

**Research** article





# Optimization of Biodenitrification Using Aluminum and Calcium Based Graphene Nanostructures in Bioreactor

Atieh Ekrami<sup>1</sup>, Lobat Taghavi<sup>1\*</sup>, Behnam Rasekh<sup>2</sup>, Fatemeh Yazdian<sup>3</sup>

1.Department of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2.Environment & Biotechnology Research Division, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Tehran, Iran

3.Department of Life Science Engineering, Faculty of New Science and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

### Abstract

Aim and Background: The problem of water pollution is a fundamental and influential issue for the healthy life of humans and bioorganisms. The aim of this study is to optimize aluminum and calcium-based graphene nanostructures by response surface methodology (RSM) in order to investigate their role in biodenitrification. The optimized removal conditions in the bioreactor were investigated.

**Materials and Methods:** Characterization of graphene oxide/aluminum (rGO/Al) and graphene oxide/calcium (rGO/Ca) nanostructures was determined by XRD, SEM and FTIR. The two effective operating parameters of temperature (°C) and concentration (g/L) of rGO/Al and rGO/Ca nanostructures in biodenitrification of *Thiobacillus denitrificans* microorganism in the presence of nanostructures were optimized by RSM. Chromotropic Acid method was used to measure nitrate.

**Results:** The FTIR spectrum confirmed the interaction between RGO-aluminum and rGO/Ca. By SEM analysis, the average diameters of rGO/Al and rGO/Ca nanostructures were observed in the range of 10.24-39.21 nm and 20.86-34.29 nm, respectively. In the presence of rGO/Ca and rGO/Al, with increasing temperature (35°C) and increasing nanostructured concentration (1g/L), removal was achieved for 74.0985% and 77.6905%, respectively. After determining the optimized conditions, the biodenitrification of the microorganism in the presence of nanostructures was investigated in the bioreactor. According to the results, the microorganisms in the presence of rGO/Ca and rGO/Al nanostructures had 74.0985% and 77.6905% biodenitrification, respectively.

**Conclusion:** The percentage of biodegradation in the presence of rGO/Al was higher than rGO/Ca and in the presence of rGO/Al was 98%, so this nanostructure in the bioreactor showed higher efficiency in nitrate removal.

Keywords: Biodenitrification, rGO/Ca and rGO/Al nanostructures, Bioreactor, Optimization

**Corresponding author:** 

Environment & Biotechnology Research Division, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Tehran, Iran

Email: taghavi\_lobat@yahoo.com



شاهده این مقاله به آنلاین اسکن کنید

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی دوره ۱۳ - شماره ۵۰ - بهار ۱۴۰۲



بهینهسازی نیتراتزدایی زیستی با بهرهگیری از نانوساختارهای گرافنی پایه آلومینیوم و کلسیم در بیوراکتور عطيه اكرامي'، لعبت تقوى"\*، بهنام راسخ'، فاطمه يزديان "

> ۱. گروه منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران ۲. پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران ۳. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

### چکیدہ

**سابقه و هدف:** معضل آلودگی منابع آب یک موضوع اساسی و تأثیرگذار برای زندگی سالم انسانها و موجودات زنده است. هدف از این پژوهش بهینهسازی نانو ساختارهای گرافنی پایه آلومینیوم و کلسیم توسط روش سطح پاسخ (RSM) به-منظور بررسی نقش آنها در نیتراتزدایی زیستی است.

**مواد و روشها:** شرایط بهینه حذف در بیوراکتور بررسی گردید. مشخصهیابی نانوساختارهای گرافن اکسید/آلومینیوم (rGO/Al) و گرافن اکسید /کلسیم (rGO/Ca) توسط SEM ، XRD و FTIR تعیین گردید. دو پارامتر عملیاتی مؤثر دما (°C) و غلظت (g/L) نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca در نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس توسط روش سطح پاسخ (RSM) بهینه شد. از روش Chromotropic Acid جهت سنجش نیترات استفاده شد.

يافته ها: طيف FTIR، برهم كنش بين rGO وآلومينيوم وrGO وكلسيم را تأييد كرد. توسط ميكروسكوپ الكتروني روبشي (SEM) قطر متوسط نانوساختارهای rGO/A1 و rGO/Ca بهترتیب در محدوده ۲۴/۲۱-۱۰/۳۹ نانومتر و ۲۹/۳۴-۲۰/۳۴ نانومتر مشاهده شد. درحضور rGO/Ca وrGO/Al با افزایش دما (۳۵۵) و افزایش غلظت نانوساختار (۱ g/L) حذف غیرزیستی بهترتیببرابر ٪۷۴/۰۹۸۵ و ٪۷۷/۶۹۰۵ حاصل شد. پس از تعیین شرایط بهینه، نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختارها و در بیورآکتور بررسی شد. طبق نتایج، میکروارگانیسم در حضور نانوساختارهای rGO/Ca و rGO/Al بهترتیب میزان ٪/۷۶/۶۹۵۷ و ٪۸۵/۲۵۷۲ نیتراتزدایی زیستی داشت.

**نتیجهگیری:** درصد نیتراتزدایی زیستی در حضور rGO/Al نسبتبه rGO/Ca بیشتر بوده و در حضور rGO/Alمیزان ٪۸۲ حاصل شد، بنابراین این نانوساختار در بیوراکتور کارایی بالاتری در حذف نیترات نشان داد.

واژگان كليدى: نيتراتزدايىزيستى، نانوساختار rGO/Al ،rGO/Ca، بيوراكتور، بهينەسازى

#### مقدمه

در کشورهای توسعهیافته و صنعتی، فعالیتهای انسانی بیشترین نقش را در تشدید کمبود آب بهوسیله آلوده كردن منابع آب طبيعي بازي ميكند (١). يون نيترات از مهمترین آلودگیهای منابع آبی است. این نوع آلودگی

نویسنده مسئول:

پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران پست الكترونيكى: taghavi\_lobat@yahoo.com پست الكترونيكى: تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۴

علاوهبر چرخه طبیعی نیتروژن، بهطور عمده توسط آلودگیهای صنعتی و شهری، فعالیتهای انسانی و کشاورزی ایجاد می شود. آلودگی نیتراتی پسابها زمانی رخ میدهد که نیترات بیشتر از مقدار مجاز در پساب وجود داشته باشد (۲). بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا و سازمان بهداشت جهانی حد مجاز غلظت نیترات mg/L ۱۱/۳ بوده و بیشتر از این مقدار برای سلامت انسان، بهویژه نوزادان خطرناک است (۳). با توجهبه حلالیت بالای يون نيترات، حذف آن از آب بسيار پرهزينه است. مصرف آبهای آلوده به نیترات باعث می شود نیترات وارد شده توسط باکتریهای سامانه گوارش به نیتریت تبدیل شود.

1001 1.22285458.1402.13.50.5.5

DOR: 20.

۵.

شده با نانوذرات Fe<sup>0</sup> ماده مؤثری برای حذف نیترات از آب است. با توجهبه سطح مقطع بالای گرافن می توان به عنوان حامل زیستی استفاده کرد (۱۴). میکروارگانیسم تيوباسيلوس دنيتريفيكانس (Thiobacillus denitrificans)، به صورت میلهای و گرممنفی استکهمیتواند دنیتریفیکاسیون اتوتروف انجام دهد و طیفوسیعی از ترکیبهای کاهش یافته گوگرد را برای بهدست آوردن انرژی اکسید کند. بهدلیل این که این میکروار گانیسم ترجيح به استفاده از اكسيژن بهجاى نيترات بهعنوان گیرنده الکترون نهایی دارد، دنیتریفیکاسیون فقط تحت شرایط بیهوازی انتظار میرود (۱۵). باتوجهبه یک منبع کربن جهت نیتراتزدایی، از نانوساختارها و اندازههای مختلف آنها بهمنظور تأثير بر رهایش منبع کربنی استفاده می گردد. در میان انواع نانوذرات و نانوساختارها، برخی منجر به افزایش و برخی منجر به کاهش نیتریتزدایی زیستی میشوند. با توجهبه مرور مطالعهها، در این مطالعه از نانوذرات آلومینیوم و کلسیم با پایه کربنی در حذف زیستی نیترات استفاده شد.

استفاده از نانوذرات آلومینیوم و کلسیم با پایه کربنی در حذف زیستی نیترات، بهینهسازی نیتریتزدایی زیستی بر اساس برنامه آماری و بررسی نیتراتزدایی در سامانه کنترل شده (بیوراکتور) می تواند از جنبه های نوآورانه پژوهش حاضر باشد. Mook و همکاران نشان دادند دربیوراکتور با قرارگیری میکروارگانیسمهای اتوهیدروژنو-تروفیک روی سطح نانوکریستال PbO<sub>2</sub>، ٪۹۹ نیتراتزدایی زیستی مشاهده گردید (۱۶). Shengyan و همکاران بهینهسازی حذف نیترات از محلولهای آبی از طریق کاهش نانوذرات Fe<sup>0</sup> با پشتیبانی از گرافن اکسید (Fe<sup>0</sup>@rGO) را بررسی کردند. عملکرد حذف نیترات به-طور قابلتوجهی با ترکیب rGO بهبود یافت (۱۴). در مطالعه Rajab Beigy و همکاران، عملکرد نانوذره Fe<sup>0</sup> پایدار شده با نشاسته در فعالیت نیتراتزدایی زیستی تيوباسيلوس دنيتريفيكانس ارزيابي شد، نتايج نشان دادند نیتراتزداییزیستی *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* در حضور St-Fe<sup>0</sup> در بیوراکتور ۹۴/۷٪ است (۱۷). Jiang و همکاران نشان دادند استفاده از نانوحامل گرافنی منجر به بهبود چشم گیر در کارآیی حذف نیترات و کاهش تولید نیتریت و نیترئوس کسید می شود (۱۸). Mohammadi و همکاران، حذف همزمان فسفات/نیترات از آب را با استفاده از نانو کامپوزیت Ag/rGO به صورت سیستماتیک بررسی كردند. در شرایط بهینه، حداكثر حذف همزمان نیترات و فسفات بهترتیب ۸۸/۹۷٪ و ۹۱/۴۸٪ بهدست آمد (۱۹).

