

**Research** article





## Investigating the molecular mechanism of Bio denitrification by *thiobacillus denitrificans* in the presence of metal nanostructure in bioreactor

Ean online to view this article
Elahe Hamdi<sup>1</sup>, Behnam Rasekh<sup>2\*</sup>, Elahe Tajbakhsh<sup>1</sup>, Fatemeh Yazdian<sup>3</sup>, Maryam Ghobeh<sup>4</sup>
1.Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Department of Microbiology, Shanekold Branch, Islande Azad Oniversity, Shanekold, Han
 Department of Microbiology, Research Institute of Petroleum Industry, Environment & Biotechnology Research Division,

2. Department of Microbiology, Research Institute of Petroleum Industry, Environment & Biotechnology Research Division, Tehran, Iran

3.Department of Life ScienceEngineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

4.Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

## Abstract

Aim and Background: Nitrate is one of the inorganic anions derived from the oxidation of elemental nitrogen. Nitrate contamination of groundwater and surface water has become a critical problem. Therefore, achieving the new technologies for nitrate removal is necessary. The aim of this study was to investigate the molecular mechanism of bio denitrification by *thiobacillus denitrificans* in the presence of quantum dot metal-carbon nanoparticles (CQD-Fe<sup>0</sup>) in a bioreactor.

**Materials and Methods:**  $Fe^0$  nanoparticles were synthesized by the liquid-phase reduction method, also called the borohydride reduction method and for biocompatibility, uniform distribution, and non agglomeration,  $Fe^0$  was coated with carbon quantum-dot. Characterization of nanoparticles was determined by XRD, TEM, FESEM, and FTIR. The biological process of nitrate removal was investigated in the presence and absence of nanoparticles. The expression of *nirS*, *narH* and *recA* genes was also assessed using real-time PCR.

**Results**: The FTIR spectrum confirmed the formation of CQD-Fe<sup>0</sup> bonds. The average diameter of CQD-Fe<sup>0</sup> nanoparticles was in the range of 29.31 to 38.32 nm. Denitrification in the presence of CQD-Fe<sup>0</sup>, with increasing temperature ( $35C^{\circ}$ ) was 73.43%. In discontinuous conditions, bio denitrification was obtained for CQD-Fe0 nanoparticles 79.8312%. In the bioreactor, biodenitrification, in the presence of CQD-Fe<sup>0</sup> nanoparticles, 95% was obtained. Examination of gene expression showed that the expression of all three genes *nirS*, *narH* and *recA* in cells treated with nanoparticles significantly increased compared to the control group, which indicates the high impact of these nanoparticles on the bio denitrification of this microorganism.

**Conclusion:** Therefore, with further experiments, it is hoped that removing nitrate with Nanoparticles Zero Iron (nZVI) from water resources would be possible.

Keywords: Bio denitrification, Thiobacillus denitrificans, nanostructure, bioreactor, Iau Science.

**Corresponding author:** 

Department of Microbiology, Research Institute of Petroleum Industry, Environment & Biotechnology Research Division, Tehran, Iran

Email:b.rasekh@gmail.com





## بررسی مکانیسم مولکولی نیتراتزدایی زیستی توسط *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* در حضور نانوساختار فلزی در بیوراکتور

الهه حمدى'، بهنام راسخ'\*، الهه تاجبخش'، فاطمه يزديان"، مريم قبه

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

۳. گروه علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

## چکیدہ

سابقه و هدف: نیترات یکی از آنیونهای معدنی است که در نتیجه اکسیداسیون نیتروژن عنصری حاصل میشود. آلودگی آبهای زیرزمینی و سطحی به نیترات در بسیاری از مناطق دنیا به یک مشکل مهم تبدیل شده است. بنابراین دستیابی به تکنولوژیهای جدید برای حذف نیترات ضروری میباشد. هدف از این پژوهش بررسی مکانیسم مولکولی نیتراتزدایی زیستی توسط *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* در حضور نانوذره فلزی کربن کوانتوم دات (CQD-Fe<sup>0</sup>) در بیوراکتور است.

**یافته ها:** طیف FTIR، تشکیل پیوند CQD و CQD-Fe<sup>0</sup> با افزایش دما (۳۵ درجه سلسیوس) CQD-Fe<sup>0</sup> درمحدوده ۲۹/۳۱-۳۹/۳۲ نانومتر مشاهده شد. نیتراتزدایی درحضور نانوذره CQD-Fe<sup>0</sup> با افزایش دما (۳۵ درجه سلسیوس) ۷۳/۴۳ ٪ بود. در شرایط ناپیوسته نیتراتزدایی زیستی برای نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup> برابر ۲۹/۸۳۱۲٪ حاصل شد. در بیوراکتور نیتراتزدایی زیستی در حضور نانوذره CQD-Fe<sup>0</sup> مقدار ۹۵٪ حاصل شد. بررسی بیان ژن نشان داد، بیان هر سه ژن narH .nirS و narH در سلولهای تیمار شده با نانوذره نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی داشته، که نشاندهنده تأثیر بالای نانوذرات در نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم میباشد.

**نتیجه گیری:** بنابراین با آزمایشهای بیشتر میتوان امیدوار به حذف زیستی نیترات در حضور نانوذرات آهن صفر ظرفیتی از منابع آب بود.

واژگان كليدى: نيتراتزدايى زيستى، تيوباسيلوس دنيتريفيكانس، نانو ساختار، بيوراكتور،Iau Science

نویسنده مسئول:

پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران پست الکترونیکی: b.rasekh@gmail.com تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۱

