемоглобіноутворювальною дією. Відомо, що метгемоглобінемія є одним із механізмів токсичності розчинених у воді нітритів для риб. У крові риб кисень транспортується дихальним білком за участі гемоглобіну. Залізо в гемоглобіні двовалентне: Fe (II). Гемоглобін неміцно з'єднується з киснем, утворюючи сполуку, яка легко руйнується, – оксигемоглобін, в якому залізо знаходиться все ще в двовалентній формі. Якщо залізо в гемоглобіні окиснюється до тривалентної форми Fe (III), то утворюється метгемоглобін. Останній не здатний з'єднуватися з киснем, і його досить високі концентрації можуть викликати гіпоксію і смерть. Чим вище концентрація нітритів, тим більше утворюється метгемоглобіну. Присутність високих концентрацій метгемоглобіну стає візуально очевидним, оскільки кров стає коричневою. Відомо, що навіть незначні концентрації нітриту, проникаючи через зябровий апарат, спричиняють метгемоглобінемію і функціональну анемію [3].

За умов нітритної інтоксикації у риб дослідниками зареєстровано м'язові судоми, розлад рівноваги, гіперемія зябер, печінки, головного мозку, вакуолізація цитоплазми, ниркового епітелію, лізис ядер, волокнистість і зернистість речовини мозку, дегенеративні зміни в нервових клітинах [3].

Відомо, що токсичність нітратів для риб дуже низька і гідробіонти можуть існувати в середовищі із концентрацією NO_3^- до 100 мг/л. Важають, що тканини риб непроникні для цих сполук і тому не можуть накопичуватися в тілі [8].

1.3. Роль нітрифікуючих бактерій у функціонуванні біофільтра

У рециркуляційній системі біофільтр включає в себе різні види мікроорганізмів. За їх допомогою відбувається процес перетворення розчинених у воді речовин, в тому числі нітрогеновмісні сполуки. Більшість з мікроорганізмів у середовищі знаходяться

у зв'язаному стані в формі біоплівок. Це об'єднання легко кріпляться до органічного чи неорганічного субстрату, що дає змогу збільшити площу взаємодії у воді [30].

Нітрифікація - це процес біологічного перетворення аміаку (NH_3) та іонів амонію (NH_4^+) у більш окисдовані форми нітрогену, такі як нітрити (NO_2^-) та нітрати (NO_3^-). Ці процеси відбуваються у два етапи, ініційованих різними видами бактерій, які мають спеціальні ферменти для окислення амонію. Після першої стадії нітрифікації (утворення нітритів), інші нітрифікуючі бактерії (такі як *Nitrobacter*) перетворюють нітрити у нітрати (NO_3^-) у другій стадії. Обидва ці етапи є важливими для біологічного циклу азоту, який підтримує екосистему та забезпечує якість води.

Друга стадія нітрифікації, відома як нітритифікація, включає перетворення нітритів (NO_2^-) у нітрати (NO_3^-). Цей процес також відбувається за участю специфічних бактерій, і ці бактерії відомі як нітритифікуючі бактерії [2].

Бактерії роду *Nitrosomonas* представлені зазвичай прямими паличковидними формами, проте іноді зустрічаються коковидної форми (рис. 1.2.). Для деяких видів характерна рухливість за рахунок полярного джгутикування. Клітинна стінка типова для грамнегативних бактерій, але в морських видів виявлений додатковий зовнішній білковий шар. По периферії цитоплазми розміщені внутрішньоцитоплазматичні мембрани у вигляді щільних везикул. Для отримання енергії використовують перетворення аміаку у нітрити [18].

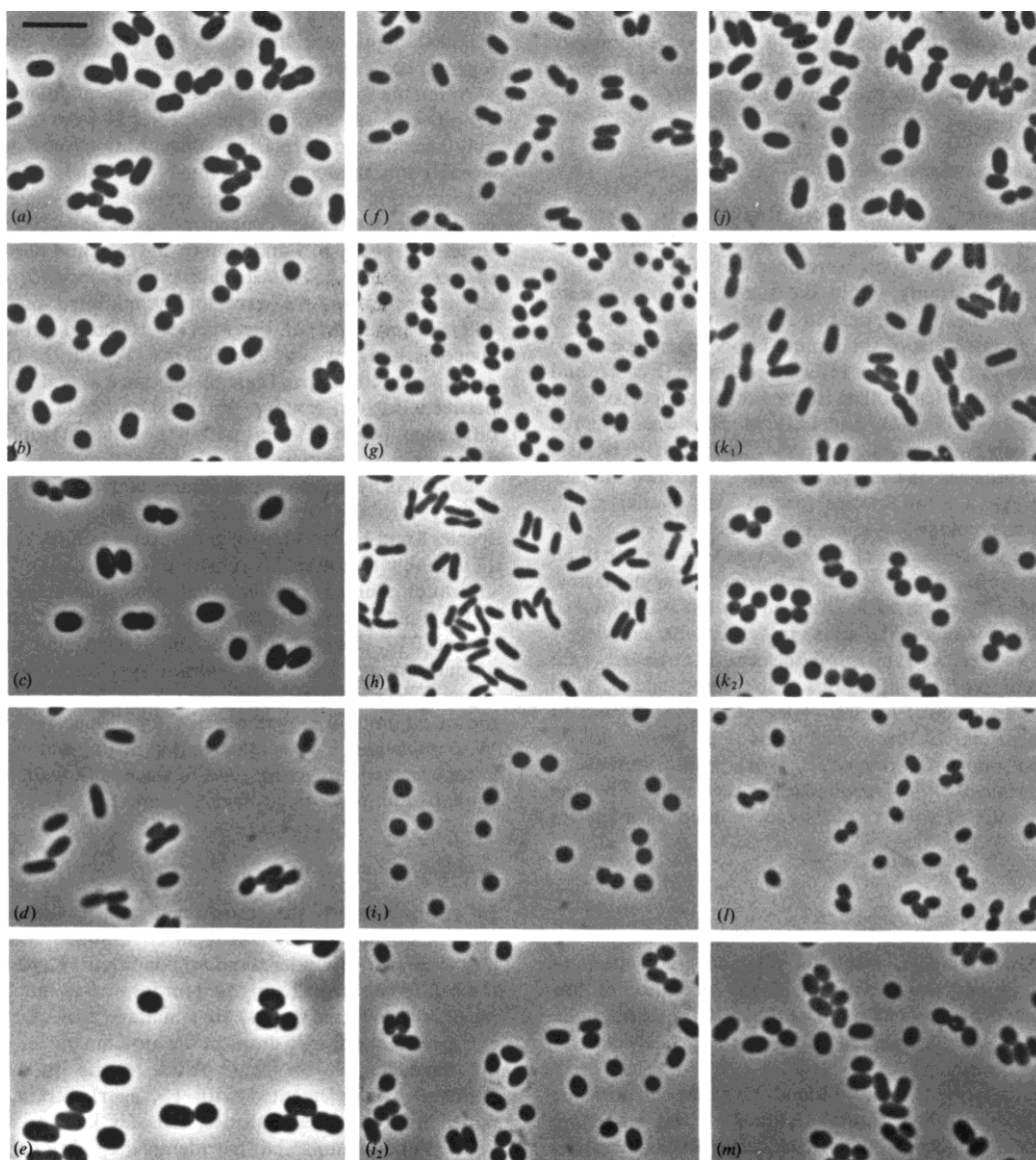


Рис. 1.2. Фазово-контрастні мікрофотографії різних видів *Nitrosomonas*:

(a) *N. communis*; (b) genospecies 2; (c) genospecies 3; (d) *N. ureae*; (e) *N. cryotolerans*; (f) *N. aestuarii*; (g) genospecies 7; (h) *N. marina*; (i 1) *N. nitrosa*; (i 2) *N. nitrosa*; (j) *N. eutropha*; (k 1) *N. oligotropha*; (k 2) *N. oligotropha*; (l) *N. europaea*; (m) *N. halophila* (k 1) [22]

Рід *Nitrobacter* представлений у вигляді паличкоподібних, грушеподібних або плеоморфних форм (рис. 1.3.). Зазвичай розмножуються брунькуванням. Рухливі або не рухливі. Рух здійснюється за рахунок субтермінального або латерального джгутика. За даними електронної мікроскопії тонких зрізів клітинна стінка відрізняється від стінок більшості грамнегативних бактерій. Вона складається з трьох шарів (електронно-щільний, електронно-прозорий, електронно-щільний), причому

внутрішній шар більш електронно-щільний ніж зовнішній. Основним джерелом енергії слугує нітрит, а саме перетворення його на нітрат [18].