نیتریت در بدن سبب اکسیداسیون هموگلوبین به متهمو گلوبین می شود، در نتیجه اکسیژن رسانی به بافت ها مختل می شود (۴). تجمع نیترات در بدن عامل بسیاری از عوارض از جمله متهموگلوبین و دیابت، شناخته شده است (۵). بهدلیل این خطرها، نیاز جدی به فناوریهای مؤثر و کارایی بالا جهت تصفیه منابع آب آلوده به نیترات مورد نیاز است. روشهای متداول کاهش و حذف نیترات از منابع آب، روشهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی هستند كه متداول ترين آنها عبارتند از: جذب سطحى، اسمز معكوس، دنيتريفيكاسيون، الكترودياليز و تبادل يوني. از میان روشهای مذکور جذب سطحی بهدلیل سادگی، هزینه کم و راندمان بالا کاربرد گستردهای دارد (۶). روشهای شیمیایی حذف نیترات گران هستند و مشکلاتی مثل نیاز به بازسازی مداوم و تولید محصول های جانبی سمی را دارند. در نیتراتزدایی زیستی، میکروارگانیسمها بهویژه باکتریها نقش اصلی را در حذف نیترات از پساب بهعهده دارند (۷). مزیت این سیستمها عملکرد خوب میکروارگانیسمهای دنیتریفایر برای حذف نیترات، هزینه پائین و سرعت بالای دنیتریفیکاسیون است (۱۰–۸). روش زیستی حذف نیترات قادر به حذف همزمان چند آلاینده است، ولی روشهای فیزیکی و شیمیایی فقط قادر به حذف یک آلاینده خاص هستند (۱۱). دو نوع حذف بيولوژيكى نيترات بهصورت هتروتروف و اتوتروف وجود دارد. نیتراتزداهای هتروتروف که از ترکیبهای آلی بەعنوان منبعكربنى استفادە مىكنند، رايجترين نیتراتزداها در طبیعتاند (۱۲). به تازگی، فناوری نانو به-عنوان جایگزین عالی برای روشهای مرسوم حذف نیترات در نظر گرفته شده است. نانومواد با توجهبه اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بالا، بسيار واكنش پذير هستند و همین امر آنها را قادر میسازد که بهعنوان جاذب مورد استفاده قرار بگیرند (۱۳). استفاده از نانوساختارها توانسته بسیاری از محدودیتهای نیتراتزدایی زیستی را برطرف نموده و سبب بهبود این فرآیند شود. گرافن یکی از نانوساختارهای کربنی است و بهعنوان جاذبی ایدهآل و جذب کنندهای عالی و مؤثر در نظر گرفته شده است. یکی از کاربردهای جالب گرافن و گرافن کسید، عاملدار کردن آنها جهت استفاده در فرآیندهای حذف آلایندههای مختلف در منابع آبی است. طی این فرآیندها مولکولهای آلی روی صفحات گرافن قرار می گیرند. برای انجام این فرايند وجود برهم كنش كووالانس يا غير كووالانس گرافن با مولکولهای آلی و خصلت آبدوستی آن ضروری است که باعث پخش آسان آن در آب یا مایعات زیستی میشود. اکسید گرافن کاهش یافته (rGO) پشتیبانی

DOR: 20.1001.J 22285458.1402.13.50.5.5

۵۱

در این تحقیق از نانوساختارهای گرافنی پایه آلومنیوم و کلسیم در حذف زیستی نیترات توسط میکروارگانیسم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* استفاده شد. بهینهسازی فرآیند نیتراتزدایی توسط روش سطح پاسخ (RSM) نیتراتزدایی توسط روش سطح پاسخ (Response surface methodology) شرایط بهینه حذف در بیوراکتور بررسی گردید.

### مواد و روشها

میکروار گانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس ATCC 2364 نهر آلمان تهیه شد. این از مجموعه میکروبی DSMZ کشور آلمان تهیه شد. این میکروار گانیسم اتوتروف است و به یک منبع گوگردی (سولفیدهیدروژن، گوگرد عنصری یا تیوسولفات) بهعنوان منبع انرژی نیازمند است. برای کشت سویه باکتریایی تیوباسیلوس دنیتریفیکانس از محیط معدنی پایه <sup>۱</sup> استفاده شد. ترکیبهای محیط معدنی پایه (شرکت مرک کشور آلمان) در جدول ۱ ارائه شده است. جهت تعیین خصوصیات ساختاری و مورفولوژی نانوکامپوزیت، اندازه FT-IR نیری متوسط سایز ذرات از دستگاههای FT-IR گیری متوسط سایز ذرات از دستگاههای Perkin Elmer Spectrum، میکروسکوپ الکترونی روبشیه.PG Instrument

#### آزمون سنجش نيترات

از روش Nitrate میت سنجش نیترات استفاده شد(۲۱،۲۰). در این روش در اثر واکنش Nitrate استفاده شد(۲۱،۲۰). در این روش در اثر واکنش Nitrate Reagent B و Reagent A آلمان) با نیترات، محلول زرد رنگ ایجاد و در طول موج ۴۱۰ نانومتر میزان جذب محلول حاصل اندازه گیری شد. ۴۱۰ نانومتر میزان جذب محلول حاصل اندازه گیری شد. توسط سانتریفوژ در ۵۰۰۰ دور در دقیقه مدت ۲۰ دقیقه توسط سانتریفوژ در ۵۰۰۰ دور در دقیقه مدت ۲۰ دام در از فیلتر و عملیات رقیق اسازی، ۱ میلی لیتر محلول به لوله حاوی Nitrate ۲۰ میش اسازی شد. سپس با سازی، ۱ میلی لیتر محلول به لوله آزمایش اضافه شد و مجدد ۱۰ بار تکان داده شد تا رنگ زرد ظاهر شود. میزان غلظت نیترات به دست آمد (۴).

#### اندازهگیری رشد سلولی

جهت اندازه گیری رشد سلولی سوسپانسیون باکتری به محیط معدنی پایه (BSM) منتقل شد. پتاسیم نیترات به عنوان منبع نیترات با غلظت ۳۰۰ mg/L به محیط ۲۴–۴۸ اضافه شد. محیط کشت درانکوباتور (۳۰°۳) مدت ۴۸–۲۴

<sup>1</sup> Basal Salt Medium

ساعت گرماگذاری شد. میزان رشد میکروارگانیسم با اندازهگیری غلظت میکروارگانیسم بر حسب ppm و اندازه-گیری نیترات حذف شده در طولموج۴۱۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد (۲۱).

#### سنتز گرافن اکسید

جهت سنتز گرافناکسید تک لایه به روش هامر، ۱ گرم گرافیت (شرکت مرک آلمان) به ۲۰mL سولفوریکاسید (شرکت مرک آلمان) (۹۸٪) درون حمام یخ روی استیرر، افزوده شد تا گرافیت بهصورت کامل درون سولفوریک اسید حل شود، بعد از ۳۰ دقیقه ۳ گرم پرمنگناتپتاسیم (شرکت مرک آلمان) کمکم اضافه شد، پس از ۳۰ دقیقه ۵۰ میلی لیتر آب مقطر قطره اضافه گردید، بعد از ۱۰ دقیقه، ۲۰۰mL آب مقطر یک جا به محلول درحال هم-زدن افزوده شد، بعد از ۳۰ دقیقه ۲ همروژن زردن افزوده شد، بعد از ۳۰ دقیقه ۷ پراکسید (شرکت مرک آلمان) قطره قطره اضافه گردید و پس از ۲۴ ساعت محلول گرافناکسید از روی هیتر استیرر برداشته شد (۲۲).

### سنتز نانوساختار گرافن اکسید/آلومینیوم

مقدار ۶/۶گرم گرافن اکسید تهیه شده از مرحله قبل در ۱۰۰mL آب مقطر حل شده و مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، پروب سونیکیت انجام شد تا ذرات گرافن اکسید به-صورت کامل هموژن تبدیل شود. در مرحله بعد ۱ گرم سديم بورهيدرات (شركت مرك آلمان) كم كم اضافه شد و مدت ۲۴ ساعت در دمای C° ۱۰۰ بهطور کامل خشک گردید، سپس بهوسیله آب دیونیزه و اتانول شستشو و سانتریفیوژ شد و رسوب در آون خلاء دمای C° ۸۰ مدت یک شبانه روز قرار داده شد تا rGO بهدست آید. میزان ۷۵ gr rGO از مرحله قبل در ۱۵ میلی لیتر آب مقطر حل و مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، پروبسونیکیت انجام شد، سپس AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O ۳·mg (شرکت مرک آلمان) به محلول اضافه گردید تا بهصورت کامل حل شود، در نهایت محلول با غلظت Al-rGO Vmg/mL بهدست آمد. برای پودر کردن نمونه، ابتدا نمونه سانتریفیوژ و در یخچال C° ۲۰– قرار داده شد، سپس فریزدرایر انجام شد.