#### مقدمه

یون نیترات از جمله مهم ترین آلایندههای منابع آبهای زیرزمینی است و با توجه به حلالیت بالای آن، زدودن آن از آب آشامیدنی بسیار پرهزینه است. نیترات علاوهبر چرخه طبیعی ازت دراثر ورود فاضلاب انسانی، مواد زائد شهری و صنعتی و همچنین فعالیتهای کشاورزی وارد منابع آب و و ارزان است (۹). بررسی واکنشهای احیای  ${
m Fe}^0$  در محلول-های آبی نشان میدهد آهن فلزی،'Fe<sup>2+</sup> و هیدروژن، احیاکنندههای اصلی در محیط هستند (۱۰). اگر نانوذرات Fe<sup>0</sup> بەطور مستقیم درمحیط بیولوژیکی استفادہ شوند، به-دلیل خواص مغناطیسی و مساحت سطح بالا، تمایل به لخته شدن و اکسیداسیون در آنها وجود دارد. برای جلوگیری از این مشکل، فرآیند پوششدار کردن نانوذرات بهوسیله عوامل حفاظتی ضروری است (۱۱). اگرچه بیشتر مطالعات روی توسعه پوششهای محافظ پلیمر یا سیلیکا بوده است، اخیراً، نانوذرات مغناطیسی پوشیده شده با کربن کوانتوم دات (CQD) بهدلیل این که مواد بر پایه CQD مزایای بیشتری دارند، مورد توجه قرار گرفته است. خواص شگفت انگیز CQD مانند بیاثری شیمیایی، سمیت پائین، زیستسازگاری بسیار عالی نسبت به رنگهای آلی معمولی و نقاط کوانتومی نیمه هادی معدنی، پایداری فوق العاده در برابر فوتوبلیچینگ و حلاليت آلى بالا بسيار مورد توجه قرار گرفته است (١٢). Thiobacillus) دنيتريفيكانس تيوباسيلوس denitrificans)، یک میکروارگانیسم میلهای، گرم منفی، متحرك است كه اسپور تشكيل نمىدهد. اين ميكروارگانيسم كموليتواتوتروف است كه دنيتريفيكاسيون اتوتروف انجام مي-دهد و میتواند طیفوسیعی از ترکیبات کاهش یافته گوگرد را برای بهدست آوردن انرژی اکسید کند. اکسیژن، نیتریت، نیترات، اکسید نیتریک و اکسید نیتروژن میتوانند بهعنوان گیرنده نهایی الکترون برای اکسیداسیون گوگرد به کار روند. از آنجایی که این میکروارگانیسم ترجیح به استفاده از اکسیژن بهجای نیترات بهعنوان یک گیرنده الکترون نهایی دارد، دنيتريفيكاسيون فقط تحت شرايط بى هوازى انتظار مىرود. محدوده pH برای رشد اینمیکروارگانیسم P-۸ است (۱۳). از آنجایی که برای نیتراتزدایی نیاز به یک منبع کربن است، از نانوذرات مختلف و اندازههای متفاوت بهمنظور تأثیر آنها بر روی رهایش منبع کربنی استفاده شده است. مفردنیا و همکاران کارآیی استفاده از نانوساختار St-Fe<sup>0</sup> برای حذف نیترات را مورد بررسی قرار دادند. اثر نانوذرات آهن/ نشاسته صفر ظرفیتی در حضور تیوباسیلوس دنیتریفیکانس برای حذف نیترات با استفاده از نرم افزار Material Studio شبیهسازی شد. همزمان با حضور نانوذرات آهن/ نشاسته صفر

25. World Health Organization (WHO)

خاک شده و اثرات نامطلوبی بر سلامتی مصرف کنندگان برجا می گذارد (۱). طبق استاندارد اتحادیه اروپا و سازمان بهداشت جهانی<sup>۲</sup> چنانچه غلظت نیترات بیشتر از ۱۱/۳ میلی گرم/لیتر باشد برای سلامت انسان، بهویژه نوزادان خطرناک است (۲). در کشور ایران نیز حد استاندارد برای نیترات در آب شرب ۱۰ میلی گرم/لیتر است (۳). طی سال های گذشته، تغییرات قابل توجهی در چرخه نیتروژن جهانی بهوجود آمده است. بنابراین، نیاز جدی به فناوریهای مؤثر با کارایی بالا جهت پالایش منابع آب آلوده به نیترات احساس می شود. روش های متداول حذف نیترات از آب شامل روشهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی میباشد. دنیتریفیکاسیون زیستی فرآیندی است که در آن ترکیبات اکسید شده نیتروژن بهعنوان پذیرنده الکترون برای تولید انرژی مورد استفاده قرار می گیرند (۴). این روش می تواند همزمان چند آلاینده را حذف کند در حالی که روشهای فیزیکی و شیمیایی تنها یک آلاینده خاص را حذف میکنند (۵). اخیراً با ورود فناوریهای نوین مانند روشهای ترکیبی استفاده از میکروارگانیسمها و نانوساختارها، راهكارهاى جديد جهت تصفيه فاضلابهاى صنعتى و کشاورزی و آب شرب ایجاد شده و سبب بهبود کیفیت فرآیندهای حذف آلاینده نیترات از آب شده است. فرآیند جذب بهوسیله نانوذرات فلزی یکی از فناوریهای سازگار با محيط زيست است كه جهت حذف آلايندهها از آب استفاده می شود (۶). نیترات زدایی زیستی با احیا نیترات (توسط میکروارگانیسمهای نیتراتزدا)، روشی مناسب برای حذف زیستی نیترات از منابع آبی میباشد. جهت کاربرد صنعتی نیتراتزدایی زیستی، نیاز به افزایش میزان فعالیت میکروار گانیسم و جداسازی آنها میباشد. نانوذرات مبتنی بر آهن مانند Fe/Ni, Fe/Cu و Fe/Pd از تراكم آلايندههايي مثل نیترات در سفرههای آب زیرزمینی جلوگیری میکنند (۷). در بین نانوذرات صفر ظرفیتی، نانوذرات فلزی آهن صفرظرفیتی (Fe<sup>0</sup>) علاوهبر افزایش میزان فعالیت نیترات-زدایی زیستی میکروارگانیسم، جداسازی مغناطیسی بیوکاتالیست را سبب می شود (۸). Fe<sup>0</sup> یک عامل احیاکننده قوی است که از پتانسیل احیاکنندگی آن برای تصفیه و تجزیه آلایندهها در آب و فاضلاب استفاده می شود و تهیه آن آسان

24. European Union

ظرفیتی و تیوباسیلوس دنیتریفیکانس، راندمان حذف نیترات به ۹۱٪ و در غیاب نانوذره به ۴۴/۴۴٪ رسید. (۱۴) درک مکانیسمهای مولکولی کاهش دهنده نیترات در اکوسیستم-های طبیعی بسیار مهم است. توالی ژنهای مرتبط با آنزیم-های درگیر در دنیتریفیکاسیون و DNRA (napA) nirS .narH.narG و nrfA) از این سیستمها جدا شده و بهطور قابل توجهی از توالیهایی که قبلاً ثبت شدهاند متمایز هستند. ردوكتاز متصل به غشا اولين مرحله در كاهش نيترات را کاتالیز می کند. تجزیه و تحلیل دقیق ساختار ثانویه narH نشان داد این ژن (در مقایسه با nirS napA narG و nirK) به ژن ترجیحی برای مطالعات تنوع زیستی تبدیل شده است. على رغم اهميت اكولوژيكي، تحقيقات كمي در مورد چگونگي دنیتریفیکاسیون و ژنهای مرتبط با آن انجام شده است. از این و بیان ژنهای در گیر در مسیر نیترات ردوکتاز در نیترات-زدایی میکروارگانیسم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* مؤثر هستند. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی مکانیسم مولكولى نيتراتزدايى زيستى ميكروار گانيسم تيوباسيلوس *دنیتریفیکانس* در حضور نانوذره آهن صفر ظرفیتی پوشیده شده با کربن کوانتوم دات (CQD-Fe<sup>0</sup>) در بیوراکتور انجام شد.

