



Optimization of Bionitrification Using Aluminum and Calcium Based Graphene Nanostructures in Bioreactor

Atieh Ekrami¹, Lobat Taghavi^{1*}, Behnam Rasekh², Fatemeh Yazdian³

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 bionitrification. 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 bionitrification 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 bionitrification 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% bionitrification, 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: Bionitrification, 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

برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

بهینه‌سازی نیتراژ زدایی زیستی با بهره‌گیری از نانوساختارهای گرافنی پایه آلومینیوم و کلسیم در بیوراکتور عطیه اکرامی^۱، لعبت تقوی^{۱*}، بهنام راسخ^۲، فاطمه یزدیان^۳

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

چکیده

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 نیتراژ زدایی 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 XRD، SEM و FTIR تعیین گردید. دو پارامتر عملیاتی مؤثر دما (°C) و غلظت (g/L) نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca در نیتراژ زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلیوس دنیتریفیکانس توسط روش سطح پاسخ (RSM) بهینه شد. از روش Chromotropic Acid جهت سنجش نیتراژ استفاده شد.

یافته‌ها: طیف FTIR، برهم‌کنش بین rGO و آلومینیوم و کلسیم را تأیید کرد. توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) قطر متوسط نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca به ترتیب در محدوده ۲۴/۲۱-۱۰/۳۹ نانومتر و ۸۶/۲۹-۲۰/۳۴ نانومتر مشاهده شد. در حضور rGO/Al و rGO/Ca با افزایش دما (۳۵°C) و افزایش غلظت نانوساختار (۱ g/L) حذف غیرزیستی به ترتیب برابر ۷۴/۰۹۸۵٪ و ۷۷/۶۹۰۵٪ حاصل شد. پس از تعیین شرایط بهینه، نیتراژ زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختارها و در بیوراکتور بررسی شد. طبق نتایج، میکروارگانیسم در حضور نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca به ترتیب میزان ۷۶/۶۹۵۷٪ و ۸۵/۲۵۷۲٪ نیتراژ زدایی زیستی داشت.

نتیجه‌گیری: درصد نیتراژ زدایی زیستی در حضور rGO/Al نسبت به rGO/Ca بیش‌تر بوده و در حضور rGO/Al میزان ۹۸٪ حاصل شد، بنابراین این نانوساختار در بیوراکتور کارایی بالاتری در حذف نیتراژ نشان داد.

واژگان کلیدی: نیتراژ زدایی زیستی، نانوساختار rGO/Al، rGO/Ca، بیوراکتور، بهینه‌سازی

مقدمه

در کشورهای توسعه‌یافته و صنعتی، فعالیت‌های انسانی بیش‌ترین نقش را در تشدید کمبود آب به‌وسیله آلوده کردن منابع آب طبیعی بازی می‌کند (۱). یون نیتراژ از مهم‌ترین آلودگی‌های منابع آبی است. این نوع آلودگی

نویسنده مسئول:

پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران
پست الکترونیکی: taghavi_lobat@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۴

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

شده با نانوذرات Fe^0 ماده مؤثری برای حذف نیترات از آب است. با توجه به سطح مقطع بالای گرافن می توان به عنوان حامل زیستی استفاده کرد (۱۴). میکروارگانیزم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* (*Thiobacillus denitrificans*)، به صورت میله ای و گرم منفی است که می تواند دنیتریفیکاسیون اتوتروف انجام دهد و طیف وسیعی از ترکیب های کاهش یافته گوگرد را برای به دست آوردن انرژی اکسید کند. به دلیل این که این میکروارگانیزم ترجیح به استفاده از اکسیژن به جای نیترات به عنوان گیرنده الکترون نهایی دارد، دنیتریفیکاسیون فقط تحت شرایط بی هوازی انتظار می رود (۱۵). با توجه به یک منبع کربن جهت نیترات زدایی، از نانوساختارها و اندازه های مختلف آن ها به منظور تأثیر بر رهایش منبع کربنی استفاده می گردد. در میان انواع نانوذرات و نانوساختارها، برخی منجر به افزایش و برخی منجر به کاهش نیتريت زدایی زیستی می شوند. با توجه به مرور مطالعه ها، 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، بهینه سازی نیتريت زدایی زیستی بر اساس برنامه آماری و بررسی نیترات زدایی در سامانه کنترل شده (بیوراکتور) می تواند از جنبه های نوآورانه پژوهش حاضر باشد. Mook و همکاران نشان دادند در بیوراکتور با قرارگیری میکروارگانیزم های اتوهیدروژنو-تروفیک روی سطح نانوکریستال PbO_2 ، ۹۹٪ نیترات زدایی زیستی مشاهده گردید (۱۶). Shengyan و همکاران بهینه سازی حذف نیترات از محلول های آبی از طریق کاهش نانوذرات Fe^0 با پشتیبانی از گرافن اکسید ($Fe^0@rGO$) را بررسی کردند. عملکرد حذف نیترات به طور قابل توجهی با ترکیب rGO بهبود یافت (۱۴). در مطالعه Rajab Beigy و همکاران، عملکرد نانوذره Fe^0 پایدار شده با نشاسته در فعالیت نیترات زدایی زیستی *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* ارزیابی شد، نتایج نشان دادند نیترات زدایی زیستی *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* در حضور $St-Fe^0$ در بیوراکتور ۹۴/۷٪ است (۱۷). Jiang و همکاران نشان دادند استفاده از نانوحامل گرافنی منجر به بهبود چشم گیر در کارایی حذف نیترات و کاهش تولید نیتريت و نیتروس اکسید می شود (۱۸). Mohammadi و همکاران، حذف هم زمان فسفات/نیترات از آب را با استفاده از نانوکامپوزیت Ag/rGO به صورت سیستماتیک بررسی کردند. در شرایط بهینه، حداکثر حذف هم زمان نیترات و فسفات به ترتیب ۸۸/۹۷٪ و ۹۱/۴۸٪ به دست آمد (۱۹).

نیتريت در بدن سبب اکسیداسیون هموگلوبین به متهموگلوبین 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). به دلیل این خطر، نیاز جدی به فناوری های مؤثر و کارایی بالا جهت تصفیه منابع آب آلوده به نیترات مورد نیاز است. روش های متداول کاهش و حذف نیترات از منابع آب، روش های فیزیکی، شیمیایی و زیستی هستند که متداول ترین آن ها عبارتند از: جذب سطحی، اسمز معکوس، دنیتریفیکاسیون، الکترودیالیز و تبادل یونی. از میان روش های مذکور جذب سطحی به دلیل سادگی، هزینه کم و راندمان بالا کاربرد گسترده ای دارد (۶). روش های شیمیایی حذف نیترات گران هستند و مشکلاتی مثل نیاز به بازسازی مداوم و تولید محصول های جانبی سمی را دارند. در نیترات زدایی زیستی، میکروارگانیزم ها به ویژه باکتری ها نقش اصلی را در حذف نیترات از پساب به عهده دارند (۷). مزیت این سیستم ها عملکرد خوب میکروارگانیزم های دنیتریفایر برای حذف نیترات، هزینه پائین و سرعت بالای دنیتریفیکاسیون است (۸-۱۰). روش زیستی حذف نیترات قادر به حذف هم زمان چند آلاینده است، ولی روش های فیزیکی و شیمیایی فقط قادر به حذف یک آلاینده خاص هستند (۱۱). دو نوع حذف بیولوژیکی نیترات به صورت هتروتروف و اتوتروف وجود دارد. نیترات زداهای هتروتروف که از ترکیب های آلی به عنوان منبع کربنی استفاده می کنند، رایج ترین نیترات زداهای در طبیعت اند (۱۲). به تازگی، فناوری نانو به عنوان جایگزین عالی برای روش های مرسوم حذف نیترات در نظر گرفته شده است. نانومواد با توجه به اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بالا، بسیار واکنش پذیر هستند و همین امر آن ها را قادر می سازد که به عنوان جاذب مورد استفاده قرار بگیرند (۱۳). استفاده از نانوساختارها توانسته بسیاری از محدودیت های نیترات زدایی زیستی را برطرف نموده و سبب بهبود این فرآیند شود. گرافن یکی از نانوساختارهای کربنی است و به عنوان جاذب ایده آل و جذب کننده ای عالی و مؤثر در نظر گرفته شده است. یکی از کاربردهای جالب گرافن و گرافن اکسید، عامل دار کردن آن ها جهت استفاده در فرآیندهای حذف آلاینده های مختلف در منابع آبی است. طی این فرآیندها مولکول های آلی روی صفحات گرافن قرار می گیرند. برای انجام این فرآیند وجود برهم کنش کووالانس یا غیر کووالانس گرافن با مولکول های آلی و خصلت آب دوستی آن ضروری است که باعث پخش آسان آن در آب یا مایعات زیستی می شود. اکسید گرافن کاهش یافته (rGO) پشتیبانی

در این تحقیق از نانوساختارهای گرافنی پایه آلومینیوم و کلسیم در حذف زیستی نیترات توسط میکروارگانسیم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* استفاده شد. بهینه سازی فرآیند نیترات زدایی توسط روش سطح پاسخ (RSM) نیترات زدایی (Response surface methodology) انجام شد. شرایط بهینه حذف در بیوراکتور بررسی گردید.