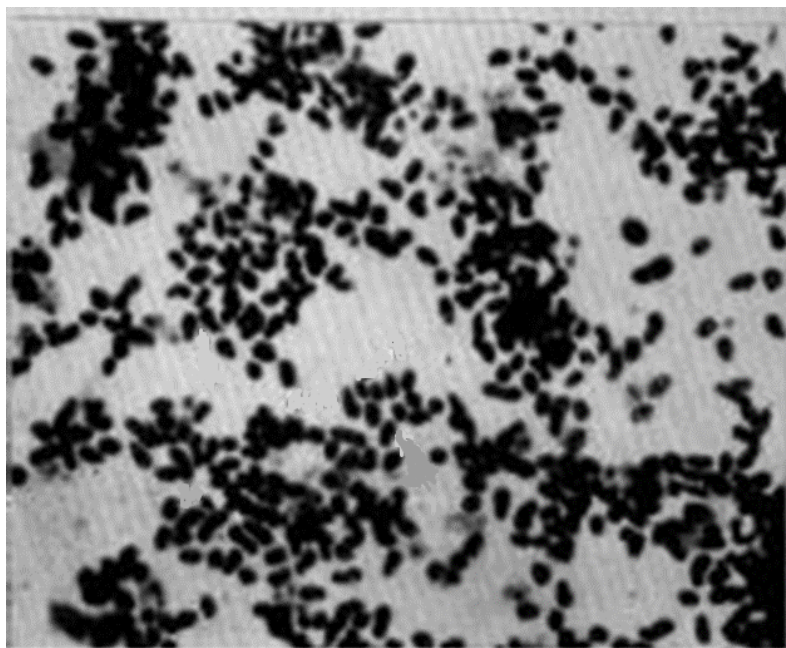
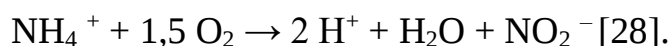


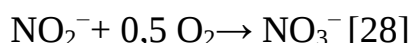
Рис. 1.3. Фазово-контрастна мікрофотографія *Nitrobacter winogradskyi* [38]

Головні етапи нітрифікації забезпечують:

- Нітрозомонади (*Nitrosomonas*): Ці бактерії виконують перший етап нітрифікації, перетворюючи амоній (NH_4^+) у нітрити (NO_2^-). Цей процес відбувається за участю ферментів амоній-монооксигенази та гідроксиламіноксидредуктази. Рівняння реакції на цій стадії виглядає так



- Нітробактери (*Nitrobacter*): На другому етапі нітритифікації нітритифікуючі бактерії перетворюють нітрити (NO_2^-) у нітрати (NO_3^-). Цей процес відбувається завдяки ферментам, таким як нітрит-оксидоредуктаза, цитохром А1 та А2, хініну та НАДН-дегідрогенази. Рівняння реакції на цій стадії виглядає так:



Цей цикл нітрифікації є важливим для стабілізації азотного обміну в аквакультурних системах та інших екосистемах. Процеси нітрифікації важливі для забезпечення безпечного виведення азоту, який може бути продуктом метаболізму риб та інших водних організмів [29].

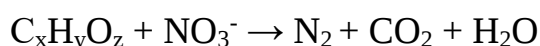
Повне рівняння процесу виглядає наступним чином [28]:



У процесі нітрифікації важливу роль відіграють гідрокарбонати (HCO_3^-). Ці сполуки забезпечують стабільність рН середовища, що є дуже важливим аспектом для життєдіяльності нітрифікуючих бактерій. Під час життєдіяльності цих мікроорганізмів вивільняється велика кількість іонів водню, що знижує рівень рН та може призвести до зниження активності бактерій. Гідрокарбонати виконують роль буферу, нейтралізуючи надлишок H^+ [36].

Важливим процесом після нітрифікації є денітрифікація. Він здійснюється факультативними гетеротрофними бактеріями, такими як *Pseudomonas*, які існують в анаеробних умовах.

Ці мікроорганізми можуть використовувати нітрати замість кисню, як кінцевого акцептора електронів і утворюють сполуку N_2 . Оскільки це гетеротрофні організми, у середовищі потрібне органічне джерело карбону, який є необхідним для розвитку клітин. Загальне рівняння для денітрифікації виглядає так [28]:



Поєднання процесів нітрифікації та денітрифікації (рис. 1.4.) є традиційним та найпоширенішим методом біологічного зменшення концентрації нітрогенвмісних сполук у воді [28].

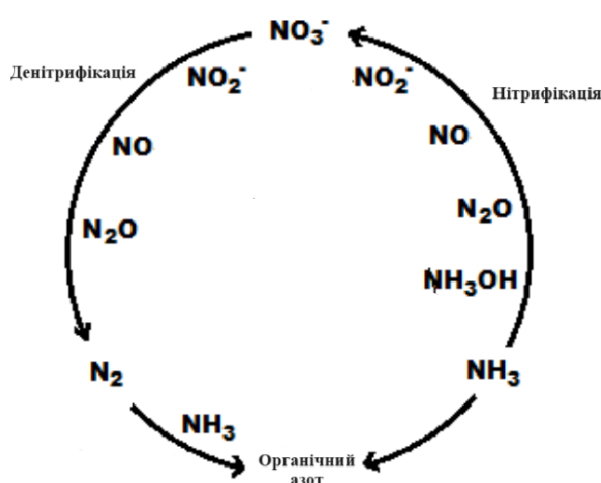


Рис. 1.4. Схематичний цикл азоту [28]

1.4. Технології зменшення концентрації нітритів у воді з рециркуляційної системи

Зростаюча потреба у вирощуванні риби в контрольованих умовах у поєднанні з обмеженою потужністю водних ресурсів призвела до будівництва об'єктів аквакультури, де до 95% води рециркулюється. Основний продукт білкового обміну риб – аміак видаляється з резервуарів шляхом нітрифікації (перетворення на нітрити, а потім на нітрати) за допомогою біофільтрів. Однак процес нітрифікації, який може бути порушений за рахунок ряду факторів, часто призводить до підвищення концентрації нітритів [33].

Зменшення концентрації нітритів у воді рециркуляційної системи можна досягти за допомогою кількох методів і стратегій. Деякі з них включають наступні дії.

1. Встановлення біологічних фільтрів, які містять бактерії, що здатні до окислення нітритів до нітратів. Цей процес відомий як нітрифікація. Біологічні фільтри можуть бути використані у вигляді фіксованих заселень, плаваючих систем або біофільтрів з носіями.
2. Додавання карбонатних буферів, таких як натрій або кальцій бікарбонат, може знизити концентрацію нітритів. Це може бути досить дієво, особливо якщо рівень рН води низький, оскільки високий рівень нітритів часто спостерігається при низькому рН.
3. Регулярна часткова заміна води може забезпечити зниження концентрації нітритів у системі. Видалення частини води та її заміна свіжою чистою водою допоможе знизити накопичення нітритів.
4. Хімічні методи, такі як додавання пероксиду водню або адсорбуючих речовин, можуть бути використані для хімічного зниження концентрації нітритів. Однак, необхідно ретельно контролювати дозування, оскільки ці речовини можуть мати інші впливи на систему.
5. Ефективне управління годуванням може допомогти уникнути перевитрат кормових речовин і зменшити продукцію нітритів як побічного продукту метаболізму риб [27].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали дослідження

Дослідження проводили на базі рециркуляційної системи лабораторії біотехнології водних організмів ННІБХБ.

Проби води відбирали з ключових вузлів УЗВ – басейнів, аератора, біофільтра та механічного фільтра. Аналіз води на вміст нітрогенвмісних сполук (концентрація амонію, нітрит- та нітрат-іонів) проводили в день відбору проб.

З метою зниження концентрації нітритів застосували наступні методи:

1. Додавання у воду пероксиду водню з досягненням кінцевої концентрації 0,003%.

У контейнери об'ємом 250 мл з водою із 4-ох вузлів додавали по 0,25 мл (1 мл/л) 3%-ного пероксиду водню. Витримували 3 години та визначили концентрацію нітритів у всіх пробах.

2. Додавання активованого вугілля.

У контейнери об'ємом 250 мл з водою із 4-ох вузлів додавали по 0,25 г (1 г/л) активованого вугілля таблетованої форми (комерційний продукт Публічного акціонерного товариства «Науково-виробничий центр «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод»). Витримували 1 добу та визначили концентрацію нітритів у пробах.

3. Використання базальтових туфів.

У контейнери об'ємом 250 мл з водою із 4-ох вузлів додавали по 0,25 г (1 г/л) подрібненого базальтового туфу з родовища “Полицьке-2” діаметром 1-2 мм. Витримували 1 добу та визначили концентрацію нітритів у пробах.

З метою оцінки впливу додавання пероксиду водню у воду рециркуляційної системи на стійкість бактерій біофільтру з поверхонь наповнювачів біофільтру, отримували накопичувальні культури нітрифікуючих бактерій.

Визначення стійкості бактерій 1ї та 2ї фаз нітрифікації до застосованих в експерименті концентрацій пероксиду водню здійснювали за методом лунок.