## مواد و روشها

در این پژوهش از میکروار گانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس ATCC 23644 استفاده شد. میکروار گانیسم مورد استفاده در پژوهش از مجموعه میکروبی DSMZ آلمان تهیه شد. برای کشت سویه باکتریایی تیوباسیلوس دنیتریفیکانس از محیط کشت معدنی پایه استفاده شد. پژوهش حاضر در پژوهشکده محیط زیست، پژوهشگاه صنعت نفت تهران انجام شده است.

## آزمون سنجش نيترات

جهت سنجش میزان نیترات از روش کروماتروپیک اسید استفاده شد (دامنه برای نیترات برحسب ازت میلی گرم/لیتر ۲-۰/۳۰). در این روش در اثر واکنش معرف نیترات A و معرف نیترات B با نیترات محلول زرد رنگ ایجاد می شود. از طریق اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۰ نانومتر میزان جذب محلول حاصل اندازه گیری می شود. برای تهیه منحنی

<sup>1</sup> Basal Salt Medium

استاندارد نیترات، محلول نیترات با غلظتهای مختلف با استفاده از نیترات پتاسیم تهیه شد. به هر یک از لولههای آزمایش حاوی معرف نیترات A، ۱ میلیلیتر محلول نیترات اضافه شد و لوله ۱۰ بار تکان داده شدند، سپس با قیف معرف نیترات B به هر یک از لولهها اضافه شد و لولهها دوباره ۱۰ بار تکان داده شدند. پس از ظهور کامل رنگ زرد، جذب هر یک از لولهها در طول موج ۴۱۰ نانومتر خوانده شد و منحنی استاندارد نیترات به دست آمد (۱۵).

## اندازهگیری رشد سلولی و میزان نیتراتزدایی میکروارگانیسم

به منظور اندازه گیری رشد سلولی ۴ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری به ویال های ۴۰ میلی لیتر حاوی ۳۶ میلی لیتر محیط معدنی پایه<sup>۱</sup> منتقل شد. پتاسیم نیترات به عنوان منبع نیترات با غلظت ۳۰۰ میلی گرم/ میلی لیتر به محیط BSM اضافه شد. محیط کشت در انکوباتور (۳۰ درجه سلسیوس) مدت ۴۸–۲۴ ساعت همراه ویال شاهد بدون سلول باکتری گرماگذاری شدند. نمونه گیری با فاصله زمانی ۶ ساعت انجام شد. میزان رشد میکروارگانیسم میزان رشد میکروارگانیسم با خواندن اندازه گیری شد. همچنین، به منظور مطالعه و بررسی میزان فرآیند نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم جذب نوری انیترات محلول در طول موج ۴۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه فرآیند نیترات رهدو موانده شد و غلظت نیترات محلول در نهایت از روی نمودار استاندارد و با داشتن میزان جذب، غلظت مجهول به دست خواهد آورده شد (۱۶).

## تهیه نانوذرات فلزیFe<sup>0</sup> و بهبود سطح نانوذرات با کربن کوانتوم دات (CQD-Fe<sup>0</sup>)

روشهای متعددی برای ساخت نانوذرات Fe<sup>0</sup> وجود دارد. در این میان، روش کاهش در فاز مایع (روش کاهش بوروهیدرید) مورد توجه میباشد، که شامل افزودن کاهنده قوی به محلول حاوی یونهای آهن و کاهش آنها به نانوذرات فلزی می باشد (۱۷). کربن کوانتوم دات با استفاده از روش هیدروترمال سنتز شد (۱۸). بهطور خلاصه، ۲ گرم دی آمونیوم سیترات هیدروژن در ۷۵ میلی لیتر آب مقطر دمای ۲۵ درجه سلسیوس حل شد. این مخلوط در یک بمب هیدروترمال مدت ۱۸ ساعت دردمای این مخلوط در یک بمب هیدروترمال مدت ۱۸ ساعت دردمای

Downloaded from nembjpiau.ir on 2025-09-04

گروه اول: میکروارگانیسم در محیط BSM با غلظت ۳۰۰ میلی گرم/میلی لیتر نیترات مدت ۴۸ ساعت در دماهای ۲۵ و ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. بهمنظور ارزیابی اثر دما در نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم ، نمونه گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج با استفاده از کیت نیترات بررسی شد.

گروه دوم: نانوذرات فلزیCQD-Fe<sup>0</sup> در محیط BSM با غلظت نیترات ۳۰۰ میلیگرم/میلی لیتر در سه غلظت ۲۰/۰۵ ۵/۰ و ۱ گرم/لیتر نانوذرات در دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور گرماگذاری شدند. بهمنظور بررسی اثر غلظت نانوذرات و دما بر میزان نیترات-زدایی نانوذرات فلزی، نمونه گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج با استفاده از کیت نیترات بررسی شد.

گروه سوم: میکروار گانیسمهای پوشش یافته با نانوذره -CQD Fe<sup>0</sup> در محیط BSM با غلظت ۳۰۰ میلی گرم/ میلی لیتر نیترات مدت ۴۸ ساعت در سه غلظت ۲۰/۵، ۵/۰ و ۱ گرم/لیتر نانوذرات دردماهای ۲۵ و ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. به منظور بررسی اثر دما و غلظت نانوذرات بر میزان نیترات دایی زیستی میکروار گانیسم پوشش یافته با نانوذره CQD-Fe<sup>0</sup> نمونه گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج با استفاده از کیت نیترات بررسی شد.