مواد و روش ها

میکروارگانسیم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* ATCC 23644 از مجموعه میکروبی DSMZ کشور آلمان تهیه شد. این میکروارگانسیم اتوتروف است و به یک منبع گوگردی (سولفید هیدروژن، گوگرد عنصری یا تیوسولفات) به عنوان منبع انرژی نیازمند است. برای کشت سویه باکتریایی *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* از محیط معدنی پایه^۱ استفاده شد. ترکیب های محیط معدنی پایه (شرکت مرک کشور آلمان) در جدول ۱ ارائه شده است. جهت تعیین خصوصیات ساختاری و مورفولوژی نانوکامپوزیت، اندازه گیری متوسط سایز ذرات از دستگاه های FT-IR ۱۰۰۳۰۰۶، Perkin Elmer Spectrum، میکروسکوپ الکترونی روبشی KYKY_EM ۳۲۰۰، اسپکتروفوتومتر PG Instrument استفاده شد.

آزمون سنجش نیترات

از روش Chromotropic Acid جهت سنجش نیترات استفاده شد (۲۱،۲۰). در این روش در اثر واکنش Nitrate Reagent A و Nitrate Reagent B (شرکت مرک آلمان) با نیترات، محلول زرد رنگ ایجاد و در طول موج ۴۱۰ نانومتر میزان جذب محلول حاصل اندازه گیری شد. به منظور سنجش نیترات نمونه ها، سلول ها از محیط کشت توسط سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ دور در دقیقه مدت ۲۰ دقیقه جداسازی شدند. پس از عبور از فیلتر و عملیات رقیق سازی، ۱ میلی لیتر محلول به لوله حاوی Nitrate Reagent A منتقل و ۱۰ بار تکان داده شد. سپس با قیف Nitrate Reagent B به لوله آزمایش اضافه شد و مجدد ۱۰ بار تکان داده شد تا رنگ زرد ظاهر شود. میزان غلظت نیترات به دست آمد (۴).

اندازه گیری 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 BSM اضافه شد. محیط کشت در آنکوباتور (۳۰°C) مدت ۲۴-۴۸

¹ Basal Salt Medium

ساعت گرماگذاری شد. میزان رشد میکروارگانسیم با اندازه گیری غلظت میکروارگانسیم بر حسب ppm و اندازه گیری نیترات حذف شده در طول موج ۴۱۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد (۲۱).

سنتز گرافن اکسید

جهت سنتز گرافن اکسید تک لایه به روش هامر، ۱ گرم گرافیت (شرکت مرک آلمان) به ۲۰ mL سولفوریک اسید (شرکت مرک آلمان) (۹۸٪) درون حمام یخ روی استیرر، افزوده شد تا گرافیت به صورت کامل درون سولفوریک اسید حل شود، بعد از ۳۰ دقیقه ۳ گرم پرمنگنات پتاسیم (شرکت مرک آلمان) کم کم اضافه شد، پس از ۳۰ دقیقه ۵۰ میلی لیتر آب مقطر قطره قطره اضافه گردید، بعد از ۱۰ دقیقه، ۱۰۰ mL آب مقطر یک جا به محلول در حال هم زدن افزوده شد، بعد از ۳۰ دقیقه ۳۵ mL هیدروژن پراکسید (شرکت مرک آلمان) قطره قطره اضافه گردید و پس از ۲۴ ساعت محلول گرافن اکسید از روی هیتر استیرر برداشته شد (۲۲).

سنتز نانوساختار گرافن اکسید/آلومینیوم

مقدار ۰/۶ گرم گرافن اکسید تهیه شده از مرحله قبل در ۱۰۰ mL آب مقطر حل شده و مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، پروب سونیکیت انجام شد تا ذرات گرافن اکسید به صورت کامل هموزن تبدیل شود. در مرحله بعد ۱ گرم سدیم بورهیدرات (شرکت مرک آلمان) کم کم اضافه شد و مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۰ °C به طور کامل خشک گردید، سپس به وسیله آب دیونیزه و اتانول شستشو و سانتریفیوژ شد و رسوب در آون خلاء دمای ۸۰ °C مدت یک شبانه روز قرار داده شد تا rGO به دست آید. میزان ۷۵ gr rGO از مرحله قبل در ۱۵ میلی لیتر آب مقطر حل و مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، پروب سونیکیت انجام شد، سپس ۳۰ mg AlCl₃·6H₂O (شرکت مرک آلمان) به محلول اضافه گردید تا به صورت کامل حل شود، در نهایت محلول با غلظت ۷ mg/mL Al-rGO به دست آمد. برای پودر کردن نمونه، ابتدا نمونه سانتریفیوژ و در یخچال ۲۰- قرار داده شد، سپس فریزدرایر انجام شد.

سنتز نانوساختار گرافن اکسید/کلسیم

مقدار ۰/۶ گرم گرافن اکسید تهیه شده از مرحله قبل در ۱۰۰ mL آب مقطر حل و مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق پروب سونیکیت انجام شد. در مرحله بعد ۱ گرم سدیم بورهیدرات کم کم اضافه شد و ۲۴ ساعت در ۱۰۰ °C به-

شد. میزان $CaCl_2 \cdot 4H_2O$ ۳۰ mg (شرکت مرک آلمان) به محلول اضافه شد و در نهایت محلول با غلظت mg/mL ۷ Ca/rGO به دست آمد. برای پودر کردن نمونه، ابتدا نمونه سانتریفیوژ و در یخچال $20^\circ C$ قرار گرفت، سپس فریز درایر انجام شد.

طور کامل خشک شد، به وسیله آب دیونیزه و اتانول شستشو و سانتریفیوژ شد و رسوب در آون خلاء دمای $^\circ C$ ۸۰ مدت یک شبانه روز قرار داده شد تا rGO به دست آید. میزان rGO ۷۵ میلی گرم از مرحله قبل در $15 mL$ آب مقطر حل و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، پروب سونیکیت

جدول ۱. ترکیب‌های محیط BSM

مقدار (g/L)	ترکیب	فرمول شیمیایی
۱/۸	دی هیدروژن فسفات پتاسیم	KH_2PO_4
۱/۲	هیدروژن فسفات دی سدیم	Na_2HPO_4
۰/۱	سولفات منیزیم ۷ آبه	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
۰/۱	آمونیم سولفات	$(NH_4)_2SO_4$
۰/۰۳	کلرید کلسیم ۲ آبه	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
۱۵	تیوسولفات سدیم ۵ آبه	$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$
۱ mL	محلول عناصر کم‌مقدار	Trace elements solution
۰/۰۲	کلرید آهن (III) ۶ آبه	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$
۰/۰۲	سولفات منگنز	$MnSO_4$
۰/۵	سدیم هیدروژن کربنات	$NaHCO_3$
۵	پتاسیم نیترات	KNO_3

شد، نانوساختارها جداگانه با غلظت‌های g/L ۰/۵، ۰/۱۵، ۱ به محیط اضافه شدند.

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

در بهینه‌سازی آماری فعالیت نیترات زدایی نانوساختارهای Al/rGO و Ca/rGO ، هم‌چنین فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختارها، دما (A) و غلظت نانوساختارها (B) به‌عنوان دو متغیر تاثیرگذار در فعالیت نیترات زدایی انتخاب شدند. به منظور بهینه سازی این دو عامل، نرم‌افزار روش سطح پاسخ، و به منظور غربالگری و ارزیابی شاخص‌های مهم در فعالیت نیترات زدایی، نرم‌افزار Design-expert برای طراحی آزمایش (DOE) مورد استفاده قرار گرفت. محدوده سطوح متغیرها در جدول ۲ نشان داده شده است.