2.2. Методи дослідження

Метод визначення концентрації нітритів у воді з реактивом Грісса

У мірні стакани (50 мл) вносили 50 мл проби води з різних вузлів рециркуляційної системи. Додавали піпеткою по 2 мл реактиву Грісса та перемішували скляною паличкою. Через 40 хв проводили фотоколориметрування забарвлених проб у 20-мм кюветі при довжині хвилі 540 нм проти дистильованої води в якості контролю.

Для побудови калібрувального графіка готували стандартний розчин NaNO_2 . Для приготування стандартного розчину у мірну колбу (500 мл) додавали 0,615 г NaNO_2 та доводили до мітки дистиліатом. Щоб приготувати робочий розчин у мірну колбу (250 мл) додавали 5 мл стандартного розчину і доводили до мітки дистиліатом.

У підготовлені склянки автоматичною піпеткою вносили 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,5; 2 мл робочого розчину та доводили дистильованою водою до 45 мл. В кожну склянку піпеткою додавали по 2 мл реактиву Грісса, перемішували скляною паличкою, вимірювання проводили через 40 хв.

«Масову концентрацію у досліджуваних зразках води розраховували за формулою, мг/дм^3 :

$$(1) \quad w = C \cdot 50 / V, \text{ де}$$

C – концентрація, знайдена за калібрувальним графіком, $\text{мг/дм}^3 \text{NO}_2^-$;

V – об'єм проби, взятий для аналізу, см^3 ;

50 – об'єм стандартного розчину, см^3 » [1].

Метод визначення концентрації амонійного азоту у воді з реактивом Несслера

У мірні склянки (50 мл) додавали 50 мл проби води з біофільтра, аератора та басейна. Потім додавали піпеткою по 2 краплі 50%-ного розчину сегнетової солі та перемішували скляною паличкою. Після цього додавали по 1 мл реактиву Несслера і

знову перемішували. Вимірювання здійснювали через 10 хвилин у 20мм кюветі при довжині хвилі 425 нм.

Для побудови калібрувальної кривої готували стандартний розчин NH_4Cl . Щоб приготувати основний розчин хлориду амонію у мірну колбу (500 мл) насипали 1,482 г NH_4Cl та доводили дистильованою водою до мітки, концентрація NH_4^+ в такому розчині становить 1 г/дм³. Робочий розчин NH_4Cl з концентрацією 5 мг NH_4^+ / дм³ отримали розведенням 1 мл основного розчину дистилатом у мірній колбі на 200 мл.

У мірні склянки (50 мл) додали 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12 мл робочого розчину хлориду амонію та дистилатом доводили до мітки. Вміст іонів NH_4^+ в одержаних розчинах становив: 0; 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06 мг/дм³.

У кожену склянку додали піпеткою 2 краплі 50%-ного розчину сегнетової солі та перемішували скляною паличкою. Після цього наливали 1 мл реактиву Неслера і також перемішували скляною паличкою. Через 10 хвилин визначали оптичну густину кожного зразку у 20мм кюветах при довжині хвилі 425 нм.

«Масову концентрацію амонійного азоту в досліджуваних зразках води розрахувати за формулою, мг/дм³:

$$C = C_{\text{гр}} \cdot 500 / V, \text{ де}$$

$C_{\text{гр}}$ – концентрація іонів амонію, встановлений за графіком, мг;

V – об'єм проби, взятий для аналізу, мл;

500 – об'єм основного розчину, мл.

Для обчислення вмісту азоту амонійного, одержану величину концентрації слід помножити на коефіцієнт 0,78»! [1].

Метод визначення концентрації нітратів у воді

Для приготування основного розчину калію азотнокислого у мірну колбу (500 мл) переносили 0,082 г, попередньо зваженого на вагах, KNO_3 та розчиняли у малому об'ємі дистильованої води. Потім доводили до мітки дистилатом. В 1 мл цього розчину міститься 0,1 мг нітрат-іонів.

Робочий розчин калію азотнокислого було отримано розбавленням 10 мл основного розчину до 100 мл дистильованою водою у мірній колбі. В 1 мл цього розчину містилось 0,01 мг нітрат-іонів.

У порцелянові чашки додавали 0; 0,5; 1; 2; 5; 10 мл робочого розчину нітрату калію та дистиллятом доводили до 10 мл. Вміст іонів NO_3^- в одержаних розчинах становив: 0; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 мг/дм³.

У кожен порцелянову чашку було додано піпеткою 2 мл саліцилової кислоти та випарено у мікрохвильовій печі насухо. Після охолодження сухий залишок перемішали з 2 мл сірчаної кислоти і залишили на 10 хвилин.

Вміст чашки розвели з 15 мл дистильованої води, додали 15 мл розчину NaOH і сегнетової солі, перенесли кількісно в мірні склянки, обмиваючи стінки чашки дистиллятом. Охолодили склянки в холодній воді до кімнатної температури і довели дистильованою водою до мітки.

Визначили оптичну густину кожного зразку при довжині хвилі 410 нм та по даним побудували калібрувальний графік, де по осі абсцис – концентрація нітратів, а по осі ординат – оптична густина.

У порцелянові чашки додали піпеткою по 10 мл проби води з біофільтра, аератора та басейна. Потім вчинили, як зазначено вище. «Масову концентрацію нітратного азоту в досліджуваних зразках води розраховували за формулою, мг/дм³:

$$C = C_{\text{гр}} \cdot 500/V, \text{ де}$$

$C_{\text{гр}}$ – концентрація іонів нітрату, встановлений за графіком, мг;

V – об'єм проби, взятий для аналізу, мл;

500 – об'єм основного розчину, мл». [1].

Методика виділення накопичувальної культури нітрифікуючих бактерій

Для отримання накопичувальної культури нітрифікуючих бактерій застосували два типи середовища: Енгеля та Александера, що розрізняються за джерелом азоту.

Для приготування середовища для бактерій першої фази нітрифікації використовували (г/л): NH_4HCO_3 – 2,5, KH_2PO_4 – 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5, CaCl – 0,004, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4, CaCO_3 – 0,5.

У приготуванні середовища для другої фази нітрифікації використовували (г/л): NaNO_2 – 3,0, Na_2CO_3 – 1,0, NaCl – 0,5, K_2HPO_4 – 0,5, FeSO_4 – 0,4.

Чашки Петрі з мікроорганізмами інкубували у термостаті при температурі 28 °C [18].

Виділення чистої культури бактерій за методом виснажувального штриха

Матеріал, що містить бактерії, було набрано стерильною бактеріологічною петлею та нанесено на живильне середовище. Посів проводиться паралельними штрихами від краю до краю чашки. Через добу інкубації у термостаті при температурі 28 °C на поверхні живильного середовища нарощувались колонії мікроорганізмів [18].

Техніка приготування фіксованих препаратів

Стерильною бактеріологічною петлею на знежирене предметне скельце було нанесено краплю бактеріальної суспензії та висушено. Мазок зафіксовано над полум'ям пальника (час дії полум'я не повинен перевищувати 3-4 с). Бактеріальний препарат ставили мазком вверху на місток, що розташований над ванночкою, та наносили піпеткою 2-3 краплі водного розчину фуксину, накриваючи весь мазок (тривалість обробки – 2-3 хв). Мазок промивали до знебарвлення промивних вод. Препарат висушували на повітрі або легко протирали фільтрувальним папером [18].

Техніка приготування препаратів за Грамом

На фіксований мазок накладали смужку фільтрувального паперу, попередньо змоченого генціанвіолетом та наносили 3-5 крапель води. Витримували мазок 2 хв. Після цього знімали папірець пінцетом, а на препарат наносили розчин Люголя та

витримували протягом 1 хв. Зливали розчин Люголя і наносили кілька крапель 96% спирту. Витримували 2 хв. Промивали водою, далі на мазок наносили водний розчин фуксину та витримували протягом 2 хв. Барвник змивали водою, а препарат підсушували фільтрувальним папером та мікроскопіювали [18].

Визначення кількості КУО

Підрахунок колоній проводився візуально на чашках Петрі за допомогою маркування кожної розпізнаної колонії. Важливо врахувати усі колонії, відрізнивши їх від часток поживного середовища.

У кожній досліджуваній чашці Петрі підраховували усі видимі колонії та маркували. Якщо спостерігається суцільний ріст колоній на площі більшій, ніж чверть чашки, то підраховували колонії на решті її площі. Колонії, які злились, рахуються як одна колонія [7].

Визначення стійкості мікроорганізмів

На засіяному агаризованому середовищі було вирізано лунок стерильною скляною трубкою, до яких вносили 0,3%-ний розчин перексиду водню. Речовина дифундує в агар з лунок, що дозволяє визначити дію досліджуваної речовини на колонії мікроорганізмів. Для рівномірного розподілення розчину у чашці Петрі вирізали 5 лунок по периметру та в центрі. Після тижневої інкубації та постійного додавання розчину вимірювали зони затримки росту навколо лунок та порівнювали із контролем, до якого вносили дистильовану воду [4].