### سنتز نانوساختار گرافن اکسید/کلسیم

مقدار % مقدار % گرافن اکسید تهیه شده از مرحله قبل در m I مقطر حل و مدت m I دقیقه در دمای اتاق m y وبسونیکیت انجام شد. در مرحله بعد m I گرم سدیم بورهیدرات کم کم اضافه شد و m T ساعت در  $m C^{\circ}$  1.۰

طور کامل خشک شد، بهوسیله آب دیونیزه و اتانول شستشو و سانتریفیوژ شد و رسوب در آون خلاء دمای C° ۸۰ مدت یک شبانه روز قرار داده شد تا rGO بهدست آید. میزان ۲۵O ۲۵ میلی گرم از مرحله قبل در ۱۵mL آب مقطر حل و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، پروب سونیکیت

شد. میزان CaCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O ۳۰mg (شرکت مرک آلمان) به محلول اضافه شد و در نهایت محلول با غلظت mg/mL ۷ Ca/rGO بهدست آمد. برای پودر کردن نمونه، ابتدا نمونه سانتریفیوژ و در یخچال<sup>C</sup> ۲۰- قرارگرفت، سپس فریز درایر انجام شد.

جدول ۲. تر کیبهای محیط DSIVI						
مقدار (g/L)	تركيب	فرمول شيميايي				
١/٨	دى هيدروژن فسفات پتاسيم	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>				
١/٢	هيدروژن فسفات دي سديم	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>				
• / 1	سولفات منيزيم ۷ آبه	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O				
• / 1	آمونيوم سولفات	$(NH_4)_2SO_4$				
•/•٣	کلریدکلسیم ۲ آبه	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O				
۱۵	تيوسولفات سديم ۵ آبه	$Na_2S_2O_3.5H_2O$				
١mL	محلول عناصر كممقدار	Trace elements solution				
۰/۰۲	کلرید آهن (III) ۶ آبه	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O				
۰/۰۲	سولفات منگنز	MnSO <sub>4</sub>				
• /۵	سديم هيدروژن كربنات	NaHCO <sub>3</sub>				
۵	پتاسيم نيترات	KNO3				

جدول ۱. ترکیبهای محیط BSM

#### مشخصهيابي نانوساختارها

پس از سنتز نانوساختارها بهمنظور مشخصهیابی از روشهای تحلیلی مختلف استفاده شد. برای مطالعه ساختار سطحی و ریخت شناسی و اندازه نانوساختارها از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. بررسی ساختار کریستالی نانوساختارها توسط دستگاه پراش پرتو ایکس تحتتابش (λ=4056/1 (A) Cu-Kα، در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰mA انجام شد. جهت تأیید پیوند و برهم کنش بین آلومینیوم و نانوساختار و کلسیم و نانوساختار از طیفسنجی مادونقرمز استفاده شد.

### پوشش سطح میکروارگانیسم با نانوساختارها

جهت پوشش سطح میکروار گانیسم با نانوساختارهای -Al rGO و ca- rGO، ۴mL سوسپانسیون باکتری در ویالهای HSM به ۳۶mL محیط کشت BSM اضافه

شد، نانوساختارها جداگانه با غلظتهای g/L ۰/۰۵ ٬۰/۵، ۱/۰، ۱/۰، ۱/۰،

# بهینهسازی آماری نیترات زدایی زیستی نانو ساختارهای Al/rGO و Ca/rGO و میکرو ارگانیسم پوششیافته با نانوساختارها

در بهینه سازی آماری فعالیت نیتراتزدایی نانو ساختارهای Al/rGO و Ca/rGO، هم چنین فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانو ساختارها، دما (A) و غلظت نانو ساختارها (B) به عنوان دو متغیر تاثیرگذار درفعالیت نیتراتزدایی انتخاب شدند. به منظور بهینه سازی این دو عامل، نرمافزار روش سطح پاسخ، و به منظور غربال گری و ارزیابی شاخصهای مهم در فعالیت نیترات زدایی، نرم افزار Design-expert برای طراحی آزمایش (DOE) مورد استفاده قرار گرفت. محدوده سطوح متغیرها در جدول ۲ نشان داده شده است.

> جدول ۲. سطوح متغیرها در بهینه سازی آماری فرآیند نیترات زدایی نانوساختارهای Al-rGO و Ca-rGO و فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروار گانیسم یوشش یافته با نانوساختارها

سطح بالا (+)	سطح مرکزی	سطح پايين	متغير	علامت		
	(•)	(-)				
۳۵	٣٠	۲۵	دما (Ĉ)	А		
١	• /۵	٠/٠۵	غلظت نانوساختار	В		
			(g/L)			

اضافه شدند و میزان حذف نیترات بررسی شد. پس از تلقیح میکرو ارگانیسمها و نانوساختارها تحت شرایط سترون، فلاسکها در دمای  $\mathrm{C}^{\circ}$ ۰۳ مدت ۲۵ و ۳۵ ، ۴۸ -

آزمایش در ویالهای۴۰ میلیلیتر حاوی ۳۶ میلیلیتر محیط کشت انجام شد. محیطهای کشت حاوی غلظت ۳۰۰ mg/L نیترات مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱C° سترون شدند. ابتدا نانوساختارها جداگانه به محیط کشت

۵۳

54

ساعت در انکوباتور قرار داده شدند و فعالیت نیترات زدایی زیستی ارزیابی شد.

بررسی فرآیند نیتراتزداییزیستی میکرو ارگانیسم میکروارگانیسم در محیط BSM با غلظت ۳۰۰ mg/L نیترات مدت ۴۸ ساعت در دماهای ۲۵C° و ۳۰ و ۳۵ گرماگذاری شد. بهمنظور ارزیابی اثر دما در نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم، نمونهگیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج بررسی شد.

## بررسی فرآیند نیتراتزدایی نانوساختارهای -Al RGO و Ca-RGO

نانوساختارها در محیط BSM با غلظت نیترات ۳۰۰ppm، در سه غلظت G/L، ۵٬۰۱۵ ۱ نانوذرات در دماهای ۲۵°C ، ۳۰ و ۳۵ مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور گرماگذاری شدند. بهمنظور بررسی اثر غلظت نانوذرات و دما بر میزان نیتراتزدایی نانوساختارها، نمونه گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج بررسی شد.

## بررسی فرآیند نیتراتزدایی زیستی میکرو ارگانیسم پوشش یافته با نانوساختارهای Al-rGO و -Ca rGO

Al- میکروارگانیسمهای پوششیافته با نانوساختارهای -Al rGO و rGO درمحیط BSM با غلظت ۳۰۰ نیترات mg/L به مدت ۴۸ ساعت در غلظتهای g/L ۰/۰۵ گرماگذاری ۱ از نانوساختارها دردماهای ۲۵°۲۵ و ۳۵ گرماگذاری شدند. بهمنظوربررسیاثردما و غلظت نانوساختارها برمیزان نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم پوشش یافته با نانو ساختارهای Al- و Ca/rGO، نمونه گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج از طریق کیت نیترات بررسی شد.

### بررسی فرآیند نیتراتزدایی زیستی در بیوراکتور در حضور نانوساختارهای Al/rGO و Ca/rGO

پس از بررسی رشد و فعالیت نیتراتزدایی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در ویال ۴۰ میلیلیتر با ۳۶ میلیلیتر محیط کشت BSM در حضور و عدم حضور نانوساختارهای Al/rGO وCa/rGO، میکروارگانیسم در بیوراکتور با حجم ۱۵ mL حاوی ۱۲ mL محیط کشت BSM (سترون شده در اتوکلاو C<sup>°</sup>۱۲ مدت ۱۵ دقیقه) مدت ۴۸ ساعت با فیلتر تحت جریان گاز نیتروژن جهت خروج اکسیژن و ایجاد شرایط بیهوازی قرار گرفت و در شرایط مشابه ویال، کشت داده شد. مایه تلقیح و Al/rGO سوسپانسیون نانوساختارهای Al/rGO و Al/rGO

(g/175/0)، جداگانه به محیط کشت سترون افزوده شدند. بیوراکتور دمای C و PH و ۷ تنظیم گردید. بهمنظور بررسی رشد و فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکرو ارگانیسم، نمونهگیری هر ۴ ساعت تا ۵۲ ساعت انجام شد.

### روش آماری

آزمون آماریOne-way ANOVA جهت مقایسه اختلاف معنی دار مقادیر به دست آمده بین گروه های مطالعه در سطح آماری ۵٪ و آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۱٪ انجام شد. مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار SPSS<sub>22</sub> مورد تجزیه آماری قرار گرفت.

### نتايج

### مشخصه یابی نانوساختارهای rGO/Al وrGO/Ca

# طیفسنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca

آناليز FTIR جهت بررسي پيوند بين نانوذرات گرافن -اكسيد و آلومينيوم و كلسيم، همچنين تعيين برهم كنش بين rGO و آلومينيوم وrGO و كلسيم استفاده شد. با  ${
m Cm}^{-1}$  توجه به شکل ۱ پیک جذبی شارپ در محدوده ۱۱۳۴مربوط به نانوساختار rGO /Ca و پیک جذبی در $^{1}$ در $1 \cdot rGO/Al$  مربوطبهنانوساختار rGO/Al، به ارتعاشات کششی پیوند C-O که معرف حضور گروه اپوکسی (پیوندهای شیمیایی و گروههای عاملی اکسیدگرافن) است، اختصاص داده می شود (۲۳). پیک در ۱۶۲۱Cm<sup>-1</sup> (rGO/Al) و(rGO/Ca) مربوط به پیوندهای C=C است (۲۴و۲۵). پیک پهن در محدوده ۳۴۱۹Cm<sup>-1</sup> و ۳۴۲۷Cm<sup>-1</sup> (rGO/Al) بهدلیل ارتعاشات کششی گروه O-H در مولکولهای آب است. همچنین میتوان آن را به ارتعاشات کششی گروههای هیدروکسیل و کربوکسیل اختصاص داد. این گروههای عاملی حاوی اكسيژن، باعث آبدوستى صفحات اكسيدگرافن مىشوند؛ بنابراین، منجر به پراکندگی خوب اکسیدگرافن در آب خواهد شد (۲۵). در نانوساختار rGO/Al پیک-های موجود در نواحی ۶۰۱ Cm<sup>-1</sup> ، ۴۷۲Cm<sup>-1</sup> و ۶۰۱ Cm به گروه Al اشاره دارد. در نانوساختار rGO/Ca قلههای موجود در نواحی ۶۲۱Cm<sup>-1</sup> و ۴۶۶ Cm اختصاص داده می شود. شکل ۱ برهم کنش rGO و آلومينيوم وrGO و كلسيم را تأييد مينمايد.



