



Scan online to view this article

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

Elahe Hamdi¹, Behnam Rasekh^{2*}, Elahe Tajbakhsh¹, Fatemeh Yazdian³, Maryam Ghobeh⁴

1. Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

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

Tehran, Iran

3. Department of Life Science Engineering, 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-Fe⁰) in a bioreactor.

Materials and Methods: Fe⁰ nanoparticles were synthesized by the liquid-phase reduction method, also called the borohydride reduction method and for biocompatibility, uniform distribution, and non agglomeration, Fe⁰ 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-Fe⁰ bonds. The average diameter of CQD-Fe⁰ nanoparticles was in the range of 29.31 to 38.32 nm. Denitrification in the presence of CQD-Fe⁰, with increasing temperature (35C°) 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-Fe⁰ 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



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بررسی مکانیسم مولکولی نیترازدایی زیستی توسط تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوساختار فلزی در بیوراکتور

الهه حمدی^۱، بهنام راسخ^{۲*}، الهه تاجبخش^۱، فاطمه یزدیان^۳، مریم قبه^۴

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

چکیده

سابقه و هدف: نیترازدایی 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 نیترازدایی زیستی توسط تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوذره فلزی کربن کوانتوم دات (CQD-Fe⁰) در بیوراکتور است.

مواد و روش‌ها: نانوذره Fe⁰ به روش کاهش در فاز مایع که روش کاهش بوروهیدرید نیز نامیده می‌شود، سنتز شده است و به منظور زیست سازگاری، توزیع یکنواخت و عدم کلوخه شدن، Fe⁰ با کربن کوانتوم دات پوشش دار شد. مشخصه‌یابی نانوذرات توسط TEM, XRD, FESEM و FTIR تعیین گردید. فرآیند زیستی حذف نیترات در حضور و عدم حضور نانوذره بررسی شد. بیان ژن‌های *narH* و *nirS* با استفاده از real-time PCR نیز بررسی شد.

یافته‌ها: طیف FTIR، تشکیل پیوند CQD و Fe⁰ را تأیید کرد. قطر متوسط نانوذرات CQD-Fe⁰ در محدوده ۳۸/۳۲-۲۹/۳۱ نانومتر مشاهده شد. نیترازدایی در حضور نانوذره CQD-Fe⁰ با افزایش دما (۳۵ درجه سلسیوس) ۷۳/۴۳٪ بود. در شرایط ناپیوسته نیترازدایی زیستی برای نانوذرات CQD-Fe⁰ برابر ۷۹/۸۳۱۲٪ حاصل شد. در بیوراکتور نیترازدایی زیستی در حضور نانوذره CQD-Fe⁰ مقدار ۹۵٪ حاصل شد. بررسی بیان ژن نشان داد، بیان هر سه ژن *narH* و *nirS* در سلول‌های تیمار شده با نانوذره نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی داشته، که نشان‌دهنده تأثیر بالای نانوذرات در نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم می‌باشد.

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

واژگان کلیدی: نیترازدایی زیستی، تیوباسیلوس دنیتریفیکانس، نانو ساختار، بیوراکتور، Iau Science

مقدمه

یون نیترات از جمله مهم‌ترین آلاینده‌های منابع آب‌های زیرزمینی است و با توجه به حلالیت بالای آن، زدودن آن از آب آشامیدنی بسیار پرهزینه است. نیترات علاوه بر چرخه طبیعی ازت در اثر ورود فاضلاب انسانی، مواد زائد شهری و صنعتی و همچنین فعالیت‌های کشاورزی وارد منابع آب و

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

و ارزان است (۹). بررسی واکنش‌های احیای Fe^0 در محلول-های آبی نشان می‌دهد آهن فلزی، Fe^{2+} و هیدروژن، احیاکننده‌های اصلی در محیط هستند (۱۰). اگر نانوذرات Fe^0 به‌طور مستقیم در محیط بیولوژیکی استفاده 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) به دلیل 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 فوتولیچینگ و حلالیت آلی بالا بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۲).

تیوباسیلوس دنیتریفیکانس (*Thiobacillus denitrificans*)، یک میکروارگانیسم میله‌ای، گرم منفی، متحرک است که اسپور تشکیل نمی‌دهد. این میکروارگانیسم کمولیتوتوتروف است که دنیتریفیکاسیون اتوتروف انجام می‌دهد و می‌تواند طیف وسیعی از ترکیبات کاهش یافته گوگرد را برای به‌دست آوردن انرژی اکسید کند. اکسیژن، نیتريت، نیترات، اکسید نیتريك و اکسید نیتروژن می‌توانند به‌عنوان گیرنده نهایی الکترون برای اکسیداسیون گوگرد به‌کار روند. از آنجایی که این میکروارگانیسم ترجیح به استفاده از اکسیژن به‌جای نیترات به‌عنوان یک گیرنده الکترون نهایی دارد، دنیتریفیکاسیون فقط تحت شرایط بی‌هوازی انتظار می‌رود. محدوده pH برای رشد این میکروارگانیسم ۶-۸ pH است (۱۳). از آنجایی که برای نیترات‌زدایی نیاز به یک منبع کربن است، از نانوذرات مختلف و اندازه‌های متفاوت به‌منظور تأثیر آن‌ها بر روی رهايش منبع کربنی استفاده شده است. مفردنیا و همکاران کارآیی استفاده از نانو ساختار $St-Fe^0$ 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