Статистична обробка результатів

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel. Відмінності результатів розраховувались за критерієм Стюдента. Дослідження проводились у 3-кратній повторюваності.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Визначення концентрації нітрогеновмісних сполук у воді з рециркуляційної системи

Вирощування риби в рециркуляційних системах потребує постійного моніторингу гідрохімічних показників, серед яких одними з найважливіших виступають концентрації нітрогеновмісних сполук.

Нами було оцінено вміст амонію, нітритів та нітратів у ключових вузлах рециркуляційної системи. Результати проведених досліджень зображено на рис. 3.1.-3.3.

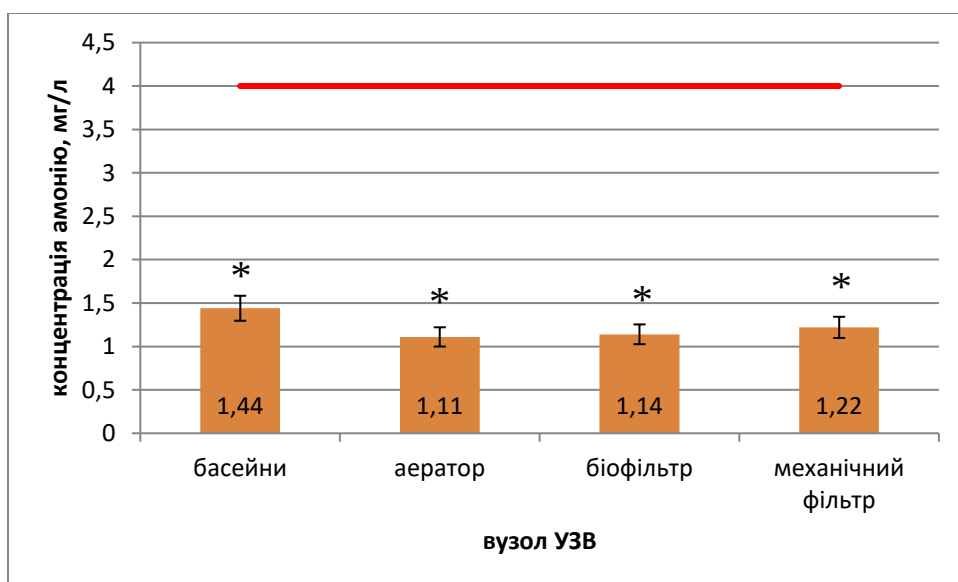


Рис. 3.1 Концентрація амонію у пробах води з різних вузлів УЗВ

*Примітка (тут і надалі): * - різниця між дослідними значеннями та нормою статистично достовірна ($p \leq 0,05$);*

Результати проведених досліджень показали, що концентрація амонію (рис. 3.1.) та нітратів (рис. 3.3.) у пробах відповідають оптимальним показникам для рециркуляційних систем вирощування риби та не перевищують нормативні значення.

Натомість, при визначенні концентрації нітритів нами було встановлено перевищення даного показника в одному з вузлів рециркуляційної системи.

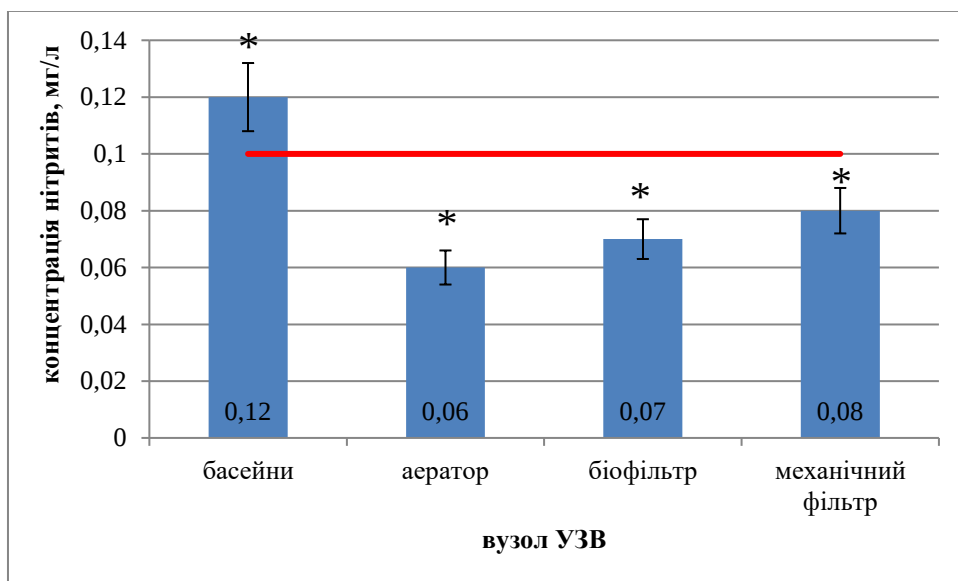


Рис. 3.2 Концентрація нітритів у пробах води з різних вузлів УЗВ

Так, концентрація нітрит-іонів у рибоводних басейнах була вище норми на 20%. В інших вузлах значення знаходились в нормативних в межах (рис. 3.2.). Для зниження вмісту нітритів було апробовано кілька фізико-хімічних методів.

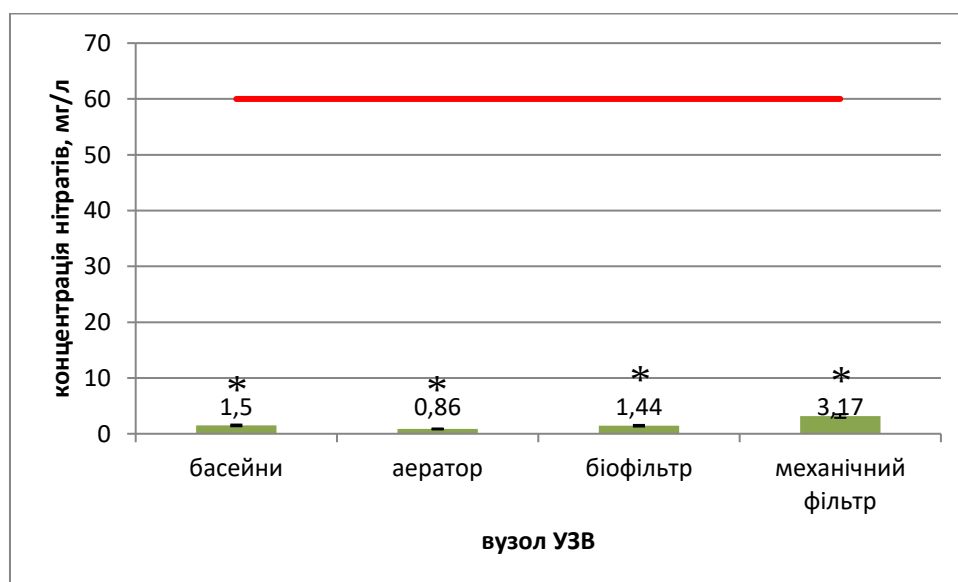
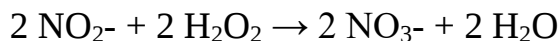


Рис. 3.3 Концентрація нітратів у воді з різних вузлів УЗВ

Щоб зменшити концентрацію нітритів у пробах застосовано пероксид водню. Видалення нітритів з води за допомогою перексиду водню є одним з методів хімічного очищення. Пероксид водню (H_2O_2) використовується для окислення

нітритів (NO_2^-) до менш токсичних нітратів (NO_3^-). Процес включає реакцію, внаслідок якої відбувається перетворення:



Цей метод може бути використаний для зниження рівня нітритів у воді рециркуляційної системи. Однак, необхідно враховувати, що ефективність видалення нітритів залежить від ряду факторів, таких як концентрація нітритів, концентрація пероксиду водню, рівень рН, температура та інші параметри води [14].

Рядом авторів з метою посилення окислення нітритів до нітратів використовувались різні концентрації H_2O_2 . Так, в одному з експериментальних досліджень використовували 2,5 мл/л 35%-ного пероксиду водню. Автори досягли бажаного результату без негативних наслідків для біофільтру та рибопосадкового матеріалу [10].

В нашому дослідженні було використано кінцеву концентрацію пероксиду водню 0,003%. Результати проведених досліджень показали статистично достовірне зниження вмісту нітрит-іонів у досліджуваних зразках води (рис. 3.4.). Так, у воді з рибоводних басейнів концентрація нітритів знизилась удвічі.