شكل ۱. طيف FTIR نانوساختارهای Al/rGO و Ca/rGO

وجود قلههای شدید در <sup>۲</sup>-۱۹۳۶ Cm مربوط و جود قلههای شدید در C=C و ارتعاش کششی گروههای Bharath و ایوکسیBharath و ایوکسیC-O) rGO (C-O) در نتایج پژوهش ماران با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد (۲۶). در تحقیق Fan و همکاران ناحیه ارتعاشی <sup>۲</sup>-۲۰۰۳ را میتوان به حالتهای کششی یونهای<sup>۳+</sup> Al اختصاص داد (۲۷).

### الگوی پراش پر تو ایکس(XRD)

طیف پراش پرتوایکس نانوساختارهایAl/rGO و طیف پراش پرتوایکس نانوساختارهایAl/rGO و Ca/rGO در شکل ۲ آورده شده است.درنواحی $70^{\circ}$  و  $70^{\circ}$  و  $70^{\circ}$  و  $70^{\circ}$  قابل مشاهده است که با نتایج مطالعه Heydaryan و همکاران همراستا است که با نتایج مطالعه موجود در نواحی $70^{\circ}$  67 - 70° - 70° است (۲۸). قلههای موجود در نواحی $70^{\circ}$  60° ۲ - 70° - 70° (rGO/Al) مشاهده می شود به Al نسبت داده می شود (۲۸). پیک در نواحی $70^{\circ}$  60° ۲ - 70° - 70° و (۲۵) rGO/Ca مشخصه وجود Ca در نانوساختار Ca

میباشد، این پیکها با نتایج تحقیق Tanpure و همکاران مبنی بر تشخیص Ca مطابقت دارد (۲۹) .

### مورفولوژی نانوساختارهای Al/rGO و Ca/rGO

مورفولوژی نانوساختارها توسط تصویر SEM تعیین گردید (شکل۳ الف وب). مطابق شکل ۳ الف، قطر متوسط نانوساختار rGO/Ca در محدوده ۳۴/۲۹–۲۰/۸۶ نانومتر است. تصویر SEM بهطور مشخص نشان میدهد نانوذرات کلسیم روی صفحات گرافناکسیدپخش شدهاند، برهمکنش خوب بین گرافناکسید و کلسیم را نشان میدهد. با توجه-کلسیم روی صفحات گرافناکسید را نشان میدهد. با توجهrGO/Al به شکل ۳ ب، قطر متوسط نانوساختار rGO/Al به شکل ۳ ب، قطر متوسط نانوساختار rGO/Al روی گرافناکسید قابل مشاهده هستند، نانوذرات تصاویر، ذرات سفید موجود در سطح که به صورت پراکنده روی گرافناکسید قابل مشاهده هستند، نانوذرات بوده و سطح نانوساختار همگن بهنظر میرسد که -نشاندهنده سازگاری خوب بین گرافن اکسید و آلومینیوم است.



شکل ۲- طیف XRD نانوساختارهای Al/rGO و Ca/rGO

6





شكل ٣- تصاوير (SEM) الف) نانوساختار Ca/rGOو ب) Al/rGO

تعیین منحنی رشد میکروارگانیسم به روش اندازهگیری غلظت میکروارگانیسم و میزان حذف نیترات

میزان رشد در محیط BSM حاوی پتاسیم نیترات به عنوان تنها منبع نیترات از طریق میزان حذف نیترات و اندازه گیری میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر با استفاده از کیت نیترات مشخص شد. جهت رسم منحنی رشد، پس از تلقیح میکروار گانیسم در ویال های ۴۰mL و

قرار دادن آنها در انکوباتور دمای C<sup>o</sup> ۳۰، نمونه گیری در فاصله زمانی ۶ ساعت یک بار انجام شد و تا ۶۰ ساعت ادامه یافت و غلظت میکروار گانیسم محاسبه شد. منحنی استاندارد نیترات با استفاده از رقتهایی از نیترات با محدوده غلظت Mg/L ۰-۱۳۰ تهیه شد و بر حسب میزان جذب هر یک از غلظت ها منحنی استاندارد رسم شد. همچنین میزان حذف نیترات توسط میکروار گانیسم در طول موج ۴۱۰ نانومتر خوانده شد. نتایج در شکل ۴ آمده است.





شکل ۴. منحنی رشد میکروارگانیسم به روش اندازه گیری غلظت میکروار گانیسم و حذف نیترات توسط میکروار گانیسم

بررسی میزان حذف نیترات توسط میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس جهت بررسی اثر دما بر رشد و فعالیت حذف نیترات توسط

میکروارگانیسم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* در عدم حضور نانوساختار فلزی، میکروارگانیسم در غلظت ۲۰۰mg/L نیترات و ۲۹ ۷ دردماهای مختلف C ۳۵۰، ۲۵<sup>°</sup> ۲۵

انکوباتور قرار داده شد. نتایج حاصل از حذف نیترات در دماهای مختلف پس از ۴۸ ساعت، با روش کروموتروپیک اسید، با استفاده از کیت نیترات بررسی شد (جدول۳).

نتایج حاصل از جدول ۳ نشان میدهد با افزایش دما، رشد و فعالیت نیتراتزداییزیستی میکروارگانیسم افزایش می-یابد.

جدول ۳. بررسی فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروار گانیسه در دماهای مختلف

میگروار کانیسم در دماهای مختلف						
حذف نيترات	دما (C°)	آزمايش				
(/.)	(mg/L)					
۴۰/٪۴۵	۳۰۰	۳۵	١			
۳٧/٪.۱	۳۰۰	٣٠	٢			
18///88	۳	۲۵	٣			

بهینهسازی آماری شاخصهای عملیاتی مؤثر در افزایش نیتراتزدایی نانوذرات rGO/Ca و rGO/Al با استفاده از روش سطح یاسخ (RSM)

دو متغیر A معرف دما (°C) و B معرف غلظت نانوذرات rGO/Ca و rGO/Cl (g/L) برای بهینهسازی فعالیت نیتراتزدایی نانوذرات در محیط کشت BSM با غلظت mg/L نیترات و ۷ pH درنظر گرفته شد. بهینهسازی این دو عامل توسط روش سطح پاسخ انجام شد. پاسخ  $R_1$  برای بررسی درصد حذف نیترات است. آزمایشها برای نمونه شاهد (بدون حضور نانوساختار فلزی) برای همه نمونهها انجام شد. همه آزمایشها با سه تكرار و میانگین آنها ارائه شد. طبق طراحی آزمایش برای ۲ متغیر، ۱۳ آزمایش (۹ آزمایش و ۴ تکرار) برای نانوساختارها (جدول ۴) مشخص شد. پاسخ  $R_1$  مربوط به درصد حذف نیترات است. جداول ۵ و ۶ بهترتیب پاسخ R<sub>1</sub> نانوذرات rGO/Ca و rGO/Al را نشان میدهند. در این نرم افزار p<٠/٠۵ بهعنوان سطح اطمینان از مؤثر بودن ضریب در نظر گرفته می شود. با توجه به جداول ۵ و ۶، مقدار p-value برای ترمهای دما (A) و غلظت نانوذرات (B) کمتر از ۰/۰۵ است، لذا این ترمها برای نانوذرات rGO/Ca وrGO/Al ، همچنين برهمكنش پارامترهای A و B، بردرصد حذف نیترات (پاسخR)، اثر گذار هستند. معادلهٔ نهایی فعالیت نیتراتزدایی نانوذرات با عبارتهای کد شده، براینانوذرات rGO/Ca (رابطه ۱) وrGO/Al (رابطه ۲) است:

R1=+35/29+55/16A+32/19B+40/9A×B

رابطه ۱

رابطه ۲

R1= +28/64+17/15 A+33/10B+50/3A×B-87/4A2 - 37/15 B2

rGO/Ca همچنین شرایط بهینه پاسخ  $R_1$  برای نانوذرات rGO/Ca و  $R_1$  و R رو  $R_1$  در جدول ۷ ارائه شده است. شکلهای ۵ و ۶ rGO/Al تصویر دوبعدی تأثیر برهمکنش پارامترهای A (دما  $^{\circ}$ ) و B (غلظت نانوساختار) را نشان میدهند. مطابق شکل ۵ و ۶ با افزایش دما ( $^{\circ}$ ) (پارامتر A) به سمت ((+)  $^{\circ}$   $^{\circ}$  ( $^{\circ}$  و افزایش خلظت نانوذرات rGO/Ca و rGO/Ca (پارامتر B) به سمت ( $^{\circ}$ ) به سمت ( $^{\circ}$ ) به سمت ( $^{\circ}$ ) (پارامتر A) به سمت ( $^{\circ}$ ) (پارامتر A) به سمت ( $^{\circ}$ ) (پارامتر A) به سمت ( $^{\circ}$ ) (پارامتر B) می ایند. ( $^{\circ}$ ) می افزایش افزایش علاقت نانوذرات rGO/Ca و R) به سمت ( $^{\circ}$ ) می ایند. ( $^{\circ}$ ) می ایند.