مشخصه یابی 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 تحت تابش $Cu-K\alpha$ (A° 54056/1= λ)، در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ mA انجام شد. جهت تأیید پیوند و برهم‌کنش بین آلومینیوم و نانوساختار و کلسیم و نانوساختار از طیف‌سنجی مادون قرمز استفاده شد.

پوشش سطح میکروارگانیسم با نانوساختارها

جهت پوشش سطح میکروارگانیسم با نانوساختارهای $Al-rGO$ و $Ca-rGO$ ، ۴ mL سوسپانسیون باکتری در ویال‌های ۴۰ mL به ۳۶ mL محیط کشت BSM اضافه

جدول ۲. سطوح متغیرها در بهینه‌سازی آماری فرآیند نیترات زدایی نانوساختارهای $Al-rGO$ و $Ca-rGO$ و فعالیت نیترات زدایی زیستی

میکروارگانیسم پوشش یافته با نانوساختارها

علامت	متغیر	سطح پایین (-)	سطح مرکزی (۰)	سطح بالا (+)
A	دما (C)	۲۵	۳۰	۳۵
B	غلظت نانوساختار (g/L)	۰/۰۵	۰/۱۵	۱

افزوده شدند و میزان حذف نیترات بررسی شد. پس از تلقیح میکرو ارگانیسم‌ها و نانوساختارها تحت شرایط سترون، فلاسک‌ها در دمای $30^\circ C$ مدت ۲۵ و ۳۵ و ۴۸ -

آزمایش در ویال‌های ۴۰ میلی‌لیتر حاوی ۳۶ میلی‌لیتر محیط کشت انجام شد. محیط‌های کشت حاوی غلظت mg/L ۳۰۰ نیترات مدت ۲۰ دقیقه در دمای $121^\circ C$ سترون شدند. ابتدا نانوساختارها جداگانه به محیط کشت

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

بررسی فرآیند نیترات زدایی زیستی میکرو ارگانسیم
میکروارگانسیم در محیط BSM با غلظت ۳۰۰ mg/L نیترات مدت ۴۸ ساعت در دماهای ۲۵°C و ۳۰ و ۳۵ گرماگذاری شد. به منظور ارزیابی اثر دما در نیترات زدایی زیستی میکروارگانسیم، نمونه گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج بررسی شد.

بررسی فرآیند نیترات زدایی نانوساختارهای Al-RGO و Ca-RGO

نانوساختارها در محیط BSM با غلظت نیترات ۳۰۰ ppm، در سه غلظت ۰/۵، ۰/۰۵، ۱ g/L نانوذرات در دماهای ۲۵°C، ۳۰ و ۳۵ مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور گرماگذاری شدند. به منظور بررسی اثر غلظت نانوذرات و دما بر میزان نیترات زدایی نانوساختارها، نمونه گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج بررسی شد.

بررسی فرآیند نیترات زدایی زیستی میکرو ارگانسیم پوشش یافته با نانوساختارهای Al-rGO و Ca-rGO

میکروارگانسیم های پوشش یافته با نانوساختارهای Al-rGO و Ca-rGO در محیط BSM با غلظت ۳۰۰ نیترات mg/L به مدت ۴۸ ساعت در غلظت های ۰/۵، ۰/۰۵ g/L از نانوساختارها در دماهای ۲۵°C و ۳۰ و ۳۵ گرماگذاری شدند. به منظور بررسی اثر دما و غلظت نانوساختارها بر میزان نیترات زدایی زیستی میکروارگانسیم پوشش یافته با نانو ساختارهای Al/rGO و Ca/rGO، نمونه گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج از طریق کیت نیترات بررسی شد.

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

پس از بررسی رشد و فعالیت نیترات زدایی میکروارگانسیم تیوباسیلوس دینتریفیکانس در ویال ۴۰ میلی لیتر با ۳۶ میلی لیتر محیط کشت BSM در حضور و عدم حضور نانوساختارهای Al/rGO و Ca/rGO، میکروارگانسیم در بیوراکتور با حجم ۱۵ mL حاوی ۱۲ mL محیط کشت BSM (سترون شده در اتوکلاو ۱۲۱°C مدت ۱۵ دقیقه) مدت ۴۸ ساعت با فیلتر تحت جریان گاز نیتروژن جهت خروج اکسیژن و ایجاد شرایط بی هوازی قرار گرفت و در شرایط مشابه ویال، کشت داده شد. مایه تلقیح و ۱۰ mL سوسپانسیون نانوساختارهای Al/rGO و Ca-rGO

(g/175/0)، جداگانه به محیط کشت سترون افزوده شدند. بیوراکتور دمای ۳۵°C و pH ۷ تنظیم گردید. به منظور بررسی رشد و فعالیت نیترات زدایی زیستی میکرو ارگانسیم، نمونه گیری هر ۴ ساعت تا ۵۲ ساعت انجام شد.

روش آماری

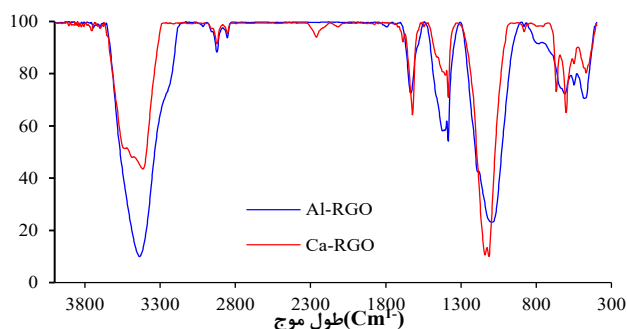
آزمون آماری One-way ANOVA جهت مقایسه اختلاف معنی دار مقادیر به دست آمده بین گروه های مطالعه در سطح آماری ۰/۰۵ و آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام شد. مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار SPSS22 مورد تجزیه آماری قرار گرفت.

نتایج

مشخصه یابی نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca

طیف سنجی تبدیل فوری مادون قرمز (FTIR) نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca

آنالیز FTIR جهت بررسی پیوند بین نانوذرات گرافن - اکسید و آلومینیوم و کلسیم، هم چنین تعیین برهم کنش بین rGO و آلومینیوم و rGO و کلسیم استفاده شد. با توجه به شکل ۱ پیک جذبی شارپ در محدوده Cm^{-1} ۱۱۳۴ مربوط به نانوساختار rGO /Ca و پیک جذبی در Cm^{-1} ۱۰۸۰ مربوط به نانوساختار rGO/Al، به ارتعاشات کششی پیوند C-O که معرف حضور گروه اپوکسی (پیوندهای شیمیایی و گروه های عاملی اکسیدگرافن) است، اختصاص داده می شود (۲۳). پیک در Cm^{-1} ۱۶۲۱ (rGO/Al) و Cm^{-1} ۱۶۳۹ (rGO/Ca) مربوط به پیوندهای C=C است (۲۴ و ۲۵). پیک پهن در محدوده Cm^{-1} ۳۴۱۹ و Cm^{-1} ۳۴۲۷ (rGO/Al) به دلیل ارتعاشات کششی گروه O-H در مولکول های آب است. همچنین می توان آن را به ارتعاشات کششی گروه های هیدروکسیل و کربوکسیل اختصاص داد. این گروه های عاملی حاوی اکسیژن، باعث آب دوستی صفحات اکسیدگرافن می شوند؛ بنابراین، منجر به پراکندگی خوب اکسیدگرافن در آب خواهد شد (۲۵). در نانوساختار rGO/Al پیک های موجود در نواحی Cm^{-1} ۴۷۲، Cm^{-1} ۶۰۱ و Cm^{-1} ۶۱۱ به گروه Al اشاره دارد. در نانوساختار rGO/Ca قله های موجود در نواحی Cm^{-1} ۶۲۱ و Cm^{-1} ۴۶۶ به گروه Ca اختصاص داده می شود. شکل ۱ برهم کنش rGO و آلومینیوم و rGO و کلسیم را تأیید می نماید.