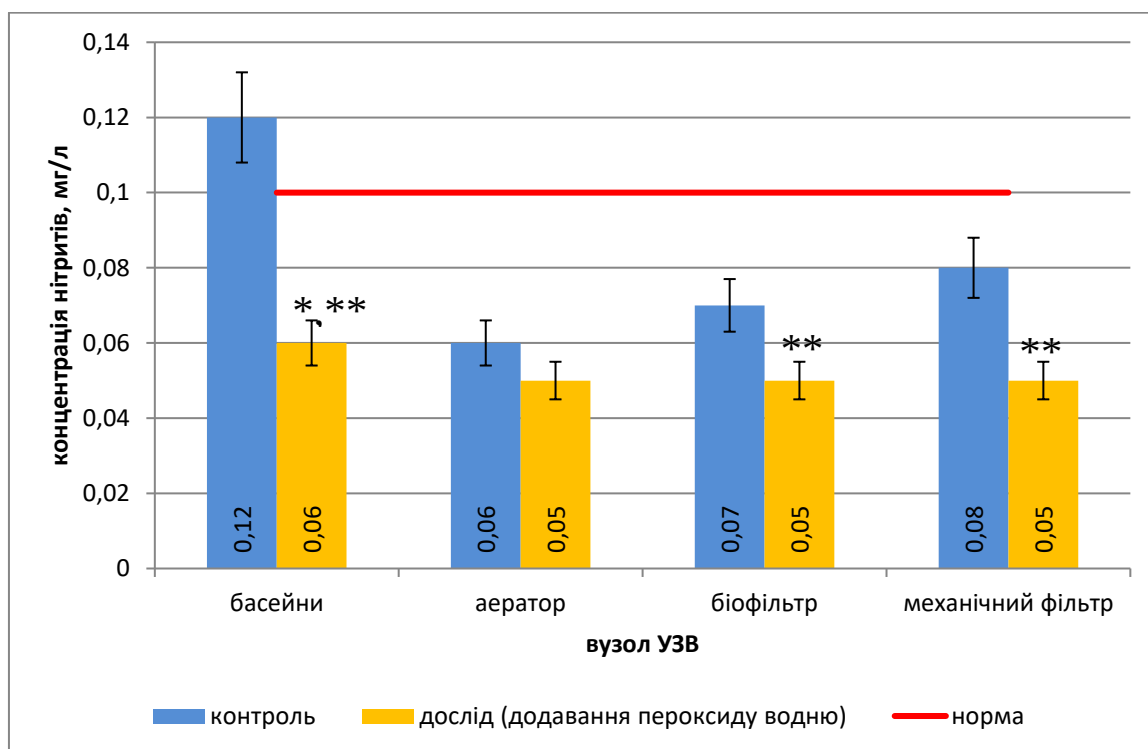


Рис. 3.4 Концентрація нітритів у воді УЗВ за умов додавання пероксиду водню

*Примітка (тут і надалі): * - різниця між дослідними значеннями та нормою статистично достовірна; ** - різниця між дослідними значеннями та контролем статистично достовірна ($p \leq 0,05$);*

Попри численні переваги застосованого методу, зокрема його ефективність, швидкість та відносну доступність, слід відмітити, що можливість його застосування у закритих аквакультурних системах потребує подальшого вивчення. Пероксид водню може бути токсичним для риб та інших водних організмів у високих концентраціях. Неправильне застосування або надмірне дозування H_2O_2 може зашкодити риbam та іншим організмам у водному середовищі.

Для підтримання ефективного рівня очищення води від нітритів за допомогою пероксиду водню потрібно регулярно додавати реагент до системи. Це може бути проблематичним у великих установках або у випадку, коли автоматичне дозування не встановлено. Для успішного застосування пероксиду водню для очищення води від нітритів потрібен постійний моніторинг та контроль рівня нітритів у воді. Це вимагає використання відповідних методів аналізу та налагодження процесу дозування сполуки [23].

Одним з методів зменшення концентрації нітритів є використання активованого вугілля. Цей метод базується на процесі адсорбції, де забруднюючі речовини утримуються на поверхні вугілля. Воно має велику поверхневу площу та пористу структуру, що дозволяє ефективно адсорбувати речовини з водного середовища. Пористі канали та поверхнево активні центри вугілля здатні притягувати та утримувати нітрити на своїй поверхні.

Під час адсорбції нітритів на активованому вугіллі можуть відбуватися хімічні процеси, такі як йонний обмін або утворення хелатних комплексів. Ці процеси сприяють затримці нітритів і зменшенню їх концентрації у воді.

Для досягнення ефективного зменшення концентрації нітритів воду потрібно утримувати у контакті з активованим вугіллем протягом достатнього часу. Цей час може залежати від типу вугілля, його кількості та інших факторів [25].

Arenas L. R. зі співавторами використовували 5 г/л гранульованого вугілля на основі шкаралупи кокосового горіха в природній поверхневій воді Женевського озера, яка використовується як джерело питної води. Завдання, поставлене перед авторами, було виконано [9]. У нашій роботі ми використовували таблетоване активоване вугілля в концентрації 1 г/л.

Результати експериментальних досліджень показали, що використання такої дози активованого вугілля призводить до зниження вмісту нітрит-іонів у досліджуваній воді (рис. 3.5.). Зокрема, у воді з басейнів концентрація нітритів знизилась у 1,5 рази, механічному фільтрі – 1,3 рази. В інших вузлах УЗВ достовірних відмінностей при застосуванні активованого вугілля відмічено не було.

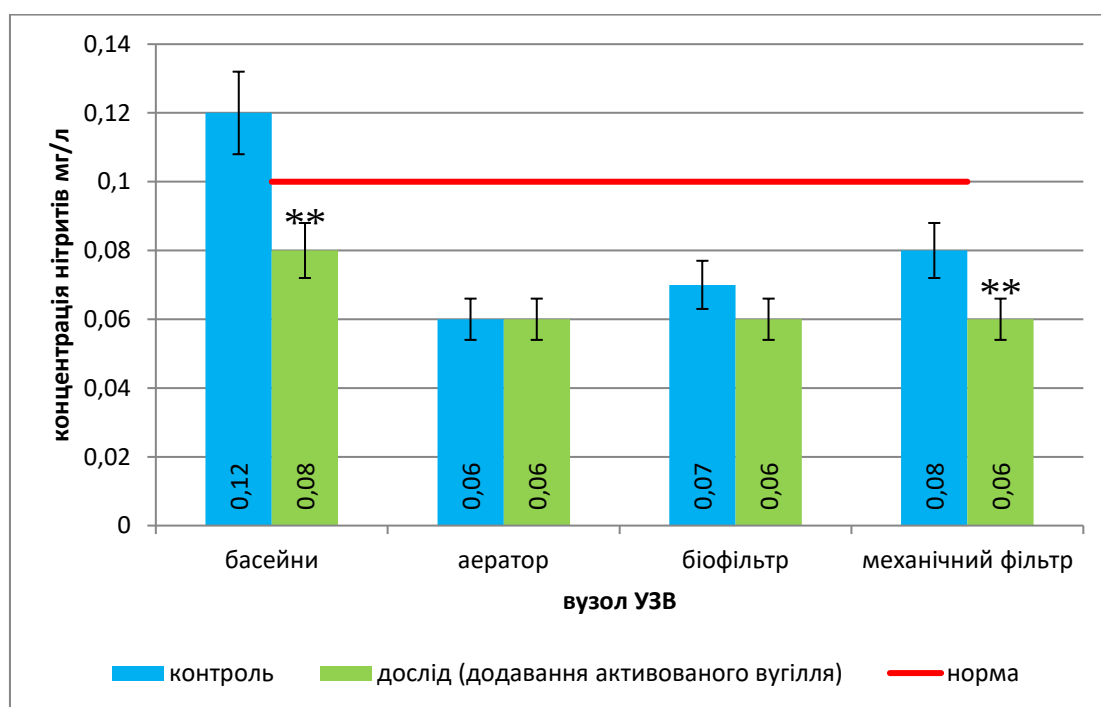


Рис. 3.5 Концентрація нітритів у воді за умов додавання активованого вугілля

Як відомо, активоване вугілля має велику поверхневу площу і високу адсорбційну здатність, що дозволяє ефективно утримувати нітрити на поверхні. Зауважимо, що процес очищення води від нітритів за допомогою активованого вугілля є доволі простий у використанні, адже вугілля може бути легко поміщено в фільтр або колонку і підключено до системи очищення води.

Проте, слід зазначити, що активоване вугілля має обмежену ємність поглинання, тому з часом його поглинальна здатність може зменшуватись. При цьому необхідно регулярно контролювати рівень нітритів у воді та змінювати вугілля, коли воно втрачає свою ефективність.

Під час процесу адсорбції активоване вугілля також може взаємодіяти з іншими речовинами у воді, такими як розчинені речовини та мінерали. Це може призвести до зміни хімічного складу води та вплинути на баланс інших хімічних параметрів. Залежно від умов використання, активоване вугілля може потребувати регенерації або заміни через насичення. Це може вимагати додаткових зусиль та витрат часу і ресурсів [19].