در پژوهش حاضر، حذف غیرزیستی توسط نانوساختار rGO/Ca برایر /۲۸۵۸ نیترات در C° ۳۵ و /۲۸۱ در دمای ۲۵C° طی ۴۸ ساعت مشاهده شد، حذف غیرزیستی توسط نانوساختار rGO/A1 برابر /۲۷۶۹۰۵ نیترات در C° ۳۵ مشاهده شد (جدول۶). نتایج به خوبی نشان میدهد احیا غیرزیستی به شدت تحت تأثیر درجه حرارت بوده و دردماهای بالاتر با سرعت بالاتر انجام می-شود.

بهینهسازی آماری شاخصهای عملیاتی موثر در افزایش نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوذرات rGO/Ca و rGO/Al

دو عامل دما (A) (C°) و غلظت نانوساختار (B) (J) جهت بهینه سازی فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروار گانیسم در حضور نانوساختار در محیط کشت BSM با غلظت نیترات Mov mg/L و PH در نظر (R2) با غلظت نیترات L, with (R2) و R ۷ در نظر روانه شد. برای تحلیل بهتر مدل متغیر R2 (R2) Square ارائه می شود. پاسخ R2 بررسی درصد حذف Square ارائه می شود. پاسخ R2 بررسی درصد حذف نیترات به وسیله میکروار گانیسم در حضور نانوساختار است. جدول ۸ بهینه سازی عوامل موردنظر برای میکروار گانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس به ترتیب در حضور نانوساختارهای rGO/Ca و rGO/Ca را نشان می دهد.

درصد حذف نيترات(./)	درصد حذف نيترات(٪)	غلظت نانوذرات	دما (C°)	آزمايش
(rGO/Al)	(rGO/Ca)	( g/L)		
٢٢	۲/۴	۰/۰۵	۲۵	١
۴۱	١٢/٧	١	۲۵	۲
٣٧	۲۵/۴	۰/۰۵	۳۵	٣
٧٠	۲۴/۰۹	١	۳۵	۴
۴۳	١٣	۰/۰۵	٣٠	۵
٨٢	۵۴/۱	١	٣٠	۶
۴۳	٨/٧	•/۵	۲۵	۷
۶١	41	•/۵	۳۵	٨
۶۳	۳۰/۶	•/۵	٣٠	٩
8T/T	٣•/١	•/۵	٣٠	١٠
۶۳	۳۰/۲	•/۵	٣٠	11
83/1	٣.	•/۵	٣٠	١٢
۶۲/۹	٣.	• /۵	٣٠	۱۳

### جدول ۴. بهینهسازی عوامل برای نانوذرات فلزی rGO/Ca و rGO/Al در حذف نیترات

جدول ۵. شاخصهای نرمافزاری بهینهسازی فعالیت نیتراتزدایی نانوذرات rGO/Ca

عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی	مربع ميانگين	F value	p-value Probe> F
	346/40	۵	89V/TV	۴۱/۰۵	<٠,٠٠٠١
A-A	1884/62	١	1886/62	۹١/٩٨	<٠,٠٠٠١
B-B	۲۲۳۸/۸۰	١	2227/20	180/81	<٠,٠٠٠١
AB	۳۵۳/۴۴	١	202/66	١٩/٧٨	•,••18
باقيمانده	۱۶۰/۸۰	٩	۱۷/۷۸		

R-Squared =  $\cdot/98\%$ 

### جدول ۶. شاخصهای نرمافزاری بهینهسازی فعالیت نیتراتزدایی نانوذرات rGO/A1

عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی	مربع ميانگين	F value	p-value Probe> F
	18.92/12	۵	S1X/ST	۳۶/۹۸	<•/•••
A-A	۱۳۸۰/۱۷	١	١٣٨٠/١٧	۸۲/۵۱	<•/•••
B-B	84 · 181	١	84 · /84	۳۸/۳۰	• / • • • ۵
A-B	۴٩/۰۰	١	41/	۲/۹۳	•/١٣•٧
Ař	۶۵/۳۸	١	۶۵/۳۸	٣/٩١	۰/۰ ۸ <i>۸۶</i>
B <sup>r</sup>	۶۵۲/۰۸	١	۶۵۲/۰۸	۳۸/۹۹	•/•••۴

R-Squared =  $\cdot/98\%$ 

### جدول ۲. شرایط بهینه پاسخR برای نانوذرات rGO/Ca و rGO/Al (حجم ۱۰۰mL)

A(°C)	B (g/L)	R <sub>1</sub>	نانوذرات
٠/٩٨	۱/۰۰	۲۴/۰۹۸۵	rGO/Ca
١/٠	۰/۴۵	VV/۶۹·۵	rGO/Al



شکل ۵. تصویر دو بعدی تأثیر برهم کنش پارامترهای A (دما °C) و B (غلظتrGO/Ca) برمیزان درصد حذف نیترات برای نانوذرات rGO/Ca



حذف نيترات (٪)	حذف نيترات (٪)	دما (°C)	غلظت نانوذرات (g/L	آزمایش
(rGO/Al)	(rGO/Ca)		(	
۲۵	١٢	٢۵	•/•۵	١
۵۵	٣٩	٢۵	١	٢
٣٩	۳۵	۳۵	• / • ۵	٣
٨۵	۶۸/۳	۳۵	١	۴
۴۳	۴۰/۲	٣٠	• / • ۵	۵
٨٢	۸۰/۵	٣٠	١	۶
44	۳۷/۳	۲۵	•/۵	٧
۶۵	۶.	۳۵	•/۵	٨
<i><b>۶</b>9</i>	۶۵	٣٠	•/۵	٩
88/1	۶.	٣٠	•/۵	١٠
88/T	۶.	٣.	•/۵	))
<i>\$</i> 9	۶۰/۲	٣.	•/۵	17
<i>\$</i> 9	۶.	٣٠	•/۵	١٣

رهای rGO/Ca و rGO/Al	ر حضور نانوساختا	<i>ے دنیتریفیکانس</i> در	وار گانيسم <i>تيوباسيلوس</i>	ی عوامل برای میکر	جدول ۸. بهینهساز
----------------------	------------------	--------------------------	------------------------------	-------------------	------------------

جدول ۹. شاخصهای نرمافزاری بهینهسازی افزایش نیتراتزدایی زیستی تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور rGO/Ca

عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی	مربع میانگین	F value	p-value Probe> F
	1848/20	۵	89V/TV	۴۱/۰۵	<•/•••
A-A	1527/22	١	1577/78	٨٩/۶٧	<•/•••
B-B	L18/8V	١	۸ <i>۱۶</i> /۶۷	۴۸/۰۷	•/•••٢
AB	۳۱/۹۲	١	W1/97	١/٨٨	•/YIYA
$A^2$	۵۸/۸۸	١	۵۸/۸۸	٣/۴٧	٠/١٠۴٩
$B^2$	۷۳۵/۳۶	١	۷۳۵/۳۶	42/29	•/•••٣

R-Squared =  $\cdot/98V$ .

جدول ۱۰. شاخصهای نرمافزاری بهینهسازی افزایش نیتراتزدایی زیستی *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* درحضور rGO/AI

			, . <b>.</b>		
عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی	مربع میانگین	F value	p-value Probe> F
	18222/22	۵	۲۰۸/۴۸	٧٠٧٣/٢٢	<٠/٠٠٠١
A-A	220 <i>4/</i> 11	١	22.47 × 4/14	۲۲۰۰۵/۵۳	<٠/٠٠٠١
B-B	٧٠۴/١٧	١	۲ <b>۰۴</b> /۱۷	٧٠٣٠/١٢	<٠/٠٠٠١
AB	۶۴/۰۰	١	۶۴/۰۰	۶۳۸/۹۵	<٠/٠٠٠١
A <sup>2</sup>	86/66	١	<b>*</b> */**	۳۴۳/۸۰	<٠/٠٠٠١
$B^2$	۳۶۷/۲۴	١	۳۶۷/۲۴	8888/84	<٠/٠٠٠١

R-Squared =  $\cdot/999\lambda$ 

برهم کنش این دو پارامتر) کمتر از ۰/۰۵ است، لذا شرایط بهینه بر درصد حذف نیترات (پاسخ R<sub>۲</sub>)، تحت تأثیر پارامترهای A و B، همچنین برهم کنش ایندو پارامتر برای میکروارگانیسم *تیوباسیلوسدنیتریفیکانس* در حضور نانوساختار است. معادلهٔ نهایی جهت بهینهسازی فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختارهای rGO/Ca و rGO/Al با عبارتهای کد شده، بهترتیب مطابق رابطه ۳ و۴ است:

 $R_2 = \frac{13}{62} + \frac{93}{15} \times A + \frac{67}{11} \times B + \frac{83}{2} \times AB$ - $60/4 \times A_2 - 30/16 \times B2$ 

رابطه۳

 $R_2 = 05/66 \ 17/19 + \times A + 83/10 \times B + 00/4 \times AB$  - $53/3 \times A_2 - 53/11 \times B2$ , ابطه ۴ شرایط بهینه پاسخ R<sub>2</sub> برای میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس درحضور نانوساختارهای rGO/Ca و rGO/Al در جدول ۱۱ ارائه

یز دادهها به روش RSM برای میکروارگانیسم باسيلوسدنيتريفيكانس درحضور نانوساختارهاى rGO/Al erGO/

اول ۸ و ۹ شاخصهای نرمافزاری بهینهسازی افزایش راتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختار شان میدهد.