شکل ۱. طیف FTIR نانوساختارهای Al/rGO و Ca/rGO

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

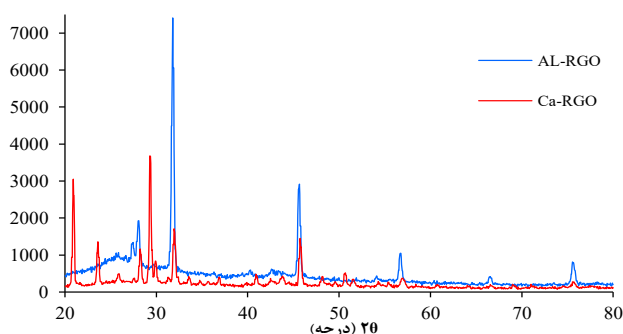
مورفولوژی نانوساختارهای Al/rGO و Ca/rGO

مورفولوژی نانوساختارها توسط تصویر SEM تعیین گردید (شکل ۳ الف وب). مطابق شکل ۳ الف، قطر متوسط نانوساختار rGO/Ca در محدوده ۲۹/۳۴-۸۶/۲۰ نانومتر است. تصویر SEM به‌طور مشخص نشان می‌دهد نانوذرات کلسیم روی صفحات گرافن اکسید پخش شده‌اند، برهمکنش خوب بین گرافن اکسید و کلسیم را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۳ ب، قطر متوسط نانوساختار rGO/Al در محدوده ۲۱/۳۹-۲۴/۱۰ نانومتر مشاهده شد. طبق تصاویر، ذرات سفید موجود در سطح که به صورت پراکنده روی گرافن اکسید قابل مشاهده هستند، نانوذرات آلومینیوم هستند و دارای ساختار یکنواخت و اشکال کروی بوده و سطح نانوساختار همگن به‌نظر می‌رسد که نشان‌دهنده سازگاری خوب بین گرافن اکسید و آلومینیوم است.

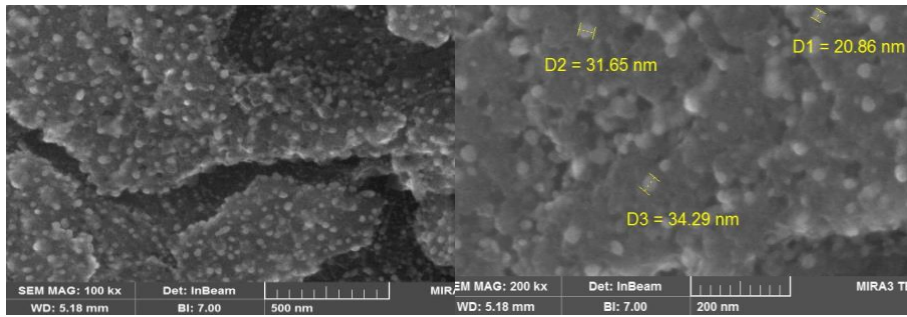
وجود قله‌های شدید در 1636 cm^{-1} و 1044 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی C=C و ارتعاش کششی گروه‌های اپوکسی rGO (C-O) در نتایج پژوهش Bharath و همکاران با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد (۲۶). در تحقیق Fan و همکاران ناحیه ارتعاشی 600 cm^{-1} - 700 cm^{-1} را می‌توان به حالت‌های کششی یون‌های Al^{3+} اختصاص داد (۲۷).

الگوی پراش پرتو ایکس (XRD)

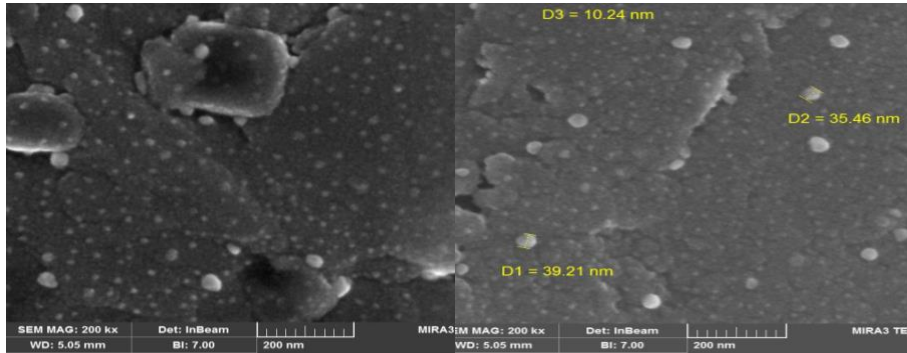
طیف پراش پرتو ایکس نانوساختارهای Al/rGO و Ca/rGO در شکل ۲ آورده شده است. در نواحی 30° - 20° در شکل ۲ پیک‌های شاخص rGO قابل مشاهده است که با نتایج مطالعه Heydaryan و همکاران همراستا است (۲۸). قله‌های موجود در نواحی $24^\circ=2\theta$ ، $32^\circ=2\theta$ ، $37^\circ=2\theta$ ، $45^\circ=2\theta$ ، $51^\circ=2\theta$ و $57^\circ=2\theta$ که در شکل ۲ (rGO/Al) مشاهده می‌شود به Al نسبت داده می‌شود (۲۸). پیک در نواحی $33^\circ=2\theta$ ، $47^\circ=2\theta$ ، $50^\circ=2\theta$ و $59^\circ=2\theta$ مشخصه وجود Ca در نانوساختار rGO/Ca



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



الف



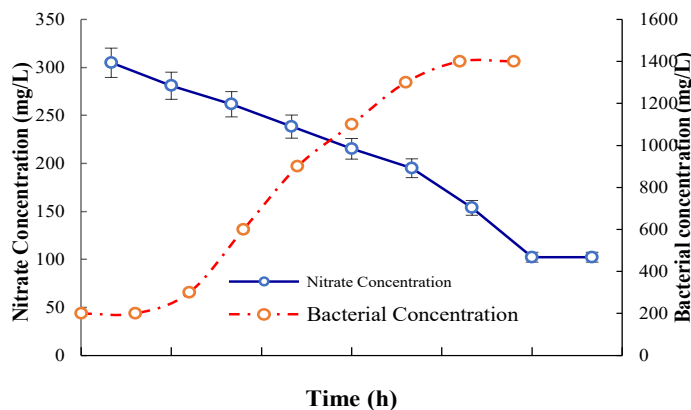
ب

شکل ۳- تصاویر (SEM) الف) نانوساختار Ca/rGO و ب) Al/rGO

قرار دادن آن‌ها در انکوباتور دمای 30°C ، نمونه‌گیری در فاصله زمانی ۶ ساعت یک بار انجام شد و تا ۶۰ ساعت ادامه یافت و غلظت میکروارگانیزم محاسبه شد. منحنی استاندارد نیترات با استفاده از رقت‌هایی از نیترات با محدوده غلظت $0-130\text{ mg/L}$ تهیه شد و بر حسب میزان جذب هر یک از غلظت‌ها منحنی استاندارد رسم شد. همچنین میزان حذف نیترات توسط میکروارگانیزم در طول موج 410 nm خوانده شد. نتایج در شکل ۴ آمده است.

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

میزان رشد در محیط BSM حاوی پتاسیم نیترات به عنوان تنها منبع نیترات از طریق میزان حذف نیترات و اندازه‌گیری میزان جذب نوری در طول موج 410 nm نانومتر با استفاده از کیت نیترات مشخص شد. جهت رسم منحنی رشد، پس از تلقیح میکروارگانیزم در ویال‌های 40 mL و



شکل ۴. منحنی رشد میکروارگانیزم به روش اندازه‌گیری غلظت میکروارگانیزم و حذف نیترات توسط میکروارگانیزم

میکروارگانیزم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در عدم حضور نانوساختار فلزی، میکروارگانیزم در غلظت 300 mg/L نیترات و pH ۷ در دماهای مختلف 25°C ، 30°C و 35°C

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

نتایج حاصل از جدول ۳ نشان می‌دهد با افزایش دما، رشد و فعالیت نیتراژزدایی زیستی میکروارگانیسم افزایش می‌یابد.

انکوباتور قرار داده شد. نتایج حاصل از حذف نیتراژ در دماهای مختلف پس از ۴۸ ساعت، با روش کروموتروپیک اسید، با استفاده از کیت نیتراژ بررسی شد (جدول ۳).