З метою зниження концентрації нітритів нами було апробовано застосування базальтових туфів, які також мають пористу структуру, Туф - це пористий матеріал, який має високу здатність до поглинання різних речовин, включаючи нітрити. Цей процес базується на тому, що нітрити фізично поглинаються на поверхні туфу шляхом адсорбції. Це означає, що нітрити прив'язуються до його поверхні, утворюючи мономолекулярний шар і зберігаються на ньому [21]. Туф - природний матеріал, який може бути доступним і досить дешевим для використання. Він може бути знайдений у природних джерелах, таких як вулканічні породи, і не вимагає складних процесів виробництва.

Показана можливість використання 5 г/л цеолітного композиту, що складається з туфу та поліуретанової губки, для зниження концентрації нітритів у біофільтрі для очищення стічних вод [33].

У нашому дослідженні ми використовували 1 г/л гранульованого базальтового туфу з родовища „Полицьке-2”, що є алюмосилікатом з масовим співвідношенням $Si/Al = 4,5-4,7$, містить залізо в кількості 83,3–86,3 г/кг, а також мікроелементи (цинк, мідь, кобальт, нікель) в кількостях 1,29–0,07 г/кг.

Результати проведених досліджень показали статистично достовірні відмінності у вмісті нітритів після застосування вказаних цеолітів лише у воді з механічного фільтра (на 30%) та рибоводних басейнах (на 17%) (рис. 3.6.).

Імовірно, отримані результати зумовлені використанням термічно неактивованого туфу, іонобмінні властивості якого є нижчими у порівнянні з тим, який проходить обробку при температурі від 150 градусів.

Туф – неорганічний матеріал і не містить хімічних домішок, що можуть бути шкідливими для акватичних організмів у рециркуляційній системі.

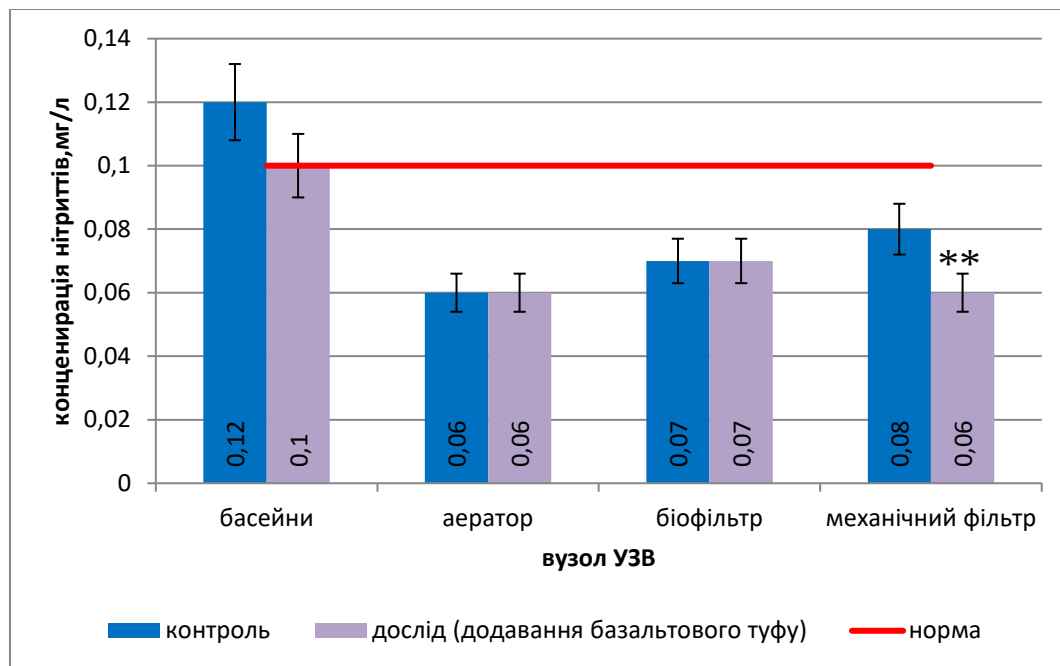


Рис. 3.6 Концентрація нітритів у воді за умов додавання базальтового туфу

Для ефективного використання туфу для очищення води від нітритів, необхідно використовувати систему фільтрації, щоб утримувати туф і запобігати його виносу з водоносного середовища [37]. Після певного часу експлуатації туф може насититися нітритами і втратити свою ефективність. У такому випадку необхідно замінити насичений туф на свіжий, що може вимагати додаткових витрат часу та ресурсів.

Отже, аналіз застосування різних технологій очищення від нітрит-іонів води з вузлів із рециркуляційної системи для вирощування риби, показав, що найефективнішим методом виявився метод із застосуванням пероксиду водню, який призвів до зменшення концентрації нітритного азоту у всіх дослідних зразках в середньому на 33%. При застосуванні методу з активованим вугіллям концентрація нітритів в середньому знизилась на 18%. Використання базальтового туфу виявилось найменш ефективним (рис. 3.7.).

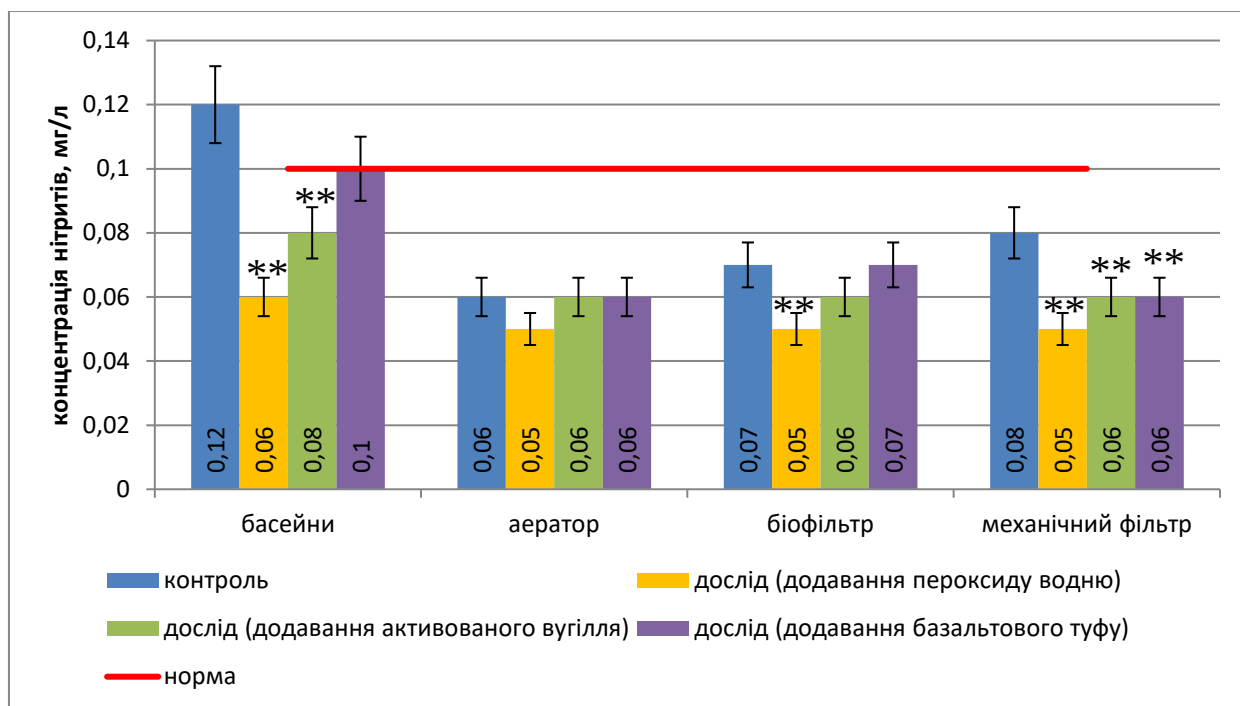


Рис. 3.7. Порівняння хімічних методів очищення води від нітритів

Важливо, щоб методи зниження вмісту нітритів, які використовуються при роботі рециркуляційної системи, володіли мінімальним впливом на склад біоплівки біофільтра. З цією метою нами було оцінено життєздатність нітрифікуючих бактерій біофільтра УЗВ за дії найефективнішого серед досліджуваних чинників – перексиду водню.

3.2. Оцінка життєздатності нітрифікуючих бактерій після взаємодії з найефективнішим очисним агентом

Для отримання накопичувальної культури нітрифікуючих бактерій використовували середовища Енгеля та Александера. Вони відрізняються між собою джерелами нітрогену і таким чином дали змогу вирощувати мікроорганізми першої та другої фаз нітрифікації. Так, середовище для першої фази нітрифікації, як джерело нітрогену, містить сполуку $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, а для другої фази – NaNO_2 .