لور معمول R<sub>۲</sub> بالای ۰/۷، بیانگر ضریب همبستگی به-ت خوب بوده و هر مقدار این ضریب به یک نزدیکتر ـد، انطباق دادههای تجربی و مدل حاصل از سيون بيشتر و مدل از دقت بالاترى برخوردار ت. p-value <٠/٠۵ بهعنوان سطح اطمینان از مؤثر دن ضریب در نظر گرفته شده است. طبق جدول ۸، ار p-value برای ترمهای دما (A) و غلظت نانوساختار. ) کمتر از ۰/۰۵ است، لذا شرایط بهینه بر درصد حذف رات (پاسخ  $R_r$ )، تحت تاثیر پارامترهای A و B، برای ئروارگانیسم *تیوباسیلوسدنیتریفیکانس* در حضور ساختار است. براساس جدول ۱۰، مقدار p-value برای به ترمها (دما (A) و غلظت نانوساختارها (B) و

جدول ۱۱. شرایط بهینه پاسخ R<sub>2</sub> برای میکروارگانیسم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* درحضور نانوساختارهای rGO/Ca و rGO/Al (حجم ۴۰mL)

دما (°C)	غلظت نانوذرات (gr)	R <sub>2</sub>	نانوذرات
١/٠	•/44	V8/890V	rGO/Ca
٠/٩٢	•/87	λδ/τδγτ	rGO/Al

افزایش فعالیت نیتراتزداییزیستی میکروارگانیسم می گردد.

شکلهای ۷ و ۸ تصویر دو بعدی تأثیر برهم کنش پارامتر A (دما <sup>°</sup>C) و B (غلظت نانوساختار) بر درصد حذف نیترات میکروارگانیسم *تیوباسیلوسدنیتریفیکانس* در حضور نانو ساختارهای rGO/Ca وrGO/Al رانشان-میدهد. مطابق شکلها با افزایش پارامتر A (دما  $^{\circ}\mathrm{C}$ ) بهسمت۱+ (۳۵°C) وافزایش پارامترB (غلظتrGO/Ca و  $R_2$  به سمت کد مرکزی (rGO/Al (rGO/Al) به سمت کد مرکزی (rGO/Alافزایش می یابد که معادل افزایش درصد حذف نیترات ج، در شرایط بهینه، میکروارگانیسم در حضور ساختار طبق rGO/Ca به میزان ٪۷۶/۶۹۵۷ و در سور rGO/Al مقدار ٪۸۵/۲۵۷۲ نیتراتزدایی زیستی د. با توجه به نتایج، مشاهده می شود درصد راتزدایی زیستیدرحضور نانوساختار rGO/Al نسبت rGO/Ca بیشتر بوده و نقش مؤثر rGO/Al را در ف زیستی نیترات نشان میدهد. دراین تحقیق، احیا متى نيترات درحضور نانوساختارها تحت تأثير دما است. يش دما سبب افزايش فعاليت آنزيم نيترات ردوكتاز و

شد.

است.

است و این افزایش درصد حذف نیترات در نانوساختار rGO/Ca بهمراتب بیشتر از حذف در حضور rGO/Ca



شکل ۷. تصویر دو بعدی تأثیر برهمکنش پارامتر A (دما <sup>C</sup>) و B (غلظتrGO/Ca) بر درصدحذف نیترات میکروار گانیسم *تیوباسیلوس* دنیتریفیکانس در حضورنانوساختار rGO/Ca



شکل۸. تصویر دو بعدی تأثیر برهم کنش پارامتر A (دما °C) و B (غلظتrGO/Al) بر درصدحذف نیترات میکروار گانیسم *تیوباسیلوس* دنيتريفيكانس در حضورنانوساختار rGO/Al

پساز بررسیمیزاننیتراتزدایینانوساختارهای rGO/Ca وrGO/Al، همچنین نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم درحضورنانوساختارها، نتایج حذف ودرصداختلاف در میزان

مقایسه نیتراتزدایی نانوساختارها و نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور rGO/Ca rGO/Al و

نیترات حذف شده در جداول ۱۱ و ۱۲ ارائه شده است.

غلظت نانوذرات دما (C°) اختلاف حذف (./) نيترات زدايى آزمايش نیترات زدایی زیستی در حضور نانوساختار (./) نانوساختار (./) (g/L) 1418 ۱۷ ۲/۴ ۰/۰۵ ۲۵ ۱ 26/3 ٣٩ ۱۲/۷ ۱ ٢۵ ٢ ۹/۶ ۳۵ ۲۵/۴ ۰/۰۵ ۳۵ ٣ ۵ ۶۸/۳ 74/•98 ۱ ۳۵ ۴ ۲۷/۲ 4.17 ۱۳ ۰/۰۵ ۳۰ ۵ 78/4 ۶ 54/1 ۳. ٨./۵ ۱ ۲۸/۶ ۳۷/۳ λ/٧ ۰/۵ ٢۵ γ ۱٩ ۶. 41 ۱ ۳۰ ٨ ۳۴/۴ ۶۵ ۳۰/۶ ۰/۵ ۳۰ ٩ ۲٩/٩ ۶. ۳٠/١ ۳۰ ۱۰ ۰/۵ ۶. ۳٠/٢ ٣٠ ۲٩/٨ ۰/۵ ۱١ ۳٠/۲ ۶٠/۲ ۳۰ ۰/۵ ۳۰ ۱۲ ۳۰ ۶. ۳۰ ۰/۵ ۳۰ ۱۳

جدول ۱۲. مقایسه نیتراتزدایی نانوساختار و نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختار rGO/Ca

عضور نانوساختار rGO/Al	ميکروار گانيسم در -	و نیتراتزدایی زیستی	زدايى نانوساختار	مقايسه نيترات	جدول ۱۳.
------------------------	---------------------	---------------------	------------------	---------------	----------

اختلاف	نیتراتزدایی زیستی در	نيتراتزدايي نانوساختار	غلظت	دما (C°)	آزمايش
حذف (٪)	حضور نانوساختار(٪)	(/.)	نانوساختار(g/L)		
٣	۲۵	٢٢	• / • ۵	۲۵	١
14	۵۵	۴۱	• / • ۵	۳۵	٢
٢	۳۹	۳۷	١	۲۵	٣
۱۵	٨۵	٧.	1	۳۵	۴
•	۴۳	۴۳	•/۵	۲۵	۵
•	٨٢	٨٢	•/۵	۳۵	۶
١	44	۴۳	• / • ۵	٣٠	٧
۴	۶۵	۶۱	1	٣٠	٨
١	<i>\$\$</i>	۶۳	•/۵	٣٠	٩
۲/۹	<i>۶۶</i> /۱	۶۳/۲	•/۵	٣٠	١.
٣/٢	88/Y	۶۳	•/۵	٣٠	))
۲/۹	<del>99</del>	۶۳/۱	•/۵	٣٠	١٢
٣/١	<i><b>۶</b>9</i>	<i>۶۲</i> /۹	•/۵	٣٠	١٣

در جدول ۱۱ حذف ٪۸۰/۵٪ نیترات طی ۴۸ ساعت در نمونه حاوى rGO/Ca و ميكروارگانيسم مشاهده شد. طي ۴۸ ساعت ٪۷۴/۰۹۸ از مقدار اولیه نیترات در نمونه حاوی نانوساختار حذف شد. در جدول ۱۲ طی ۴۸ ساعت حذف .۸۵٪ نیتراتدر نمونه حاوی rGO/Al قابل مشاهده است. درنمونه های کنترل حاوی محیط کشت، حذف قابل ملاحظه از نیترات مشاهده نشد. نتایج آماری اختلاف معنیداری ارا نشان میدهد، طوری که بهترین شرایط ( $P < \cdot / 1$ ) مربوطبهنمونههای حاوی نانوساختارو میکروار گانیسم است.  $\mathrm{Al}^{\mathbb{T}_{+}}$  در این پژوهش نیتراتزدایی اتوتروفیک با یون توليدشده توسطنانوساختارها،قادربه كاهش نيترات است.

# بررسی فرآیند نیترات زدایی زیستی در بیوراکتور در حضور نانوساختارهای rGO/Al

جدول ۱۳ نتایج نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختار rGO/Al در بیوراکتور و نمودار ۱ میزان حذف نیترات توسط میکروارگانیسم در حضور

rGO/Al در بیوراکتوردر زمانهای مختلف را نشان-مىدهد. طبق نتايج نيتراتزدايى زيستى ميكروارگانيسم در حضور rGO/Al در بیوراکتور کارایی بالاتری در حذف نیترات دارد. در بیوراکتور جهت ایجاد شرایط بی هوازی به-منظور اکسایش نانوذرات و تولید الکترون، جریان گاز نيتروژن توسط كپسول نيتروژن ۴۸ ساعت ايجاد شد. طي انجام نیتراتزدایی در فرمانتور بهمنظور ایجاد ۷ pH، اسید و باز اتوکلاو شده وارد سامانه و pH سامانه کامل کنترل گردید. در شرایط ناپیوسته نیتراتزدایی زیستی-میکروارگانیسم در حضور نانوساختار در بهترین شرایط پساز ۴۸ ساعت برای rGO/Al برابر ٪۸۵ حاصل شد. در سامانه بیوراکتور نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختار، تسريع شد. طبق نتايج، يس از ۴۴ساعت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور ۹۷٪.rGO/Al است و پساز ۴۸ ساعت نیتراتزدایی-زیستیافزایشیافت و به ٪۹۸ رسید.