جدول ۳. بررسی فعالیت نیتراژزدایی زیستی میکروارگانیسم در دماهای مختلف

حذف نیتراژ (%)	مقدار اولیه نیتراژ (mg/L)	دما (°C)	آزمایش
۴۰/۴۵	۳۰۰	۳۵	۱
۳۷/۱	۳۰۰	۳۰	۲
۱۶/۳۶	۳۰۰	۲۵	۳

هم‌چنین شرایط بهینه پاسخ R_1 برای نانوذرات rGO/Ca و rGO/Al در جدول ۷ ارائه شده است. شکل‌های ۵ و ۶ تصویر دوبعدی تأثیر برهم‌کنش پارامترهای A (دما °C) و B (غلظت نانوساختار) را نشان می‌دهند. مطابق شکل ۵ و ۶ با افزایش دما (°C) (پارامتر A) به سمت (+) ۳۵ °C و افزایش غلظت نانوذرات rGO/Ca و rGO/Al (پارامتر B) به سمت (+) ۱g، درصد حذف نیتراژ افزایش می‌یابد.

در پژوهش حاضر، حذف غیرزیستی توسط نانوساختار rGO/Ca برابر ۷۴/۰۹۸۵٪ نیتراژ در ۳۵ °C و ۲/۵٪ در دمای ۲۵°C طی ۴۸ ساعت مشاهده شد، حذف غیرزیستی توسط نانوساختار rGO/Al برابر ۷۷/۶۰۵٪ نیتراژ در ۳۵ °C مشاهده شد (جدول ۶). نتایج به خوبی نشان می‌دهد احیا غیرزیستی به شدت تحت تأثیر درجه حرارت بوده و در دماهای بالاتر با سرعت بالاتر انجام می‌شود.

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

دو عامل دما (A) (°C) و غلظت نانوساختار (B) (g/L) جهت بهینه‌سازی فعالیت نیتراژزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختار در محیط کشت BSM با غلظت نیتراژ ۳۰۰ mg/L و pH ۷ در نظر گرفته شد. برای تحلیل بهتر مدل متغیر R_2 (Square) ارائه می‌شود. پاسخ R_2 بررسی درصد حذف نیتراژ به وسیله میکروارگانیسم در حضور نانوساختار است. جدول ۸ بهینه‌سازی عوامل موردنظر برای میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس به ترتیب در حضور نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca را نشان می‌دهد.

بهینه‌سازی آماری شاخص‌های عملیاتی موثر در افزایش نیتراژزدایی نانوذرات rGO/Al و rGO/Ca با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

دو متغیر A معرف دما (°C) و B معرف غلظت نانوذرات rGO/Al (g/L) و rGO/Ca برای بهینه‌سازی فعالیت نیتراژزدایی نانوذرات در محیط کشت BSM با غلظت ۳۰۰ mg/L نیتراژ و pH ۷ در نظر گرفته شد. بهینه‌سازی این دو عامل توسط روش سطح پاسخ انجام شد. پاسخ R_1 برای بررسی درصد حذف نیتراژ است. آزمایش‌ها برای نمونه شاهد (بدون حضور نانوساختار فلزی) برای همه نمونه‌ها انجام شد. همه آزمایش‌ها با سه تکرار 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 نیتراژ است. جداول ۵ و ۶ به ترتیب پاسخ R_1 نانوذرات rGO/Al و rGO/Ca را نشان می‌دهند. در این نرم افزار $p < 0.05$ به عنوان سطح اطمینان از مؤثر بودن ضریب در نظر گرفته می‌شود. 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/Al و rGO/Ca، هم‌چنین برهم‌کنش پارامترهای A و B، بردرصد حذف نیتراژ (پاسخ R_1)، اثرگذار هستند. معادله نهایی فعالیت نیتراژزدایی نانوذرات با عبارت‌های کد شده، برای نانوذرات rGO/Ca (رابطه ۱) و rGO/Al (رابطه ۲) است:

$$R1 = +35/29 + 55/16A + 32/19B + 40/9A \times B$$

رابطه ۱

$$R1 = +28/64 + 17/15 A + 33/10B + 50/3A \times B - 87/4A^2 - 37/15 B^2$$

رابطه ۲

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

آزمایش	دما (°C)	غلظت نانوذرات (g/L)	درصد حذف نیترات (rGO/Ca) (%)	درصد حذف نیترات (rGO/Al) (%)
۱	۲۵	۰/۰۵	۲/۴	۲۲
۲	۲۵	۱	۱۲/۷	۴۱
۳	۳۵	۰/۰۵	۲۵/۴	۳۷
۴	۳۵	۱	۷۴/۰۹	۷۰
۵	۳۰	۰/۰۵	۱۳	۴۳
۶	۳۰	۱	۵۴/۱	۸۲
۷	۲۵	۰/۵	۸/۷	۴۳
۸	۳۵	۰/۵	۴۱	۶۱
۹	۳۰	۰/۵	۳۰/۶	۶۳
۱۰	۳۰	۰/۵	۳۰/۱	۶۳/۲
۱۱	۳۰	۰/۵	۳۰/۲	۶۳
۱۲	۳۰	۰/۵	۳۰	۶۳/۱
۱۳	۳۰	۰/۵	۳۰	۶۲/۹

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

عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی	مربع میانگین	F value	p-value Probe> F
	۳۴۸۶/۳۵	۵	۶۹۷/۲۷	۴۱/۰۵	<۰,۰۰۰۱
A-A	۱۶۳۴/۴۲	۱	۱۶۳۴/۴۲	۹۱/۹۸	<۰,۰۰۰۱
B-B	۲۲۳۸/۸۰	۱	۲۲۳۸/۸۰	۱۲۵/۳۱	<۰,۰۰۰۱
AB	۳۵۲/۴۴	۱	۳۵۲/۴۴	۱۹/۷۸	۰,۰۰۱۶
باقیمانده	۱۶۰/۸۰	۹	۱۷/۷۸		

R-Squared = ۰/۹۶۳۴

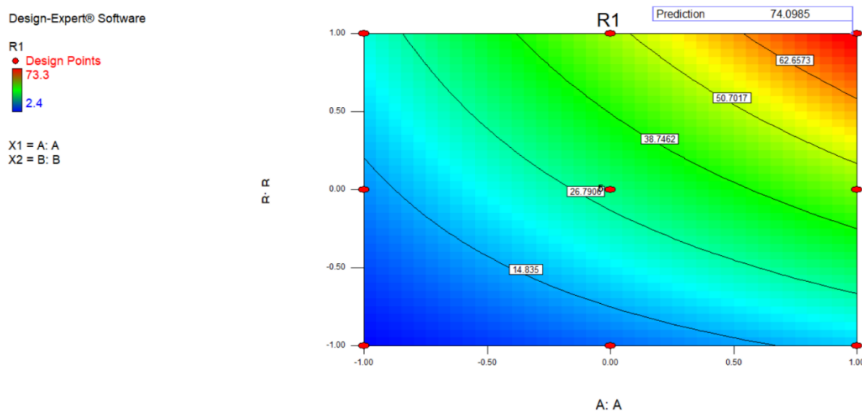
جدول ۶. شاخص‌های نرم‌افزاری بهینه‌سازی فعالیت نیترات‌زدایی نانوذرات rGO/Al

عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی	مربع میانگین	F value	p-value Probe> F
	۱۳۰۹۳/۱۳	۵	۶۱۸/۶۳	۳۶/۹۸	<۰/۰۰۰۱
A-A	۱۳۸۰/۱۷	۱	۱۳۸۰/۱۷	۸۲/۵۱	<۰/۰۰۰۱
B-B	۶۴۰/۶۷	۱	۶۴۰/۶۷	۳۸/۳۰	۰/۰۰۰۵
A-B	۴۹/۰۰	۱	۴۹/۰۰	۲/۹۳	۰/۱۳۰۷
A ^۲	۶۵/۳۸	۱	۶۵/۳۸	۳/۹۱	۰/۰۸۸۶
B ^۲	۶۵۲/۰۸	۱	۶۵۲/۰۸	۳۸/۹۹	۰/۰۰۰۴

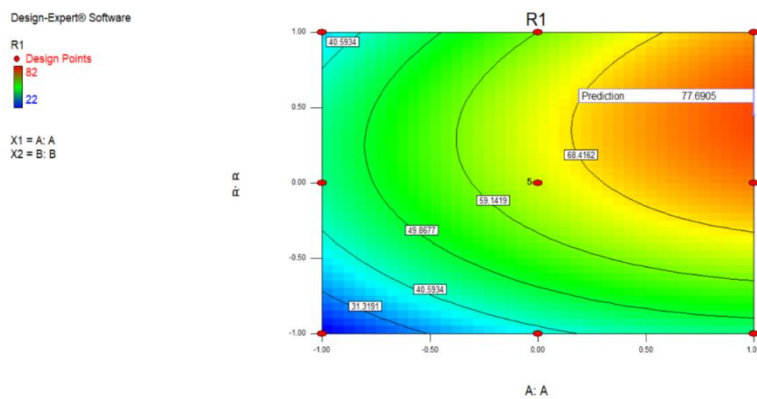
R-Squared = ۰/۹۶۳۵

جدول ۷. شرایط بهینه پاسخ R_۱ برای نانوذرات rGO/Ca و rGO/Al (حجم ۱۰۰ mL)