На засіяних чашках Петрі було виявлено білі колонії круглої форми. Після зафарбовування за Грамом було з'ясовано, що мікроорганізми належать до грамнегативних бактерій та за формою – більшість коковидні, проте зустрічались паличкоподібні. За визначником Берджи [18] встановлено, що культивовані бактерії належать до родів *Nitrosomonas* та *Nitrobacter* відповідно (рис. 3.8.).

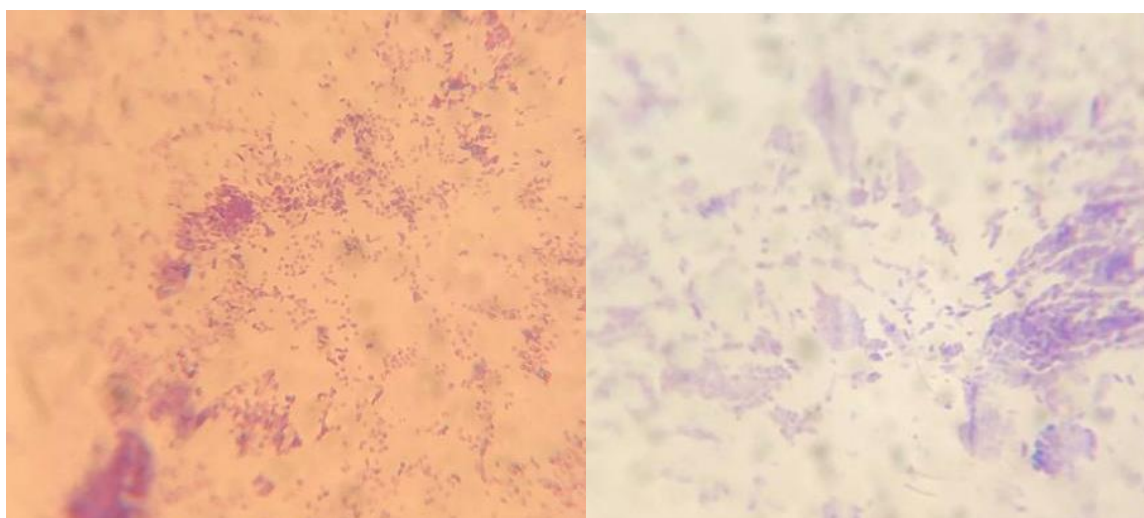


Рис. 3.8. Мікропрепарати бактерій першої та другої фаз нітрифікації

Як відомо, пероксид водню вважається “зеленим” окислювачем оскільки він розщеплюється, а саме дисоціює у воді, на нетоксичні екологічно безпечні побічні продукти, що призводить до утворення молекулярного кисню, двох молекул води та гідроксильного радикалу. Проте у великій концентрації H_2O_2 може негативно впливати на мікроорганізми у біофільтрі [10].

Після проведення експерименту з додаванням до середовища першої фази нітрифікації з мікроорганізмами 0,3%-го розчину пероксиду водню – ми виявили, що зон затримки росту після семиденної обробки розчином пероксиду водню колоній не було.

Кількість КУО через 7 діб додавання пероксиду водню в порівняно із кількістю перед додаванням розчину достовірно не змінилась. (таб. 2).

Таблиця 2

	КУО		
	Перед додаванням H_2O_2 до лунок культурального середовища		після додавання H_2O_2 до лунок культурального середовища
	3 день	7 день	14 день
контроль	320 ± 32	395 ± 40	391 ± 39
дослід	376 ± 38	440 ± 44	435 ± 44

Загалом, через 14 діб експерименту кількість КУО в контролі збільшилась на 22%, в досліді – на 15 %.

Після проведення експерименту з додаванням до середовища другої фази нітрифікації 0,3%-го розчину пероксиду водню ми виявили, що зон затримки росту, після семиденної обробки розчином, колоній не було.

Кількість КУО у контролі та у досліді достовірно не змінилась (таб. 3).

Таблиця 3

Кількість КУО на чашках Петрі з середовищем Александра

	КУО		
	Перед додаванням H_2O_2 до лунок культурального середовища		після додавання H_2O_2 до лунок культурального середовища
	3 день	7 день	14 день
контроль	36 ± 3	38 ± 4	38 ± 2
дослід	30 ± 4	31 ± 3	31 ± 4

Проте, такий метод слід вважати екстремним способом зменшення концентрації нітритів. Регулярне застосування пероксиду водню може негативно вплинути на роботу біофільтру та пригнітити активність мікроорганізмів у рециркуляційній системі, що може призведе до розладу нітрифікації у біофільтрі.

ВИСНОВКИ

1. За умов зменшення інтенсивності роботи аераторів вміст нітритів у воді з басейнів рециркуляційної системи на 20% перевищував нормативні показники, в той час, вміст амонію та нітратів знаходився у межах норми.
2. Застосування пероксиду водню в кінцевій концентрації 0,003% призвело до зменшення концентрації нітрит-іонів у пробах з різних вузлів УЗВ в середньому на 33%.
3. Використання активованого вугілля зменшує концентрацію NO_2^- у воді на 18% у порівнянні з контролем..
4. Застосування базальтового туфу з родовища “Полицьке-2” призвело до зниження вмісту нітритів у воді з механічного фільтра (на 30%) та рибоводних басейнів (на 17%).
5. 0,03% розчин пероксиду водню не спричиняє затримки росту та зменшення кількості КУО бактерій родів *Nitrosomonas* та *Nitrobacter*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Арсан, О. М., Давидов, О. А., Дьяченко, Т. М., Евтушенко, М. Ю., Жукинський, В. М., Кирпенко, Н. І., & Якушин, В. М. (2006). Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод. *За ред. В. Д Романенка. – НАНУ: Ін-т гідробіології. – К: Логос*, 156-180.
2. Василенко, О. А., Поліщук, О. В., & Василенко, Л. О. (2014). Впровадження технології біологічної очистки стічних вод від сполук азоту і фосфору на міських очисних спорудах. *Екологічна безпека та природокористування*, (15), 90-101.
3. Гриневич, Н. Є., Димань, Т. М., Мазур, Т. Г., Слюсаренко, А. О., Кухтин, М. Д., & Світельський, М. М. (2021). Дослідження впливу різних типів наповнювачів реактора біофільтра на процес формування нітрифікуючої мікрофлори в установках замкнутого водопостачання в індустріальних аквафермах. *Ліга-Прес*, 478-508.
4. Єгорова, А. В., Труфкаті, Л. В., Шпирко, Т. В., & Єриганов, К. В. (2014). Впровадження у навчальний процес нових методів мікробіологічних досліджень. 154-155.
5. Кононенко, Р. В. (2013). Використання установки замкнутого водопостачання при інтенсифікації виробництва рибопродукції. *Рибогосподарська наука України*, (2), 56-65.
6. Формування пропозиції на рибу та інші водні біоресурси в рециркуляційних аквакультурних системах у контексті сталого розвитку сільських територій (2022) Укладачі: Шарило Ю. Є., Вдовенко Н. М., Поплавська О. С., Дмитришин Р. А., Томілін О. О., Герасимчук В. В. НУБіП України, БУ «МТЦ з аквакультури», 96 с.
7. Челябієва, В. М., & Савченко, О. М. (2023). Технічна мікробіологія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт. 54-56.
8. Шарило, Д. Ю., Коваленко, В. О., & Коваленко, Б. Ю. (2019). Особливості використання біофільтрів з різними типами наповнювачів на етапі встановлення

біологічної рівноваги в установках замкненого водозабезпечення. *Scientific Journal'Animal Science & Food Technologies'*, 10(2), 63-65.

9. Arenas, L. R., Gentile, S. R., Zimmermann, S., & Stoll, S. (2021). Nanoplastics adsorption and removal efficiency by granular activated carbon used in drinking water treatment process. *Science of the Total Environment*, 791, 148-175.

10. Bögner, D., Bögner, M., Schmachtl, F., Bill, N., Halfer, J., & Slater, M. J. (2021). Hydrogen peroxide oxygenation and disinfection capacity in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural engineering*, 92, 102140. 84-92.

11. Choy, K. K. H., & McKenna, J. E. (2005). Removal of nitrate and nitrite by carbonaceous adsorbents. *Journal of Environmental Engineering*, 131(3), 432-456.

12. Colt, J. (2013). Biofiltration: An overview of the role of microbial biofilms in water quality improvement. In *Microbial Biofilms*, 1-22

13. de Magalhães, L. F., da Silva, G. R., & Peres, A. E. C. (2022). Zeolite application in wastewater treatment. *Adsorption Science & Technology*, 2022, 1-26.

14. Deng, C., Chen, Z., Li, Y., Chen, H., Chen, Y., Zhou, S., ... & Tan, Y. (2024). Effective recovery of the nitrification process through hydrogen peroxide. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-14.

15. Ebeling, J. M., & Timmons, M. B. (2010). *Recirculating aquaculture*. Ithaca, NY, USA: Cayuga Aqua Ventures. 619-663.