دروار کانیسم در حصور نانوساختار IGO/AT در ب	یی زیستی می	ن ۱۱. نیترات زدا
نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور ۱۰ مانیدار ۲۵۰/۹۲ دن	زمان ( ام ت	آزمايش
نانوساختار AI (0.)	(ساعت)	
	•	١
١٩	۴	٢
٣٧	٨	٣
۴۷	١٢	۴
۵۰	18	۵
۵۲	۲.	۶
۶۹	74	٧
۷۲	۲۸	٨
Υ٨	٣٢	٩
٨۵	۳۶	١٠
٩٠	4.	))
٩٧	44	١٢
٩٨	47	١٣
٩٨	۵۲	14

بيوراكتور	rGO/Al در	نانوساختار	در حضور	ميكروار گانيسم	دایی زیستی	۱۴. نیترات ز	ل



*تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* در حضور rGO/Al در بیوراکتور

بررسي نتايج مشخص ميكند نيترات زدايي زيستي ميكرو ارگانیسم درحضور نانوساختار rGO/Al در بیوراکتور کارایی بالاتری در حذف نیترات دارد. در بیوراکتور جهت ایجاد شرایط بی هوازی به منظور اکسایش نانوذرات و تولید الكترون، جريان گاز نيتروژن توسط كپسول نيتروژن مدت ۴۸ ساعت ایجاد شد. طی انجام فرآیند نیتراتزدایی در فرمانتور بهمنظور ایجاد ۷ pH، اسید و باز اتوکلاو شده وارد سامانه و pH سامانه بهطور کامل کنترل گردید. در شرایط ناپیوسته نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختار در بهترین شرایط پس از ۴۸ ساعت برای rGO/Al برابر ۸۵٪ حاصل شد. در سامانه بیوراکتور نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختار، تسريع شد. طبق نتايج، پس از ۴۴ ساعت ميزان نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختار rGO/Al برابر ./۹۷ است و پس از ۴۸ ساعت نیتراتزدایی زیستی افزایش یافته و به ٪۹۸ رسید.

### بحث

در این پژوهش نیتراتزدایی زیستی بهینه در حضور نانوساختارهای گرافنی پایه آلومینیوم وکلسیم در شرایط ناپیوسته و سامانه بیوراکتور مورد مطالعه قرار گرفت.

بهدلیل بازده پایین حذف نیترات در فرآیندهای زیستی و پایین بودن فعالیت نیتراتزدایی زیستی، استفاده از نانوذرات فلزی پیشنهاد شده که توانسته است بسیاری از محدودیتهای نیترات زدایی زیستی را برطرف نموده و سبب افزایش نیتراتزدایی زیستی شود (۴).

در پژوهش حاضر دو پارامتر دما (°C) و غلظت (g/L) نانوساختارهای rGO/Ca و rGO/Al از پارامترهای تأثیرگذار بر فعالیت نیتراتزدایی هستند. برای بهینه

كردن غلظت نانوساختارها سه سطح، مقدار كمينه (كد ١-) ۰/۰۵ g/L ( بیشینه (کد ۱ +) ۱ g/L و حدوسط این دو (کد ۰) g/L م/•در نظر گرفته شد. برای این دو پارامتر، ۱۳ آزمایش طراحی شد و یک پاسخ  $R_1$  (درصد حذف نيترات mg/L) مشخص شد. با روش سطح پاسخ مقدار بهینه پارامترها تعیین شد. طبق نتایج درحضور نانوساختارهای rGO/Ca و rGO/Al با افزایش پارامتر A (دما $^{\circ}$ ) به سمت بیشینه ( $^{\circ}$  $^{\circ}$ C) و افزایش پارامتر B به (دما $^{\circ}$ سمت بیشینه (۱ g/L) مقدار کاهش نیترات به ترتیب ۷۴/۰۹۸۵ و ٪۷۷/۶۹ حاصل شد. درنیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم *تیوباسیلوسدنیتریفیکانس* در حضور نانوساختارهای rGO/Ca و rGO/Al، با افزایش پارامتر A (دما $^{\circ}$ ) به سمت بیشینه ( $^{\circ}$   $^{\circ}$ ) و تغییر پارامتر B به ( $^{\circ}$ سمت کد مرکزی ( $R_2$  ( $\cdot/a$  g/L) پاسخ  $R_2$  (درصد حذف نيترات) افزايش يافت. طبق نتايج اين نانوساختارها در غلظت معین نه تنها اثر سمی بر رشد و فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم ندارد بلکه با تحریک رشد و تأمين منبع الكترون اضافه، سبب افزايش فعاليت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم بهمیزان.//۷۶/۶۹۵ درحضور نانوساختار rGO/Ca و بهمیزان ٪/۸۵/۲۵۷ درحضور rGO/Al شد. با بررسی غلظتهای مختلف نانوساختارها (g/L، ۰/۰۵ ۹/۰) و اندازه گیری میزان نيتراتزدايى زيستى ميكروار گانيسم مشخص شد غلظت مناسب نانوساختارهای rGO/Ca و rGO/Al برابر g/L ۵/۰است. در غلظتهای بالاتر از g/L نانوساختارها، اثرهای سمی حاصل از اکسیدهای فلزی نانوساختارها برسلول ایجاد میشود و رشد و فعالیت نیتراتزداییزیستی میکروار گانیسم را کاهش میدهد (۳۰).

در این پژوهش نیتراتزدایی اتوتروفیک با استفاده از یون<sup>۳۰</sup>Al تولید شده توسط نانوساختارها، قادر به کاهش نیترات است. در این راستا Zhang و همکاران اثرات یون<sup>۳۰</sup>Al را برکارایی حذف آلایندههای آب بررسی نمودند.

9٣

94

طبق نتایج غلظت کم<sup>\*\*</sup>Al (L) میتواند فعالیت لجن، لخته شدن و آبگریزی را بهبود بخشد و در نهایت راندمان حذف آلایندهها را افزایش دهد. با این حال، غلظت بالای <sup>\*\*</sup>Al (L) (۴۰ mg/L) مانع لخته شدن میکروب ها شده و کارایی حذف آلاینده ها کاهش مییابد (۳۱).

Tyagi و همکاران بیان کردند نانوآلومینا به شکل نانو پودر می تواند برای حذف نیترات از آب مورد استفاده قرار گیرد. طی مطالعه های آن ها نانوآلومینا با غلظت ۲۰–۲۰، جذب بهتر نیترات را نشان داد. حداکثر حذف نیترات در ۴/۴pH رخ داد. ظرفیت جذب نیترات توسط نانوآلومینا در دمای ۲۵°C برابر ۴mg بود (۱۳).

در این پژوهش شرایط بهینه فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم *تیوباسیلوسدنیتریفیکانس* در حضور نانوساختارهای rGO/Ca وrGO/Ca در بیوراکتور حاوی محیط BSM و ۳۰۰ mg/L نیترات و BSM مورد بررسی قرار گرفت. بررسی نتایج مشخص میکند نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختار rGO/Al در بیوراکتور کارایی بالاتری در حذف نیترات دارد. در بيوراكتور جهت ايجاد شرايط بىهوازى بهمنظور اكسايش نانوساختارها و توليد الكترون، جريان گاز نيتروژن توسط کپسول نیتروژن مدت ۴۸ ساعت ایجاد شد. طی انجام فرآیند نیتراتزدایی در فرمانتور به منظور ایجاد ۷ pH، اسید و باز اتوکلاو شده وارد سامانه و pH سامانه بهطور کامل کنترل گردید. در شرایط ناپیوسته نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختارها در بهترین شرایط پس از ۴۸ ساعت برای نانوساختار rGO/Al برابر ۸۵٪ حاصل شد. در سامانه بیوراکتور نیتراتزداییزیستی-میکروارگانیسم در حضور نانوساختارها، تسریع شد. طبق نتایج، پس از ۴۴ ساعت میزان نیتراتزدایی زیستی در حضور نانوساختار rGO/Al برابر ٪۹۷ و پس از ۴۸ ساعت نیتراتزدایی زیستی افزایش یافته و به ٪۹۸ رسید.

Rajab Beigy و همکاران نیز عملکرد نانوذرات Fe<sup>0</sup>/St را جهت فعالیت نیتراتزدایی زیستی *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* آزمودند، نتایج نشان داد نیتراتزدایی زیستی این میکروارگانیسم در حضور Fe<sup>0</sup>/St در بیوراکتور برابر با ۲٪/۲۴ است (۱۷).

در مطالعه Chen و همکاران یک بیوراکتور کارآمد برای نیتروژن زدایی فاضلاب با نسبت C/N کم طراحی شد. در این مطالعه با استفاده از سویه Pseudomonas یک بیوراکتور ایجاد شد. روش سطح پاسخ نشان داد در

نیتراتزدایی زیستی بیوراکتور، شرایط بهینه شامل ۷ pH، زمان احتباس هیدرولیکی (HRT) ساعت و غلظت اولیه نیترات ۲۵ mg/L است. در شرایط بهینه حذف نیترات به حداکثر ٪۹۹/۱۹ در بیوراکتور رسید (۳۲). در پژوهش اخیر اختلاف نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور rGO/Al در ارلن و بیوراکتور نشان داد، شرایط بهینه (غلظت اکسیژن حل شده (صفر)، دمای  $^{\circ}C$  و ۷ pH)، به خوبی در بیوراکتور ایجاد شده و رشد میکروارگانیسم تسهیل یافته و فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم تسریع گردید. برای ادامه تحقیقات مواردی مانند تشخیص واسطهها در نیتراتزدایی زیستی در حضور نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca و سایر عوامل مؤثر مانند pH و زمان ماند هیدرولیکی لازم است بررسی شود. همچنین اثرگذاری rGO/Al و rGO/Ca بر سایر میکروارگانیسمها و عملکرد سایر نانوساختارها در فرآيند نيتراتزدايى زيستى ميكروار گانيسم تيوباسيلوس *دنیتریفیکانس* در آینده پیشنهاد میشود.