نانوذرات	R _۱	B (g/L)	A (°C)
rGO/Ca	۷۴/۰۹۸۵	۱/۰۰	۰/۹۸
rGO/Al	۷۷/۶۹۰۵	۰/۴۵	۱/۰



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



شکل ۶. تصویر دو بعدی تأثیر برهم کنش پارامترهای A (دما °C) و B (غلظت rGO/Al) بر میزان درصد حذف نیترات نانوذرات rGO/Al

جدول ۸. بهینه سازی عوامل برای میکروآرگانیزم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca

آزمایش	غلظت نانوذرات (g/L)	دما (°C)	حذف نیترات (rGO/Ca) (%)	حذف نیترات (rGO/Al) (%)
۱	۰/۰۵	۲۵	۱۷	۲۵
۲	۱	۲۵	۳۹	۵۵
۳	۰/۰۵	۳۵	۳۵	۳۹
۴	۱	۳۵	۶۸/۳	۸۵
۵	۰/۰۵	۳۰	۴۰/۲	۴۳
۶	۱	۳۰	۸۰/۵	۸۲
۷	-۰/۵	۲۵	۳۷/۳	۴۴
۸	-۰/۵	۳۵	۶۰	۶۵
۹	-۰/۵	۳۰	۶۵	۶۶
۱۰	-۰/۵	۳۰	۶۰	۶۶/۱
۱۱	-۰/۵	۳۰	۶۰	۶۶/۲
۱۲	-۰/۵	۳۰	۶۰/۲	۶۶
۱۳	-۰/۵	۳۰	۶۰	۶۶

جدول ۹. شاخص های نرم افزاری بهینه سازی افزایش نیترات زدایی زیستی تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور rGO/Ca

عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی	مربع میانگین	F value	p-value Probe > F
	۱۳۴۸۶/۳۵	۵	۶۹۷/۲۷	۴۱/۰۵	<۰/۰۰۰۱
A-A	۱۵۲۳/۲۳	۱	۱۵۲۳/۲۳	۸۹/۶۷	<۰/۰۰۰۱
B-B	۸۱۶/۶۷	۱	۸۱۶/۶۷	۴۸/۰۷	۰/۰۰۰۲
AB	۳۱/۹۲	۱	۳۱/۹۲	۱/۸۸	۰/۳۱۲۸
A ²	۵۸/۸۸	۱	۵۸/۸۸	۳/۴۷	۰/۱۰۴۹
B ²	۷۳۵/۳۶	۱	۷۳۵/۳۶	۴۳/۲۹	۰/۰۰۰۳

R-Squared = ۰/۹۶۷۰

جدول ۱۰. شاخص های نرم افزاری بهینه سازی افزایش نیتراژزادایی زیستی تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور rGO/Al

عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی	مربع میانگین	F value	p-value Probe > F
	۱۳۵۴۲/۴۲	۵	۷۰۸/۴۸	۷۰۷۳/۲۲	<۰/۰۰۰۱
A-A	۲۲۰۴/۱۷	۱	۲۲۰۴/۱۷	۲۲۰۰۵/۵۳	<۰/۰۰۰۱
B-B	۷۰۴/۱۷	۱	۷۰۴/۱۷	۷۰۳۰/۱۲	<۰/۰۰۰۱
AB	۶۴/۰۰	۱	۶۴/۰۰	۶۳۸/۹۵	<۰/۰۰۰۱
A ^۲	۳۴/۴۴	۱	۳۴/۴۴	۳۴۳/۸۰	<۰/۰۰۰۱
B ^۲	۳۶۷/۲۴	۱	۳۶۷/۲۴	۳۶۶۶/۳۴	<۰/۰۰۰۱

$$R\text{-Squared} = ۰/۹۹۹۸$$

برهم کنش این دو پارامتر) کم تر از ۰/۰۵ است، لذا شرایط بهینه بر درصد حذف نیتراژ (پاسخ R_۲)، تحت تأثیر پارامترهای A و B، هم چنین برهم کنش این دو پارامتر برای میکروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوساختار است. معادله نهایی جهت بهینه سازی فعالیت نیتراژزادایی زیستی میکروارگانسیم در حضور نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca با عبارت های کد شده، به ترتیب مطابق رابطه ۳ و ۴ است:

$$R_2 = 13/62 + 93/15 \times A + 67/11 \times B + 83/2 \times AB - 60/4 \times A_2 - 30/16 \times B_2$$

رابطه ۳

$$R_2 = 05/66 + 17/19 \times A + 83/10 \times B + 00/4 \times AB - 53/3 \times A_2 - 53/11 \times B_2$$

رابطه ۴

شرایط بهینه پاسخ R_۲ برای میکروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوساختارهای rGO/Ca و rGO/Al در جدول ۱۱ ارائه شد.

یز داده ها به روش RSM برای میکروارگانسیم باسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca

اول ۸ و ۹ شاخص های نرم افزاری بهینه سازی افزایش رات زادایی زیستی میکروارگانسیم در حضور نانوساختار شان می دهد.

لور معمول R_۲ بالای ۰/۷، بیانگر ضریب هم بستگی به-بت خوب بوده و هر مقدار این ضریب به یک نزدیک تر د، انطباق داده های تجربی و مدل حاصل از سیون بیشتر و مدل از دقت بالاتری برخوردار ت. $p\text{-value}$ <math>< ۰/۰۵</math> به عنوان سطح اطمینان از مؤثر دن ضریب در نظر گرفته شده است. طبق جدول ۸، رار $p\text{-value}$ برای ترم های دما (A) و غلظت نانوساختار (کم تر از ۰/۰۵ است، لذا شرایط بهینه بر درصد حذف رات (پاسخ R_۲)، تحت تأثیر پارامترهای A و B، برای ئروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور ساختار است. بر اساس جدول ۱۰، مقدار $p\text{-value}$ برای ه ترم ها (دما (A) و غلظت نانوساختارها (B) و

جدول ۱۱. شرایط بهینه پاسخ R_۲ برای میکروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca (حجم ۴۰ mL)

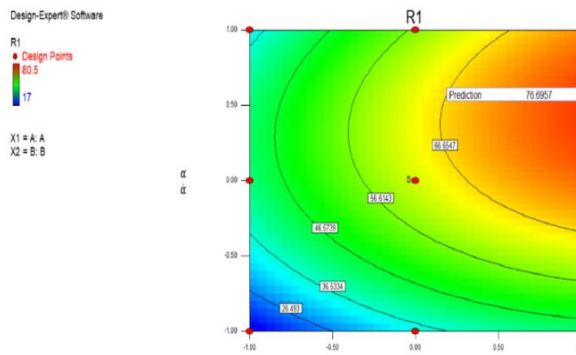
دما (°C)	غلظت نانوذرات (gr)	R _۲	نانوذرات
۱/۰	۰/۴۴	۷۶/۶۹۵۷	rGO/Ca
۰/۹۲	۰/۶۲	۸۵/۲۵۷۲	rGO/Al

افزایش فعالیت نیتراژزادایی زیستی میکروارگانسیم می گردد.