16. Francis-Floyd, R., & Rakocy, J. E. (1999). Nitrogen in recirculating aquaculture systems. *Southern Regional Aquaculture Center Publication No. 441*. 61-88.

17. Hargreaves, J. A. (1998). Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture*, 166(3-4), 181-212.

18. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th. *Baltimor: William & Wilkins*, 786-788.

19. Huno, S. K., Rene, E. R., van Hullebusch, E. D., & Annachhatre, A. P. (2018). Nitrate removal from groundwater: a review of natural and engineered processes. *Journal of Water Supply: Research and Technology—AQUA*, 67(8), 885-902.

20. Jiang, Z., Wu, M., Gu, P., Huang, W., Yu, C. P., Zheng, Z., ... & Li, Y. (2024). Layered double hydroxide@zeolite composite modified sponge: A versatile biocarrier for enhancing nitrogen removal in biofilters. *Chemical Engineering Journal*, 481, 148-686.
21. Khan, F. A., & Ghaffar, A. (2019). Zeolites as efficient adsorbents for water and wastewater treatment: A review. *Desalination and Water Treatment*, 145, 57- 90.
22. Koops, H. P., Bher, B., Mr, U. C., Pommerening-R, A., & Stehr, G. (1991). Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. nov. *Microbiology*, 137(7), 1689-1699.
23. Kuhn, D. D., Van Hooser, D., & Boardman, G. (2000). Hydrogen peroxide as a management tool in aquaculture. *SRAC Publication No. 470*, 63-82.
24. Lindholm-Lehto, P., Pulkkinen, J., Kiuru, T., Koskela, J., & Vielma, J. (2020). Water quality in recirculating aquaculture system using woodchip denitrification and slow sand filtration. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 17314-17328.
25. Peng, Y., et al. (2020). Influence of activated carbon type and dosage on nitrite adsorption in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*. 87- 91.
26. Prosser, J. I. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 30, 125-181.
27. Rakocy, J. E., Masser, M. P., & Losordo, T. M. (2006). Recirculating aquaculture tank production systems: Aquaponics-integrating fish and plant culture .№ 454. *Southern Regional Aquaculture Center*, Texas. 1-17.
28. Rigoni, G. A. (2013). Trattamento anammox per la rimozione dell'azoto ammoniacale dal centrifugato di digestione anaerobica. UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA, 19-24.
29. Slonczewski, J. L., Foster, J. W., & Foster, E. (2020). *Microbiology: An Evolving Science Fifth International Student Edition with Ebook, Smartwork5, Animations, eTopics and eAppendices*. WW Norton & Company. 581-600.

30. Schreier, A. D., May, B., & Gille, D. A. (2013). Incidence of spontaneous autopolyploidy in cultured populations of white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture*, 416, 141-145.
31. Smith, J. K., et al. (2018). The role of hydrogen peroxide in aquaculture systems: A review. *Aquaculture Engineering*, 82, 42-55.
32. Svobodova, Z., Lloyd, R., Machova, J., & Vykusova, B. (1993). Water quality and fish health. EIFAC Technical Paper, 54. FAO, Rome, 14-19.
33. Svobodova, Z., Machova, J., Poleszczuk, G., Hůda, J., Hamáčková, J., & Kroupova, H. (2005). Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems. *Acta Veterinaria Brno*, 74(1), 129-137.
34. Timmons, M. B., Ebeling, J. M., Wheaton, F. W., & Summerfelt, S. T. (2002). *Recirculating aquaculture systems* (2nd ed.). Cayuga Aqua Ventures. 743-769.
35. Wang, W., Zhang, P., Yang, L., Wei, J., Jiang, Z., & Li, Y. (2018). Adsorption characteristics and mechanisms of nitrite by pumice. *Desalination and Water Treatment*, 123, 241-371.
36. Villaverde, S., García-Encina, P. A., & Fdz-Polanco, F. (1997). Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. *Water Research*, 31(5), 1180-1186.
37. Yang, J., Xu, H., Wang, D., Wu, D., Liu, X., & Li, Z. (2020). Ammonium and nitrate removal from water by natural zeolites: A review. *Journal of Molecular Liquids*, 142-299.
38. Zavarzin, G., & Legunkova, R. (1959). The Morphology of *Nitrobacter winogradskyi*. *Microbiology*, 21(1), 186-190.

ДОДАТОК А

Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях

Дозволяється працювати лише на заземлених об'єктах.

Приміщення хімічних лабораторій обладнуються вентиляцією, а місця можливого накопичення шкідливих хімічних речовин – відсмоктувачами.

Підлоги лабораторій повинні мати рівну, неслизьку, зручну для очищення поверхню, бути стійкими до дії механічних навантажень, вологи і агресивних середовищ.

Кожен працівник у лабораторії повинен мати закріплене за ним робоче місце. Перед початком роботи слід одягти спецодяг (халат).

У спецодязі забороняється знаходитись за межами лабораторії.

При можливості скляний посуд і скляні частини замінюють пластиковими.

Нагріваючи рідину в пробірці або інших посудинах, їх тримають спеціальними утримувачами так, щоб отвір був спрямований від себе і працюючих поруч.

При перенесенні посудин із гарячою рідиною користуються рушником, посудину при цьому тримають обома руками: однією за дно, а другою за горловину. При переливанні рідин (крім тих, що містять біологічний матеріал) користуються лійкою.

При розведенні речовин, що супроводжуються виділенням тепла, користуються термостійким хімічним посудом.

При роботі з кислотами та лугами виконують такі заходи безпеки:

- усю роботу з концентрованими кислотами та лугами проводять у витяжній шафі, користуючись при цьому окулярами, гумовими рукавичками та фартухом;
- концентровану кислоту відбирають із посудини тільки за допомогою спеціальної піпетки з грушею або сифоном;
- при приготуванні розчинів кислот спочатку в посудину наливають необхідну кількість води, а потім додають кислоту. Забороняється додавати воду в кислоту;

- при приготуванні розчинів лугів наважку лугу опускають у велику широкогорлу посудину, заливають необхідною кількістю води і старанно перемішують. Шматки лугу варто брати тільки щипцями;
- концентровані кислоти і луги виливають у раковину після попередньої їх нейтралізації.

При роботі з легкозаймистими речовинами (ефір, бензин, бензол, ацетон, спирт та ін.) дотримуються такої вимоги:

- усі роботи проводяться у витяжній шафі при ввімкненій вентиляції, вимкнутих газових пальниках і нагрівальних електроприладах.

Категорично забороняється:

- доручати проведення робіт із вогнебезпечними речовинами недосвідченому співробітнику;
- під час роботи в приміщенні запалювати сірники, палити, включати прилади, при роботі яких може виникнути іскра.

Після закінчення роботи із шкідливими речовинами необхідно:

- привести в порядок робоче місце;
- залишки шкідливих речовин здати на зберігання;
- старанно вимити руки з милом.

Забороняється використовувати речовини без етикеток та із закінченим терміном зберігання;

Після закінчення роботи необхідно вимити та висушити посуд, прибрати робоче місце, провітрити приміщення, відключити всі нагрівальні та освітлювальні прилади, закрутити водопровідні та газові крани.

Категорично забороняється працювати в лабораторії одному.

Виходячи з лабораторії, обов'язково перевірити, чи вимкнені газ, вода, електроенергія.

Надання першої допомоги

При виникненні пожежі в лабораторії необхідно негайно вимкнути газ та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймисті рідини, вогонь засипати піском.

Великий вогонь гасять за допомогою вогнегасника. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою. Якщо на людині палає одяг, її треба швидко закутати в ковдру, халат або покласти на підлогу і, перекочуючи, збивати полум'я.

У всіх лабораторіях у доступному постійному місці має бути аптечка з набором необхідних матеріалів і медикаментів.

При теплових опіках роблять примочку з розчином 2 %-го KMnO_4 , а потім наносять мазь від опіків.

При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити речовину, що викликала опік, відповідним розчинником, а потім уражену ділянку обробити етиловим спиртом і змастити маззю від опіків.

При опіках кислотами ушкоджене місце обмивають водою з крану, а потім 3 %-вим розчином натрій гідрогенкарбонату (питної соди); при опіках їдкими лугами – водою, а потім 2 %-вим розчином оцтової або борної кислоти і знову водою.

При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у розчині питної соди, і знову змити водою; при опіках очей лугом – промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 2 %-му розчині борної кислоти, і знову промити водою. Після цього необхідно звернутись до лікаря.

При порізах склом у першу чергу необхідно пінцетом, попередньо промитим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, рану промити дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етиловому спирті, а далі змастити 5 %-вим розчином йоду та забинтувати. Невеликі порізи можна заклеїти антисептичним пластиром.

При ураженні електрострумом насамперед необхідно відключити електроенергію, а потім, якщо необхідно, зробити штучне дихання та викликати швидку допомогу.

При інгаляційних ураженнях потрібно негайно вийти на свіже повітря.