### نتيجهگيرى

نیتراتزدایی زیستی با احیا نیترات (توسط میکروارگانیسم های نیترات زدا)، روشی مناسب برای حذف زیستی نیترات از منابع آبی است. طی مسیر احیا، نیترات از طریق واکنشهای احیا به گاز بی خطر نیتروژن تبدیل میشود. جهت کاربرد صنعتی نیتراتزدایی زیستی، نیاز به افزایش میزان فعالیت میکروارگانیسم و همچنین جداسازی آنها است. در این پژوهش برای نخستین بار از نانوساختارهای rGO/Ca وrGO/Al جهت بررسی نقش آنها در نیتراتزدایی زیستی استفاده شد. پارامترهای عملیاتی مؤثر دما (°C) و غلظت نانوساختارها درنیتراتزدایی و نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم درحضور نانوساختارها توسط روش RSM بهینه شد. طبق نتایج در حضور نانوساختار rGO/Al میزان ./۹۸ نیتراتزدایی زیستی حاصل شد و این نانوساختار در بیوراکتور کارایی بالاتری در حذف نیترات نشان داد. یافتهها نشان داد، با افزودن نانوذرات فلزی<sup>۳۰</sup>Al در ضدعفونی و حذف آلایندهها، نیتریتزدایی زیستی تقویت شده و برای توسعه فرآیندهای حذف آلاینده مقرون به صرفه مفيد خواهد بود.

1. Qu X, Brame J, Li Q, Alvarez P.J.J. Nanotechnology for safe and sustainable water supply: enabling integrated water treatment and reuse, Acc Chem Res. 2013; 46: 834–843.

2. Mehrabinia P, Kermannezhad J. Investigation of Nitrate Absorption Methods from Contaminated Waters Using Biochar. J Water Sustain Dev. 2020; 7: 79–90.

3. Eslami H, Tajik R, Esmaeili M, Esmaeili A, Mobini M. Assessment of the quality of Rafsanjan drinking water resources using Water Quality Index (WQI) model in 2018: A descriptive study, JRUMS. 2020; 18: 985–996.

4. Liu Y, Li S, Chen Z, Megharaj M, Naidu R. Influence of zero-valent iron nanoparticles on nitrate removal by Paracoccus sp. Chemosphere. 2014;108: 426-432. doi. /10.1016/j.chemosphere.2014.02.045.

5. Takai K. The nitrogen cycle: A large, fast, and mystifying cycle. Microbes Environ. 2019;34: 223–225.

6. Milmile S.N, Pande J.V, Karmakar S, Bansiwal A, Chakrabarti T, Biniwale R.B. Equilibrium isotherm and kinetic modeling of the adsorption of nitrates by anion exchange Indion NSSR resin. Desalination. 2011; 276: 38–44.

7. Kim J.Y, Park H.-J, Lee C, Nelson K.L, Sedlak D.L, Yoon J. Inactivation of Escherichia coli by nanoparticulate zerovalent iron and ferrous ion. Appl Environ Microbiol. 2010; 76: 7668-7670.

8. Mohammadi M, Sedighi M, Alimohammadi V. Modeling and optimization of Nitrate and total Iron removal from wastewater by TiO2/SiO2 nanocomposites. Int J Nano Dimens. 2019;10: 195–208.

9. Sedighi M, Mohammadi M. Application of green novel NiO/ZSM-5 for removal of lead and mercury ions from aqueous solution: investigation of adsorption parameters. J Water Environ Nanotechnol. 2018; 3: 301–310.

10. Alimohammadi V, Sedighi M, Jabbari E. Response surface modeling and optimization of nitrate removal from aqueous solutions using magnetic multi-walled carbon nanotubes. J. Environ Chem Eng. 2016; 4: 4525–4535.

11. Hemmes K., Luimes P, Giesen A, Hammenga A, Aravind P.V, Spanjers H. Ammonium and phosphate recovery from wastewater to produce energy in a fuel cell. Water Pract Technol. 2011. https://doi.org/10.2166/wpt.2011.071.

12. Sedighi M, Aljlil S.A, Alsubei M.D, Ghasemi M, Mohammadi M. Performance optimisation of microbial fuel cell for wastewater treatment and sustainable clean energy generation using response surface methodology. Alexandria Eng J. 2018; 57: 4243–4253.

13. Tyagi S, Rawtani D, Khatri N, Tharmavaram M. Strategies for nitrate removal from aqueous environment using nanotechnology: a review. J Water Process Eng. 2018; 21: 84–95.

14. Pu S, Deng D, Wang K, Wang M, Zhang Y, Shangguan L, Chu W. Optimizing the removal of nitrate from aqueous solutions via reduced graphite oxide–supported nZVI: synthesis, characterization, kinetics, and reduction mechanism. Environ Sci Pollut Res. 2019; 26: 3932–3945.

15. Chen M, Zhou X, Chen X, Cai Q, Zeng R.J, Zhou S. Mechanisms of nitrous oxide emission during photoelectrotrophic denitrification by self-photosensitized Thiobacillus denitrificans. Water Res. 2020; 172: 115501.

16. Mook W.T, Aroua M.K, Chakrabarti M.H, Low C.T.J, Aravind P.V, Brandon N.P. The application of nano-crystalline  $PbO_2$  as an anode for the simultaneous bio-electrochemical denitrification and organic matter removal in an up-flow undivided reactor. Electrochem Acta. 2013. doi/10.1016/j.electacta.2013.02.001.

17. Rajab Beigy M, Rasekh B, Yazdian F, Aminzadeh B, Shekarriz M. High nitrate removal by starchstabilized Fe0 nanoparticles in aqueous solution in a controlled system. Eng Life Sci. 2018.doi /10.1002/elsc.201700127.

18. Jiang M, Feng L, Zheng X, Chen Y. Bio-denitrification performance enhanced by graphene-facilitated iron acquisition. Water Res. 2020. doi /10.1016/j.watres.2020.115916.

19. Mohammadi M, Sedighi M, Ghasemi M. Systematic investigation of simultaneous removal of phosphate/nitrate from water using Ag/rGO nanocomposite:Development, characterization, performance and mechanism. Res Chem Intermed.2021; 47:1377–1395.

20. APHA AWWA W. Standard methods for the examination of water and wastewater 20th edition, Am. Public Heal. Assoc. Am. Water Work Assoc. Water Environ. Fed. Washington. DC. 1998.

21. Krishna N.D.V.N.S.M, Philip L., Thiobacillus denitrificans immobilized biotrickling filter for NO<sub>2</sub> removal, Clean Technol. Environ Policy.2005.doi/10.1007/s10098-005-0003x.

22. Hummers WS, Offeman RE. Preparation of Graphitic Oxide. J. Am. Chem Soc. 1958; 80(6): 1339.

23. Sun X, Liu Z, Welsher K, Robinson J.T, Goodwin A, Zaric S, Dai H. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. Nano Res. 2008; 1: 203–212.

24. Torre L.A, Bray F, Siegel R.L, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015; 65: 87–108.

25. Wang X, Wang C, Qu K, Song Y, Ren J, Miyoshi D, Sugimoto N, Qu X. Ultrasensitive and Selective Detection of a Prognostic Indicator in Early-Stage Cancer Using Graphene Oxide and Carbon Nanotubes. Adv Funct Mater. 20; 2010: 3967–3971.

26. Bharath G, Anwer S, Mangalaraja R.V, Alhseinat E, Banat F, Ponpandian N. Sunlight-Induced photochemical synthesis of Au nanodots on  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@ Reduced graphene oxide nanocomposite and their enhanced heterogeneous catalytic properties. Sci Rep. 2018; 8: 1–14.

27. Fan B, Guo H, Shi J, Shi C, Jia Y, Wang H, Chen D, Yang Y, Lu H, Xu H. Facile one-pot preparation of silver/reduced graphene oxide nanocomposite for cancer photo dynamic and photothermal therapy. J NanosciNanotech.2016;16:7049-7054.

28. Heydaryan K, Almasi Kashi M, Sharifi N. Reduced Graphene Oxide/Magnetite Nanocomposites: Synthesis and Characterization, Nanoscale. 2019; 6: 49–54.

29. Tanpure S, Ghanwat V, Shinde B, Tanpure K, Lawande S. The Eggshell Waste Transformed Green and Efficient Synthesis of K-Ca (OH)<sub>2</sub> Catalyst for Room Temperature Synthesis of Chalcones. Polycycl Aromat Compd. 2020: 1–19.

30. Kim J.Y, Park H.J, Lee C, Nelson K.L, Sedlak D.L, Yoon J. Inactivation of escherichia coli by nanoparticulate zerovalent iron and ferrous ion. Appl Environ Microbiol. 2010. doi. /10.1128/AEM.01009-10.

31. Zhang L, Zheng J, Tian S, Zhang H, Guan X, Zhu S, Zhang X, Bai Y, Xu P, Zhang J. Effects of Al<sup>3+</sup> on the microstructure and bioflocculation of anoxic sludge. J Environ Sci. 2020;91: 212–221.

32. Chen C, Ali A, Su J. An Efficient Bioaggregate Reactor for Enhanced Denitrification of Sewage with Low Carbon/Nitrogen Ratio. Chem Eng Technol. 2021; 44: 1631–1640.