## بررسی فرآیند نیتراتزدایی زیستی در بیوراکتور در حضور نانوذره <sup>0</sup>CQD-Fe

پس از بررسی رشد و فعالیت نیتراتزدایی میکروارگانیسم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* در ویال ۴۰ میلی لیتر با ۳۶ میلی-لیتر محیط کشت BSM در حضور و عدم حضور نانوذره CQD-Fe<sup>0</sup>، میکروارگانیسم در بیوراکتور با حجم ۵ لیتر عاوی ۲ لیتر محیط کشت BSM (سترون شده در اتوکلاو مدت ۴۸ ساعت با فیلتر تحت جریان گاز نیتروژن جهت خروج اکسیژن و ایجاد 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 میلی لیتر سوسپانسیون نانوذره شدند. بیوراکتور در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و ۲ H T تدنید. بیوراکتور در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و ۲ H T گردید. بهمنظور بررسی رشد و فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم، نمونه گیری هر ۴ ساعت تا ۵۲ ساعت انجام شد. محلول CQD حرارت داده شد، متعاقباً، ۵۱/۶ میلی گرم نانوذره Fe<sup>0</sup> به محلول افزوده شد و جهت همگن شدن، ده دقیقه همزده شد. پس از ۳۰ دقیقه به محلول، ۵/۴ گرم پتاسیم بوروهیدرید در ۲۰ میلی لیتر آب و ۳۰ میلی لیتر اتانول از طریق قیف جدا کننده با نرخ ۲–۱ قطره در ثانیه به محتویات بالن اضافه شد. با اضافه شدن قطرات این محلول ذرات سیاه رنگ Fe<sup>0</sup> شروع به تشکیل کرد. مخلوط سیاه رنگ مدت یک ساعت در دمای محیط همزده شد. سپس مخلوط صاف و دو بار با آب مقطر، یک بار با اتانول و جهت خشک شدن سریع با استون شستشو داده شد و به مدت یک شبانه روز در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد خشک گردید (۱۹).

مشخصه یابی نانوذرات Fe<sup>0</sup> پایدار شده با نشاسته (-St (CQD-Fe<sup>0</sup>) و کربن کوانتوم دات (<sup>(CQD-Fe</sup>)

بعد از سنتز نانوذرات، با استفاده از روشهای تحلیلی مختلف، مشخصهیابی انجام شد. آزمون XRD برای نانوذره (-CQD) PW 1730 با استفاده از دستگاه پراش پرتو ایکس مدل 1730 PW (Fe<sup>0</sup> تحت تابش ۵۷ ( (A۵۴۰۵۶/۱=۸ )، در ولتاژ ۴۰ کیلوولت -۸۰ و جریان ۳۰ میلی آمپر انجام گرفت. محدوده اسکن 20 از ۲۰ ادرجه قرار داده شد. تحلیل و بررسی نتایج حاصل از این آزمون توسط نرمافزار عوبر و برهم کنش بین کربن کوانتوم آزمون توسط نرمافزار BRUKRE ایجام شد. جهت مطالعه درمحدوده الکترونی عبوری (مدل BRUKRE کشور آلمان) ساختار سطحی و ریختشناسی و اندازه نانوذرات از تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) استفاده شد. همچنین آنالیز FESEM نیز برای نانوذرات GD-Fe0 انجام شد.

## پوشش سطح میکروارگانیسم با نانوذرات فلزی

جهت پوشش سطح میکروارگانیسم با نانوذرات<sup>6</sup>St-Fe و ۲۹۵، ۴ میلیلیتر سوسپانسیون باکتری در ویالهای ۴۰ میلیلیتر به ۳۶ میلیلیتر محیط کشت BSM اضافه شد، نانوذرات جداگانه با غلظتهای ۰/۰۵، ۰/۰ و۱ گرم/لیتر به محیط اضافه شدند.

بررسی فرآیند نیتراتزدایی گروههای آزمایشی مختلف

## بررسی بیان ژن با استفاده از تکنیک Real time-PCR روش بررسی بیان ژن

جهت واکنش بیان ژن، RNA از سلولها (میکروارگانیسم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس*)، با استفاده از روش-RNX PLUS و طبق پروتکل شرکت سازنده RNJia استخراج شد. Suno drop و طبق پروتکل شرکت سازنده از دستگاه RNA استخراج شد. با روش تعیین دانسیته نوری اندازه گیری شد. جهت سنتز cDNA و ۲۰۰ و ۲۰۰ نانومتر ارزیابی شد. جهت سنتز cDNA موجهای ۲۰۰ و ۲۰۰ نانومتر ارزیابی شد. جهت سنتز (bio Fact, Korea) bioFact از یک کیت dioFact (bioFact, Korea) استفاده شد. واکنش qPCR به روش سایبر گرین با استفاده از دستگاه corbett انجام گرفت. مواد مورد نیاز انجام واکنش RNA ase می DNA ase cDNA و CDN و CDN

Taq DNA Polymerase Master Mix ،free Water Reverse ،Primer Forward،RED(Amplicon) و CDNA و cDNA الگو استفاده شد. طراحی پرایمر به کمک Primer انجام شد. خصوصیات ترمودینامیکی و شکل Primer3 انجام شد. خصوصیات برمودینامیکی و شکل سهبعدی پرایمرها با نرمافزار Gene runner بررسی شد. پرایمرهای طراحی شده برای ژنهای مورد نظر مطابق جدول ۱ است:

ژن	توالی ( $5  imes 5$ )	عملكرد
nirS	F: CAC CCG GAG TTC ATC GTC	مؤثر در مسیر نیتریت ردوکتاز
	R: ACC TTG TTG GAC TGG TGG G	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
narH	F: GCC AAA ATT CGT TCA CAA GTC GG	مؤثر در مسیر نیترات ردوکتاز
	R: CCT GGA TGC GGC TCC GTT TTG CT	
recA	F: GCG TGC CTT GAA GTT TTA TTC TTC	کنترل داخلی
	R:TGT TCC CCG GTT CCTT AAA TT	6 6,

#### انجام واکنش Real-Time PCR برای ژنهای airS

#### recA g narH

برنامه دمایی و زمانی PCR برای ژن narH شامل: واسرشت-سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، مرحله باز شدن دو رشته در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای اتصال ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سلسیوس مدت ۹۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، برنامه دمایی و زمانی PCR برای ژن nirS شامل: واسرشتسازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله باز شدن دو رشته مرجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله باز شدن دو رشته مرجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، پلیمریزاسیون در دمای ۲۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۲۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه. برنامه دمایی و زمانی PCR برای ژن recA

شامل: واسرشتسازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله باز شدن دو رشته در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای اتصال ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ ثانیه، پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۱ ثانیه. جهت تست DNA، از پرایمر کنترلی تعبیه شده در کیت استفاده شد (۲۰).