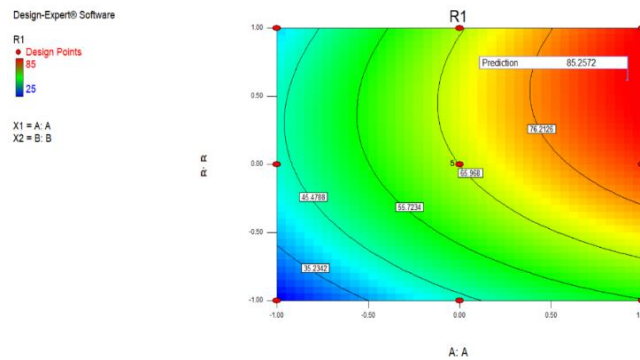
شکل های ۷ و ۸ تصویر دو بعدی تأثیر برهم کنش پارامتر A (دما °C) و B (غلظت نانوساختار) بر درصد حذف نیتراژ میکروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانو ساختارهای rGO/Al و rGO/Ca رانشان- می دهد. مطابق شکل ها با افزایش پارامتر A (دما °C) به سمت +۱ (۳۵°C) و افزایش پارامتر B (غلظت rGO/Ca) و rGO/Al) به سمت کد مرکزی (۰/۵ g/L) مقدار R_۲ افزایش می یابد که معادل افزایش درصد حذف نیتراژ

ج، در شرایط بهینه، میکروارگانسیم در حضور ساختار طبق rGO/Ca به میزان ۷۶/۶۹۵۷٪ و در سور rGO/Al مقدار ۸۵/۲۵۷۲٪ نیتراژزادایی زیستی د. با توجه به نتایج، مشاهده می شود درصد رات زادایی زیستی در حضور نانوساختار rGO/Al نسبت rGO/Ca بیش تر بوده و نقش مؤثر rGO/Al را در ف زیستی نیتراژ نشان می دهد. در این تحقیق، احیا متی نیتراژ در حضور نانوساختارها تحت تأثیر دما است. یش دما سبب افزایش فعالیت آنزیم نیتراژ ردوکتاز و

است و این افزایش درصد حذف نیترات در نانوساختار rGO/Al به مراتب بیشتر از حذف در حضور rGO/Ca است.



شکل ۷. تصویر دو بعدی تأثیر برهم کنش پارامتر A (دما °C) و B (غلظت rGO/Ca) بر درصد حذف نیترات میکروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوساختار rGO/Ca



شکل ۸. تصویر دو بعدی تأثیر برهم کنش پارامتر A (دما °C) و B (غلظت rGO/Al) بر درصد حذف نیترات میکروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوساختار rGO/Al

پس از بررسی میزان نیترات زدایی نانوساختارهای rGO/Ca و rGO/Al، هم چنین نیترات زدایی زیستی میکروارگانسیم در حضور نانوساختارها، نتایج حذف و درصد اختلاف در میزان نیترات حذف شده در جداول ۱۱ و ۱۲ ارائه شده است.

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

جدول ۱۲. مقایسه نیترات زدایی نانوساختار و نیترات زدایی زیستی میکروارگانسیم در حضور نانوساختار rGO/Ca

اختلاف حذف (%)	نیترات زدایی زیستی در حضور نانوساختار (%)	نیترات زدایی نانوساختار (%)	غلظت نانوذرات (g/L)	دما (°C)	آزمایش
۱۴/۶	۱۷	۲/۴	۰/۰۵	۲۵	۱
۲۶/۳	۳۹	۱۲/۷	۱	۲۵	۲
۹/۶	۳۵	۲۵/۴	۰/۰۵	۳۵	۳
۵	۶۸/۳	۷۴/۰۹۸	۱	۳۵	۴
۲۷/۲	۴۰/۲	۱۳	۰/۰۵	۳۰	۵
۲۶/۴	۸۰/۵	۵۴/۱	۱	۳۰	۶
۲۸/۶	۳۷/۳	۸/۷	۰/۵	۲۵	۷
۱۹	۶۰	۴۱	۱	۳۰	۸
۳۴/۴	۶۵	۳۰/۶	۰/۵	۳۰	۹
۲۹/۹	۶۰	۳۰/۱	۰/۵	۳۰	۱۰
۲۹/۸	۶۰	۳۰/۲	۰/۵	۳۰	۱۱
۳۰/۲	۶۰/۲	۳۰	۰/۵	۳۰	۱۲
۳۰	۶۰	۳۰	۰/۵	۳۰	۱۳

جدول ۱۳. مقایسه نیترازدایی نانوساختار و نیترازدایی زیستی میکروارگانسیم در حضور نانوساختار rGO/Al

آزمایش	دما (°C)	غلظت نانوساختار (g/L)	نیترازدایی نانوساختار (%)	نیترازدایی زیستی در حضور نانوساختار (%)	اختلاف حذف (%)
۱	۲۵	۰/۰۵	۲۲	۲۵	۳
۲	۳۵	۰/۰۵	۴۱	۵۵	۱۴
۳	۲۵	۱	۳۷	۳۹	۲
۴	۳۵	۱	۷۰	۸۵	۱۵
۵	۲۵	۰/۵	۴۳	۴۳	۰
۶	۳۵	۰/۵	۸۲	۸۲	۰
۷	۳۰	۰/۰۵	۴۳	۴۴	۱
۸	۳۰	۱	۶۱	۶۵	۴
۹	۳۰	۰/۵	۶۳	۶۶	۱
۱۰	۳۰	۰/۵	۶۳/۲	۶۶/۱	۲/۹
۱۱	۳۰	۰/۵	۶۳	۶۶/۲	۳/۲
۱۲	۳۰	۰/۵	۶۳/۱	۶۶	۲/۹
۱۳	۳۰	۰/۵	۶۲/۹	۶۶	۳/۱

rGO/Al در بیوراکتور در زمان‌های مختلف را نشان می‌دهد. طبق نتایج نیترازدایی زیستی میکروارگانسیم در حضور rGO/Al در بیوراکتور کارایی بالاتری در حذف نیترا دارد. در بیوراکتور جهت ایجاد شرایط بی‌هوازی به منظور اکسایش نانوذرات و تولید الکترون، جریان گاز نیتروژن توسط کیسول نیتروژن ۴۸ ساعت ایجاد شد. طی انجام نیترازدایی در فرمانتور به منظور ایجاد pH ۷، اسید و باز اتوکلاو شده وارد سامانه و pH سامانه کامل کنترل گردید. در شرایط ناپیوسته نیترازدایی زیستی- میکروارگانسیم در حضور نانوساختار در بهترین شرایط پس از ۴۸ ساعت برای rGO/Al برابر ۸۵٪ حاصل شد. در سامانه بیوراکتور نیترازدایی زیستی میکروارگانسیم در حضور نانوساختار، تسریع شد. طبق نتایج، پس از ۴۴ ساعت نیترازدایی زیستی میکروارگانسیم در حضور rGO/Al ۹۷٪ است و پس از ۴۸ ساعت نیترازدایی- زیستی افزایش یافت و به ۹۸٪ رسید.

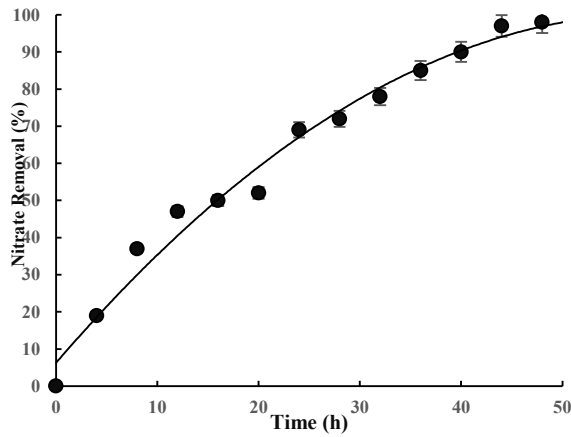
در جدول ۱۱ حذف ۸۰/۵٪ نیترا طی ۴۸ ساعت در نمونه حاوی rGO/Ca و میکروارگانسیم مشاهده شد. طی ۴۸ ساعت ۷۴/۰۹۸٪ از مقدار اولیه نیترا در نمونه حاوی نانوساختار حذف شد. در جدول ۱۲ طی ۴۸ ساعت حذف ۸۵٪ نیترا در نمونه حاوی rGO/Al قابل مشاهده است. در نمونه‌های کنترل حاوی محیط کشت، حذف قابل ملاحظه از نیترا مشاهده نشد. نتایج آماری اختلاف معنی‌داری ($P < 0/1$) را نشان می‌دهد، طوری که بهترین شرایط مربوط به نمونه‌های حاوی نانوساختار و میکروارگانسیم است. در این پژوهش نیترازدایی اتوتروفیک با یون Al^{3+} تولید شده توسط نانوساختارها، قادر به کاهش نیترا است.