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-04

#### يافتهها

## مشخصه یابی نانوذرات St-Fe<sup>0</sup> وCQD-Fe<sup>0</sup> طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

در طیف FTIR نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup>، چندین پیک مشاهده شد که طیفهای مربوط به گروه های عاملی CQD موجود برسطح نانوذرات میباشند. براساس شکل ۱، پیک درمحدوده <sup>1-</sup> ۳۱۸۲ Cm به ارتعاشات کششی گروه H-O اشاره دارد. پیک در ناحیه <sup>1-</sup>۲۰۵۰Cm میتواند مربوط به پیوند کششی M=Cباشد، همچنین نوار جذبی درمحدوده <sup>1-</sup>۱۶۶۵Cm به

حالت ارتعاشات کششی گروههای C=O و C=O کربن کوانتوم دات و Fe نسبت داده می شود. پیک در ناحیه <sup>1</sup>-Cm ۱۵۵۶ به ارتعاش کششی گروه NH اشاره دارد. پیک در ناحیه ۱۳۹۴۴Cm به پیوند C=C و در محدوده <sup>1</sup>-۱۵۵Cm موجود ۱۳۹۴۴Cm پیوند C-O-C اشاره دارد. پیک موجود در محدوده <sup>1</sup>-N ۲۷۲Cm مربوط به گروههای H-C و N-H موجود در آلکن و آمین می باشد. نوار جذبی موجود در <sup>1</sup>-Cm در ناحیه موجود در آلکن و آمین می باشد. نوار جذبی موجود در ناحیه ۲۹۶۹ به گروه H-C = اشاره دارد. پیک جذبی O-F در ناحیه پیوند 2DC و CD و CD و CD



شكل ۱- طيف FTIR نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup>

#### الگوی پراش پر تو ایکس'

پیکهای شاخص این ترکیب در نواحی  $0^{\circ} - 0^{\circ} = 0^{\circ}$ ،  $0^{\circ} = 0^{\circ}$ ،  $0^{\circ} = 0^{\circ}$ ،  $0^{\circ} = 0^{\circ}$   $0^{\circ} = 0^{\circ}$ ،  $0^{\circ} = 0^{\circ}$   $0^{\circ} = 0^{\circ}$  مشاهده می شود که پیک پهن در نواحی  $0^{\circ} - 0^{\circ} = 0^{\circ}$  نشاندهنده CQD

است. پیک در نواحی ۴۴ = ۲۵، ۴۵ = ۲۵ و ۴۶ = ۲۵ مشخصه وجود  $Fe^0$  در نانوذرات میباشد. اما قلههایی در نواحی ۴۵ – ۳۰ = ۲۵ و ۲۵ = ۲۵ دیده می شود که دلالت بر وجود اکسیدها و هیدروکسیدهای آهن در محصول نهایی است.



 $CQD-Fe^0$  شكل ۲- الگوى پراش پرتو ايكس نانوذرات

<sup>1</sup> X- Ray Diffraction (XRD)

## آناليز FESEM

دستگاه FESEM مجهز به آشکارساز EDS، علاوهبر تصویربرداری از سطح نمونه، دادههای مربوط به عناصر تشکیل دهنده نمونه نیز قابل استخراج میباشد. طبق تصاویر FESEMشکل۳، نانوذرات فلزیCQD-Fe<sup>0</sup> دارای اشکال

کروی و ساختار یکنواخت بوده، سطح نانوسامانه همگن بهنظر میرسد که نشاندهنده سازگاری خوب بین<sup>6</sup>Fe وCQD می-باشد. قطرمتوسط نانوذرات فلزی CQD-Fe<sup>0</sup> درمحدوده ۲۹/۳۲–۲۹/۳۲ نانومتر مشاهده شد.







شکل۳- تصاویر FESEM نانوذرات فلزی CQD-Fe<sup>0</sup> به روش کاهش در فاز مایع

میزان رشد و فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم میزان رشد و فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم از طریق میزان حذف نیترات و اندازهگیری میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر با استفاده از کیت نیترات مشخص شد. منحنی استاندارد نیترات با استفاده از رقتهایی از نیترات با محدوده غلظت ۳۰۰- میلی گرم/لیتر تهیه و بر حسب

میزان جذب هر یک از غلظتها منحنی استاندارد رسم شد. میزان فعالیت نیتراتزدایی میکروارگانیسم و میزان حذف نیترات، متناسب با رشد باکتری می باشد.



نمودار ۱- منحنی رشد میکروارگانیسم به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری غلظت میکروارگانیسم و حذف نیترات توسط میکروارگانیسم

بررسی فرآیند نیتراتزدایی میکروارگانیسم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* 

نتایج حاصل از جدول ۲ نشان میدهد با افزایش دما، رشد و فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم افزایش مییابد.

, 0,000	بررسی در یک یک میکر کر در یک ر	ستنى ميد درو، ر د ديستم در دمه مدى .	
آزمایش	دما (سلسيوس)	مقدار اولیه نیترات (میلی- گرم/لیتر)	حذف نيترات (٪)
١	۳۵	٣٠٠	۴۰,۴۵
٢	٣٠	٣٠٠	٣٧,١
٣	۲۵	٣٠٠	18,78

جدول۲- بررسی فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در دماهای مختلف

## بررسي فرآيند نيتراتزدايي نانوذرات فلزي

حذف غیرزیستی توسط نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup> برابر ۲۳/۴۳٪ نیترات در ۳۵ درجه سلسیوس و ۲۵٪ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در طی ۴۸ ساعت مشاهده شد. نتایج بهخوبی نشان میدهد احیا غیرزیستی بهشدت تحت تأثیر درجه حرارت بوده و در دماهای بالاتر با سرعت بالاتر انجام میشود. در واقع، با افزایش غلظت نانوذرات میزان حذف نیترات افزایش مییابد. با افزایش غلظت نانوذرات فلزی امکان برخورد بیشتر بین نیترات و نانوذرات و واکنشهای احیا ایجاد میشوند (۲۱). بررسی فرآیند نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم یوشش یافته با نانوذرات

طبق نتایج، میکروارگانیسم در حضور نانوذرات -CQD Fe<sup>0</sup>مقدار ۲۹/۸۳۱۲٪ نیتراتزدایی زیستی دارد. احیا زیستی

نیترات در حضور نانوذرات تحت تأثیر دما میباشد. افزایش دما سبب افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و افزایش فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم میشود.

## بررسی فرآیند نیتراتزدایی زیستی در بیوراکتور در حضور نانوذره CQD-Fe<sup>0</sup>

جدول ۳ نتایج حاصل از نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوذره CQD-Fe<sup>0</sup>را نشان میدهد. همچنین در نمودار ۲ میزان حذف نیترات توسط میکروارگانیسم درحضور نانوذره CQD-Fe<sup>0</sup> در زمانهای مختلف نشان داده شده است.

جدول۳ --نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* در حضور نانوذرات St-Fe<sup>0</sup> وCQD-Fe<sup>0</sup> در بیوراکتور

آزمایش	زمان (ساعت)	نیتراتزدایی زیستی ریزسازواره در حضور نانوذرات CQD-Fe <sup>0</sup> (٪)
1	•	•
۲	۴	١٩
٣	٨	٣٣/٢
۴	١٢	<del>۲</del> ۶/۷
۵	18	۵۰ /۳
۶	۲۰	۵۵
۷	۲۴	۶۳
•	۲۸	۶۸/۴
٩	٣٢	νν/٣
۱۰	۳۶	٨٢
11	۴۰	٨٣/٢
١٢	44	٩٣
١٣	۴۸	٩۵
١۴	۵۲	<i>ঀ۶</i> /٧



نمودار۲- میزان نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* در حضور نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup> در بیوراکتور

بررسی نتایج مشخص میکند نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوذرات فلزی در بیوراکتور در مقایسه با سامانه ناپیوسته (ویال) 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 به مدت ۴۸ ساعت ایجاد شد. طی انجام فرآیند نیتراتزدایی در فرمانتور بهمنظور ایجاد ۷ ملی اسید و باز اتوکلاو شده وارد سامانه و PH سامانه بهطور کامل کنترل شد. در شرایط ناپیوسته نیتراتزداییزیستی میکروارگانیسم در حضور نانوذره در بهترین شرایط پس از ۴۸ ساعت برابر با ۲۹/۸۳۱۲٪ حاصل شد. در سامانه بیوراکتور



(ب)

تسریع شد. پس از ۴۸ ساعت نیتراتزدایی زیستی ۹۵٪ حاصل شد و پس از گذشت ۵۲ ساعت نیتراتزدایی زیستی افزایش یافته و ۹۶/۷٪ میباشد.

# آنالیز و ارزیابی کمی ژنها با استفاده از تکنیک Real time-PCR

مطابق شکل ۴، آنالیزدادهها نشان داد، بیان هر سه ژن nirS، cQD-Fe<sup>0</sup> و recA درسلولهای تیمارشده با نانوذره CQD-Fe<sup>0</sup> نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی داشته است، که نشاندهنده تأثیر بالای این نانوذرات در نیتراتزدایی زیستی سلولهای میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس تیمارشده با این نانوذره میباشد.



(الف)



شكل ۴- نمودار بيان ژن الف) narH ، ب) nirS و ج) recA با روش q-PCR

نتايج نيتراتزدايى زيستى بررسی کردند، طبق میکروارگانیسم در حضور نانوذرات St-Fe<sup>0</sup> در بیوراکتور ۹۴٪./۷ بهدست آمد (۲۴). در مطالعه Blažková فرآیند دنیتریفیکاسیون اتوتروفیک مبتنی بر گوگرد با استفاده از تيوباسيلوس دنيتريفيكانس به عنوان يک روش جايگزين حذف نیترات از فاضلاب صنعتی مطالعه گردید. هدف از مطالعه آنها بررسی تاثیر افزودن<sup>+F</sup>e به مخلوط واکنش و تعیین دوز بهینه برای شرایط خاص بود. نتایج نشان داد افزودن<sup>+1</sup>Fe افزایش قابل توجهی در حذف نیترات برابر با ۰/۱ میلی گرم/لیتر ایجاد می کند (۲۵). با توجه به مطالعات انجام شده در سالهای اخیر استفاده از نانوذرات فلزی صفر ظرفیتی بهویژه Fe<sup>0</sup> توانسته است بسیاری از محدودیتهای نیترات-زدایی زیستی را برطرف نموده و سبب افزایش نیتراتزدایی زیستی شود (۲۲). با کاهش غلظت نیترات انتقال یون نیترات بر سطح نانوذرات با بازده بالاتری صورت می گیرد. طبق نتایج مطالعه اخیر، کارایی حذف نیترات توسط نانوذرات با افزایش غلظت نيترات كاهش مىيابد كه اين نتايج با پژوهش Sun و همکاران (۲۶) و Anotai و همکاران (۲۷) مطابقت دارد. با افزایش غلظت نیترات سرعت اکسید شدن نانوذرات فلزی در محیط آبی شتاب کمتری داشته، در نتیجه نیترات کمتری حذف می گردد (۲۸). همچنین با افزایش غلظت نیترات اولیه، میزان یون فروس به سرعت کاهش پیدا کرده و به پایینترین سطح میرسد که این امر سبب کاهش کارایی حذف نیترات می گردد (۲۷). در پژوهشی مشابه، اثر غلظتهای مختلف نیترات (۶۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ پی پی ام) بر رشد و فعالیت نیتراتزداییزیستی ریزسازواره تیوباسیلوس دنيتريفيكانس ارزيابي شد. طبق نتايج با افزايش غلظت نيترات

بحث

یکی از مشکلات فرآیندهای زیستی بازده پایین حذف نیترات بوده و میزان فعالیت نیتراتزدایی زیستی، برای فرآیندهای صنعتی و تجاری پایین میباشد (۲۲). سرعت پایین واکنش، فعالیت کم آنزیمها، پایداری کم بیوکاتالیست و مشکلات جداسازی بیوکاتالیست از جمله عوامل مؤثر در کاهش نیتراتزدایی زیستی میباشند. Krishna و همکاران در سال ۲۰۰۵ فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* را بررسی نمودند، نتایج پژوهش آنها نشان داد، در ۴۸ ساعت و ۳۴ درجه سلسیوس ميكروارگانيسم تيوباسيلوس دنيتريفيكانس بيشترين ميزان رشد و حذف نیترات را دارد (۱۶) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد میزان فعالیت نیتراتزدایی میکروارگانیسم و میزان حذف نیترات، متناسب با رشد باکتری میباشد. زیرا میزان حذف نیترات در مرحله تأخیر میکروارگانیسم به میزان کم میباشد و در مرحله لگاریتمی رشد، میزان حذف نیترات افزایش می یابد و بیشترین میزان حذف در ۴۸ ساعت می باشد. تغییرات رنگ محلول نیترات و ایجاد رنگ زرد نتیجه برهم کنش بین نیترات و کروموتروپیک اسید میباشد. در مطالعه Chen و همکاران با استفاده از نانوذرات Fe<sup>0</sup> برسطح میکروارگانیسم پ*اراکوکوس دنیتریفیکانس*، میزان ۷۶/۱۶٪ نیتراتزداییزیستی گزارش شد (۱۷). Montalvo و همکاران در بیوراکتور دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، با استفاده از جمعیت میکروار گانیسمهای اتوتروف و هتروتروف تثبیت شده بر بستر زئولیت ۹۵٪ نیتراتزدایی مشاهده گردید (۲۳). Rajab Beigyو همكاران نيز عملكرد نانوذرات St-Fe<sup>0</sup> را جهت فعالیت نیتراتزدایی زیستی تیوباسیلوس دنیتریفیکانس