بررسی فرآیند نیترازدایی زیستی در بیوراکتور در حضور نانوساختارهای rGO/Al

جدول ۱۳ نتایج نیترازدایی زیستی میکروارگانسیم در حضور نانوساختار rGO/Al در بیوراکتور و نمودار ۱ میزان حذف نیترا توسط میکروارگانسیم در حضور

جدول ۱۴. نیترازدایی زیستی میکروارگانسیم در حضور نانوساختار rGO/Al در بیوراکتور

آزمایش	زمان (ساعت)	نیترازدایی زیستی میکروارگانسیم در حضور نانوساختار rGO/Al (%)
۱	۰	۰
۲	۴	۱۹
۳	۸	۳۷
۴	۱۲	۴۷
۵	۱۶	۵۰
۶	۲۰	۵۲
۷	۲۴	۶۹
۸	۲۸	۷۲
۹	۳۲	۷۸
۱۰	۳۶	۸۵
۱۱	۴۰	۹۰
۱۲	۴۴	۹۷
۱۳	۴۸	۹۸
۱۴	۵۲	۹۸



نمودار ۱. نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم

کردن غلظت نانوساختارها سه سطح، مقدار کمینه (کد ۱- 0.5 g/L)، مقدار بیشینه (کد ۱+) 1 g/L و حدوسط این دو (کد ۰) 0.5 g/L در نظر گرفته شد. برای این دو پارامتر، ۱۳ آزمایش طراحی شد و یک پاسخ R_1 (درصد حذف نیترات mg/L) مشخص شد. با روش سطح پاسخ مقدار بهینه پارامترها تعیین شد. طبق نتایج در حضور نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca با افزایش پارامتر A (دمای $^{\circ}\text{C}$) به سمت بیشینه (35°C) و افزایش پارامتر B به سمت بیشینه (1 g/L) مقدار کاهش نیترات به ترتیب $74/0.985$ و $77/69\%$ حاصل شد. در نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca ، با افزایش پارامتر A (دمای $^{\circ}\text{C}$) به سمت بیشینه (35°C) و تغییر پارامتر B به سمت کد مرکزی (0.5 g/L) پاسخ R_2 (درصد حذف نیترات) افزایش یافت. طبق نتایج این نانوساختارها در غلظت معین نه تنها اثر سمی بر رشد و فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم ندارد بلکه با تحریک رشد و تأمین منبع الکترون اضافه، سبب افزایش فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم به میزان $76/69.57\%$ در حضور نانوساختار rGO/Ca و به میزان $85/257\%$ در حضور rGO/Al شد. با بررسی غلظت‌های مختلف نانوساختارها (0.5 ، 1 و 1.5 g/L) و اندازه‌گیری میزان نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم مشخص شد غلظت مناسب نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca برابر 1 g/L است. در غلظت‌های بالاتر از 0.5 g/L نانوساختارها، اثرهای سمی حاصل از اکسیدهای فلزی نانوساختارها بر سلول ایجاد می‌شود و رشد و فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم را کاهش می‌دهد (۳۰).

در این پژوهش نیترات زدایی اتوتروفیک با استفاده از یون Al^{3+} تولید شده توسط نانوساختارها، قادر به کاهش نیترات است. در این راستا Zhang و همکاران اثرات یون Al^{3+} را بر کارایی حذف آلاینده‌های آب بررسی نمودند.

تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور rGO/Al در بیوراکتور

بررسی نتایج مشخص می‌کند نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختار rGO/Al در بیوراکتور کارایی بالاتری در حذف نیترات دارد. در بیوراکتور جهت ایجاد شرایط بی‌هوازی به منظور اکسایش نانوذرات و تولید الکترون، جریان گاز نیتروژن توسط کپسول نیتروژن مدت ۴۸ ساعت ایجاد شد. طی انجام فرآیند نیترات زدایی در فرمانتور به منظور ایجاد pH ۷، اسید و باز اتوکلاو شده وارد سامانه و pH سامانه به طور کامل کنترل گردید. در شرایط ناپیوسته نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختار در بهترین شرایط پس از ۴۸ ساعت برای rGO/Al برابر 85% حاصل شد. در سامانه بیوراکتور نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختار، تسریع شد. طبق نتایج، پس از ۴۴ ساعت میزان نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختار rGO/Al برابر 97% است و پس از ۴۸ ساعت نیترات زدایی زیستی افزایش یافته و به 98% رسید.

بحث

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

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

در پژوهش حاضر دو پارامتر دما ($^{\circ}\text{C}$) و غلظت (g/L) نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca از پارامترهای تأثیرگذار بر فعالیت نیترات زدایی هستند. برای بهینه

طبق نتایج غلظت کم Al^{3+} ($mg/L < 10$) می‌تواند فعالیت لجن، لخته شدن و آب‌گریزی را بهبود بخشد و در نهایت راندمان حذف آلاینده‌ها را افزایش دهد. با این حال، غلظت بالای Al^{3+} ($40 mg/L$) مانع لخته شدن میکروبی ها شده و کارایی حذف آلاینده‌ها کاهش می‌یابد (۳۱).

Tyagi و همکاران بیان کردند نانوالومینا به شکل نانو پودر می‌تواند برای حذف نیترات از آب مورد استفاده قرار گیرد. طی مطالعه‌های آن‌ها نانوالومینا با غلظت $10-20 mg/L$ جذب بهتر نیترات را نشان داد. حداکثر حذف نیترات در $4/pH$ رخ داد. ظرفیت جذب نیترات توسط نانوالومینا در دمای $25^{\circ}C$ برابر $4 mg$ بود (۱۳).

در این پژوهش شرایط بهینه فعالیت نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلیوس دنیتریفیکانس در حضور نانوساختارهای rGO/Al و rGO/Ca در بیوراکتور حاوی محیط BSM و $300 mg/L$ نیترات و $pH 7$ 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 بیوراکتور جهت ایجاد شرایط بی‌هوازی به‌منظور اکسایش نانوساختارها و تولید الکترون، جریان گاز نیتروژن توسط کپسول نیتروژن مدت 48 ساعت ایجاد شد. طی انجام فرآیند نیترات‌زدایی در فرمانتور به منظور ایجاد $pH 7$ ، 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 48 ساعت برای نانوساختار rGO/Al برابر 85% حاصل شد. در سامانه بیوراکتور نیترات‌زدایی زیستی- میکروارگانیسم در حضور نانوساختارها، تسریع شد. طبق نتایج، پس از 44 ساعت میزان نیترات‌زدایی زیستی در حضور نانوساختار rGO/Al برابر 97% و پس از 48 ساعت نیترات‌زدایی زیستی افزایش یافته و به 98% رسید.

Rajab Beigy و همکاران نیز عملکرد نانوذرات Fe^0/St را جهت فعالیت نیترات‌زدایی زیستی تیوباسیلیوس دنیتریفیکانس آزمودند، نتایج نشان داد نیترات‌زدایی زیستی این میکروارگانیسم در حضور Fe^0/St در بیوراکتور برابر با $94/7\%$ است (۱۷).

در مطالعه Chen و همکاران یک بیوراکتور کارآمد برای نیتروژن‌زدایی 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 $pH 7$ ، زمان احتباس هیدرولیکی (HRT) 6 ساعت و غلظت اولیه نیترات $25 mg/L$ است. در شرایط بهینه حذف نیترات به حداکثر $99/19\%$ 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 $35^{\circ}C$ و $pH 7$)، 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 فرآیند نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلیوس دنیتریفیکانس در آینده پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

نیترات‌زدایی زیستی با احیا نیترات (توسط میکروارگانیسم‌های نیترات‌زدا)، روشی مناسب برای حذف زیستی نیترات از منابع آبی است. طی مسیر احیا، نیترات از طریق واکنش‌های احیا به گاز بی‌خطر 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/Al و rGO/Ca جهت بررسی نقش آن‌ها در نیترات‌زدایی زیستی استفاده شد. پارامترهای عملیاتی مؤثر دما ($^{\circ}C$) و غلظت نانوساختارها در نیترات‌زدایی و نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوساختارها توسط روش RSM بهینه شد. طبق نتایج در حضور نانوساختار rGO/Al میزان 98% نیترات‌زدایی زیستی حاصل شد و این نانوساختار در بیوراکتور کارایی بالاتری در حذف نیترات نشان داد. یافته‌ها نشان داد، با افزودن نانوذرات فلزی Al^{3+} در ضدعفونی و حذف آلاینده‌ها، نیتريت‌زدایی زیستی تقویت شده و برای توسعه فرآیندهای حذف آلاینده مقرون به صرفه مفید 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, Bansiwala 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 PbO₂ 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 starch-stabilized 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 NO₂ 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 α -Fe₂O₃@ 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 Nanosci Nanotech.* 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)₂ 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 Al³⁺ on the microstructure and biofloculation 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.