4

Downloaded from nembjpiau.ir on 2025-09-04 ]

DOR: 20.1001.J 22285458.1402.13.51.11.3 ]

W

داده شده است. انواع مختلفی از نیترات ردوکتاز شامل نیترات ردوکتاز متصل به غشاء که توسط ژنهای Nar کدگذاری می-شوند شناسایی شده است (۲۹). در بررسی بیان مشخص شد در سلولهای تیمارشده با نانوذره CQD-Fe<sup>0</sup> بیان هر سه ژن narH ، nirS و recA نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی داشته، که نشاندهنده تأثیر بالای این نانوذره در نيتراتزدايىزيستى سلولهاى ميكروار گانيسم تيوباسيلوس دنیتریفیکانس تیمارشده با این نانوذرات میباشد. در مطالعه Hang و همکاران، مبنی بر حذف همزمان فسفر و نیترات-زدایی هتروتروفیک توسط (Fe (II، مشخص شد بیان ژنهای نيتراتزدايي norB nirS ، narG افزايش يافتند. چنین افزایشی نباید بهدلیل اکسیداسیون آهن وابسته به نیترات که در محیطهای کمبود آلی غالب است، باشد. در محیطی با تأمین مداوم (II) Fe و منابع کربن فراوان، چرخه افزایش فعالیت آنزیم نیتراتزدایی در حضور (II با تسهیل استفاده از بستر نیتروژن، تصور بر این بود تحریک متابولیسم و رشد نیتراتزدایی، بالا بردن فراوانی ژنهای نیتراتزدا و افزایش بیان آنزیمهای نیتراتزدا مسئول نیترات-زدایی هتروتروفیک افزایش یافته توسط (Fe (II است (۳۰).

## نتيجەگىرى

در این پژوهش برای نخستین بار از نانوذرات فلزی -CQD Fe<sup>0</sup> جهت بررسی نقش آن در نیتراتزدایی زیستی استفاده شد. طبق نتایج میتوان گفت درصد نیتراتزداییزیستی میکروارگانیسم در بیوراکتور بستر متحرک در حضور نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup> نسبت به سامانه ناپیوسته درصد بیشتری است. در این پژوهش، بیان هر سه ژن CQD-*in و Park* در سلولهای تیمارشده با CQD-Fe<sup>0</sup> نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی داشته، که نشاندهنده تأثیر بالای این-نانوذرات در نیتراتزداییزیستی میکروارگانیسم *تیوباسیلوس* افزودن نانوذرات فلزی<sup>0</sup>Fe<sup>0</sup> در ضدعفونی و حذف آلایندهها، نیتریتزداییزیستی تقویت شده و برای توسعه فرآیندهای حذف آلاینده مقرون به مفید خواهد بود. بهعنوان سوبسترای محدودکننده، سرعت رشد و فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم افزایش مییابد که با نتایج حاصل از این پژوهش همخوانی دارد (۱۹). با بررسی غلظتهای مختلف نانوذرات (۰/۰۵، ۵/۰و۱ گرم/لیتر) و اندازه گیری میزان نیتراتزدایی زیستی میکروار گانیسم مشخص شد غلظت مناسب نانوذرات St-Fe<sup>0</sup> برابر ٥/٠ گرم/لیتر میباشد. در غلظتهای بالاتر از ۰/۵ گرم/لیتر از نانوذرات، اثرات سمی حاصل از اکسیدهای فلزی نانوذرات بر سلول ایجاد می شود و رشد و فعالیت نیترات دایی زیستی میکروارگانیسم را کاهش میدهد. یونهای<sup>+Fe</sup> و هیدروژن در غلظت مناسب مىتوانند بەعنوان منبع الكترون اضافه در اختیار میکروارگانیسم قرار گرفته و فرآیند نیتراتزدایی زیستی را تسهیل بخشند. ازدیاد محصولات سمی حاصل از اكسيداسيون نانوذره CQD-Fe<sup>0</sup> سبب فروياشي غشا میکروارگانیسم و ایجاد استرس اکسیداتیو می شود و از این طریق میکروار گانیسم را غیرفعال کرده و سبب کاهش فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروار گانیسم می شود (۲۸).

در این پژوهش فعالیت نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوذره CQD-Fe<sup>0</sup> در بیوراکتور بستر متحرک حاوی محیط BSM و ۳۰۰ میلی-گرم/میلی لیتر نیترات و در pH ۷ مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتايج ميزان رشد و فعاليت نيتراتزدايي زيستي میکروارگانیسم در بیوراکتور درحضور CQD-Fe<sup>0</sup> برابر ٩۶/٧٪ بهدست آمد. اختلاف نیتراتزدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوذرات فلزی در سامانه ناپیوسته و سامانه بيوراكتور نشان داد شرايط بهينه شامل غلظت اكسيژن حل شده (برابر با صفر)، دمای ۳۵ درجه سلسیوس و pH که از جمله عوامل مهم در افزایش نیتراتزدایی زیستی میباشند، بهخوبی در سامانه بیوراکتور بستر متحرک ایجاد شده است و رشد میکروارگانیسم تسهیل و فعالیت نیتراتزدایی زیستی ميكروارگانيسم تسريع گرديد. بهطور كلي، تيوباسيلوس دنیتریفیکانس بهعنوان باکتری عملکردی در سیستم نیترات-زدایی مبتنی بر گوگرد شناسایی می شود. مسیر نیتراتزدایی بهطور کامل برای این باکتری با تجزیه و تحلیل ژنوم نشان

- Mehrabinia P, Kermannezhad J. Investigation of Nitrate Absorption Methods from Contaminated Waters Using Biochar. J of Water and Sustainable Development, 2020; 7(1): 79-90. doi: 10.22067/jwsd.v7i1.81367
- 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 (10) :996-985.
- 3. Krishan G, Singh S, Kumar C, Garg P, Suman G. Assessment of Groundwater Quality for Drinking Purpose by Using Water Quality Index (WQI) in Muzaffarnagar and Shamli Districts, Uttar Pradesh, India. Hydrol Current Res. 2016; 7(227): 1-4.
- 4. Chu L.B, Wang J.L. Denitrification of groundwater using PHBV blends in packed bed reactors and the microbial diversity. Chemosphere. 2016;155 (3): 463–470.
- 5. 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. WPT J. 2011; 6: 1-2.
- 6. Su J, Lin S, Chen Z.L, Megharaj M, Naidu R. Dechlorination of p-chlorophenol from aqueous solution using bentonite supported Fe/Pd nanoparticles: synthesis, characterization and kinetics. Desalination. 2011; 280:167–173.
- 7. Cundy A.B, Hopkinson L, Whitby R.L.D. Use of iron-based technologies in contaminated land and groundwater remediation: a review. Sci. Total Environ.2008; 400: 42–51.
- Kamali M, Costa M.E.V, Otero-Irurueta G, Capela I, Capela I. Ultrasonic irradiation as a green productionroute for coupling crystallinity and high specific surface area in iron nanomaterials. J. Clean. Prod. 2019; 211:185–197.
- Machado S, Pacheco J.G. Nanoremediation with zero-valent iron nanoparticles. In From Soil Remediation,1st ed.; Albergaria, J.T., Nouws, H.P.A., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2016; 108–120.
- 10. Zhang Y, Kohler N, Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. Biomaterials. 2002;23(7):1553-61.
- Farshbaf M, Davaran S, Rahimi F, Annabi N, Salehi R, Akbarzadeh A. Carbon quantum dots: recent progresses on synthesis, surface modification and applications. Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.2018; 46:7, 1331-1348.
- 12. Lim SY, Shen W, Gao Z. Carbon quantum dots and their applications. Chem Soc Rev. 2015; 44(1):362-81.
- Chenghong J, Xuping X, Mallavarapu M, Ravendra N, Zuliang Ch. Inhibition or promotion of biodegradation of nitrate by Paracoccus sp. In the presence of nanoscale zero-valent iron. Sci. Total Environ. 2015; 530–531: 241–246.
- 14. Mofradnia SR, Ashouri R, Tavakoli Z, Shahmoradi F, Rashedi H, Yazdian F. Effect of zerovalent iron/starch nanoparticle on nitrate removal using MD simulation. Int J Biol Macromol.2019; 121:727–33.
- 15. APHA 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association. Washington. DC. 80
- 16. Krishna M, Philip L. Thiobacillus denitrificans immobilized biotrickling filter for NO2 removal. Clean Technol. Environ. Policy.2005; 7: 285-293.
- 17. Chen M, Zhou X, Chen X, Cai Q, Zeng R. J. Mechanisms of nitrous oxide emission during photoelectrotrophic denitrification by self-photosensitized Thiobacillus denitrificans. Water Res. 2020; 172, 115501.
- 18. Lee C, Kim J.Y, Lee W.I, Nelson K.L, Yoon J, Sedlak D.L. Bactericidal effect of zero- valent iron nanoparticles on Eschrichia coli. Environ. Sci. Technol.2008; 42: 4927- 4933.
- 19. Navaee M, Yazdian F, Hamedi J, Pourmadadi M, Karbalaei A, Malmir S. Antibacterial properties of a bacterial cellulose CQD-TiO2 nanocomposite. Carbohydr. Polym. 2020; 234: 115835.

- 20. Chon, K., & Cho, J. (2015). Abundance and expression of denitrifying genes (narG, nirS, norB, and nosZ) in sediments of wastewater stabilizing constructed wetlands. *Environmental Engineering Research*, 20(1), 51-57.
- 21. Kanel S.R, Manning B, Charlet L, and Choi H. Removal of arsenic (III) from groundwater by nanoscale zerovalent iron. Environ. Sci. Technol. 2005; 39: 1291–1298.
- 22. Zhang X, Lin S, Chen Z, Megharaj M, Naidu R. Kaolinite-supported nanoscale zero-valent iron for removal of Pb2D from aqueous solution: Reactivity, characterization and mechanism. Water Res. 2011;45: 3481-3488.
- 23. Montalvo S, Huilinir C, Galvez D, Roca N, Guerrero L. Autotrophic denitrification with sulfide as electron donor: Effect of zeolite, organic matter and temperature in batch and continuous UASB reactors. Int Biodeterior Biodegradation. 2016; 108:158-165.
- 24. 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 in Lif Science. 2018;18(3):187-195.
- 25. Z. BlaŢková V, Trousil E, Slehová J, Palarčík M, Slezák J. Influence of Fe3+ Ions on Nitrate Removal by Autotrophic Denitrification Using Thiobacillus denitrificans, Chem. Biochem. Eng.2017; 31 (2) :167–172.
- 26. Sun Y.P, Li X.Q, Zhang W.X. A method for the preparation of stable dispersion of zero valent iron nanoparticles. Colloids Surf. 2007;308: 60-66.
- 27. Anotai J, Liao CH, Ruangchanikom C. Nitrate removal by Fe0/Co2 process using an innovative continuous flow reactor. EEMJ. 2010; 20: 77-84.
- 28. Hsu JC, Liao CH, Wei1 YL. Nitrate removal by synthetic nanoscale zero-valent iron in aqueous recirculated reactor. SER. 2011; 21: 353-359.
- 29. Beller, H. R., Chain, P. S., Letain, T. E., Chakicherla, A., Larimer, F. W., Richardson, P. M., Coleman, M. A., Wood, A. P., & Kelly, D. P. (2006). The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium Thiobacillus denitrificans. *Journal of bacteriology*, *188*(4), 1473–1488.
- 30. Hang M, Xinlei G, Yihua Ch, Jiaxin Zh, Tongzhou L. Fe (II) enhances simultaneous phosphorus removal and denitrification in heterotrophic denitrification by chemical precipitation and stimulating denitrifiers activity. Environ. Pollut. 2021; 287: 117668.