خاک شده و اثرات نامطلوبی بر سلامتی مصرف‌کنندگان برجا می‌گذارد (۱). طبق استاندارد اتحادیه اروپا و سازمان بهداشت جهانی^۲ چنانچه غلظت نیترات بیشتر از ۱۱/۳ میلی‌گرم/لیتر باشد برای سلامت انسان، به‌ویژه نوزادان خطرناک است (۲). در کشور ایران نیز حد استاندارد برای نیترات در آب شرب ۱۰ میلی‌گرم/لیتر است (۳). طی سال‌های 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 می‌شود. روش‌های 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 می‌گیرند (۴). این روش می‌تواند 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، راهکارهای جدید جهت تصفیه فاضلاب‌های صنعتی 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 محیط زیست است که جهت حذف آلاینده‌ها از آب استفاده می‌شود (۶). نیترات‌زدایی 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 میکروارگانیسم و جداسازی آن‌ها می‌باشد. نانوذرات مبتنی بر آهن مانند Fe/Pd و Fe/Ni ، Fe/Cu از تراکم آلاینده‌هایی مثل نیترات در سفره‌های آب زیرزمینی جلوگیری می‌کنند (۷). در بین نانوذرات صفر ظرفیتی، نانوذرات فلزی آهن صفر ظرفیتی (Fe^0) علاوه بر افزایش میزان فعالیت نیترات-زدایی زیستی میکروارگانیسم، جداسازی مغناطیسی بیوکاتالیست را سبب می‌شود (۸). Fe^0 یک عامل احیاکننده قوی است که از پتانسیل احیاکنندگی آن برای تصفیه و تجزیه آلاینده‌ها در آب و فاضلاب استفاده می‌شود و تهیه آن آسان

25. World Health Organization (WHO)

24. European Union

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 میکروارگانیزم

به منظور اندازه‌گیری رشد سلولی ۴ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری به ویال‌های ۴۰ میلی‌لیتر حاوی ۳۶ میلی‌لیتر محیط معدنی پایه^۱ منتقل شد. پتاسیم نیترات به عنوان منبع نیترات با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به محیط BSM اضافه شد. محیط کشت در انکوباتور (۳۰ درجه سلسیوس) مدت ۴۸-۲۴ ساعت همراه ویال شاهد بدون سلول باکتری گرماگذاری شدند. نمونه‌گیری با فاصله زمانی ۶ ساعت انجام شد. میزان رشد میکروارگانیزم میزان رشد میکروارگانیزم با خواندن جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. همچنین، به منظور مطالعه و بررسی میزان فرآیند نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیزم جذب نوری نیترات محلول در طول موج ۴۱۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده 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 فلزی Fe⁰ و بهبود سطح نانوذرات با کربن کوانتوم دات (CQD-Fe⁰)

روش‌های متعددی برای ساخت نانوذرات Fe⁰ 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 می‌باشد (۱۷). کربن کوانتوم دات با استفاده از روش هیدروترمال سنتز شد (۱۸). به طور خلاصه، ۲ گرم دی‌آمونیم سیترات هیدروژن در ۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر دمای ۲۵ درجه سلسیوس حل شد. این مخلوط در یک بمب هیدروترمال مدت ۱۸ ساعت در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به منظور تولید ۲۶/۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر

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 اکوسیستم‌های طبیعی بسیار مهم است. توالی ژن‌های مرتبط با آنزیم‌های درگیر در دنیتریفیکاسیون و DNRA (*napA*) *narG narH narX* و *nirS* از این سیستم‌ها جدا شده و به طور قابل توجهی از توالی‌هایی که قبلاً ثبت شده‌اند متمایز هستند. ردوکتاز متصل به غشا اولین مرحله در کاهش نیترات را کاتالیز می‌کند. 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. علی‌رغم اهمیت اکولوژیکی، تحقیقات کمی در مورد چگونگی دنیتریفیکاسیون و ژن‌های مرتبط با آن انجام شده است. از این رو بیان ژن‌های درگیر در مسیر نیترات ردوکتاز در نیترات‌زدایی میکروارگانیزم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس مؤثر هستند. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی مکانیسم مولکولی نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیزم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوذره آهن صفر ظرفیتی پوشیده شده با کربن کوانتوم دات (CQD-Fe⁰) در بیوراکتور انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از میکروارگانیزم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس ATCC 23644 استفاده شد. میکروارگانیزم 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 پژوهشگاه محیط زیست، پژوهشگاه صنعت نفت تهران انجام شده است.

آزمون سنجش نیترات

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

^۱ Basal Salt Medium

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

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

گروه سوم: میکروارگانسیم های پوشش یافته با نانوذره -CQD Fe^0 در محیط BSM با غلظت ۳۰۰ میلی گرم/میلی لیتر نیترا ت مدت ۴۸ ساعت در سه غلظت ۰/۰۵، ۰/۵ و ۱ گرم/لیتر نانوذرات در دماهای ۲۵ و ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. به منظور بررسی اثر دما و غلظت نانوذرات بر میزان نیترا ت زدایی زیستی میکروارگانسیم پوشش یافته با نانوذره Fe^0 -CQD نمونه گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج با استفاده از کیت نیترا ت بررسی شد.

بررسی فرآیند نیترا ت زدایی زیستی در بیوراکتور در حضور نانوذره Fe^0 -CQD

پس از بررسی رشد و فعالیت نیترا ت زدایی میکروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در ویال ۴۰ میلی لیتر با ۳۶ میلی-لیتر محیط کشت BSM در حضور و عدم حضور نانوذره Fe^0 -CQD، میکروارگانسیم در بیوراکتور با حجم ۵ لیتر حاوی ۲ لیتر محیط کشت BSM (سترون شده در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سلسیوس 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 میلی لیتر سوسپانسیون نانوذره Fe^0 -CQD (۰/۷۵ گرم لیتر)، به محیط کشت سترون افزوده شدند. بیوراکتور در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و pH تنظیم گردید. به منظور بررسی رشد و فعالیت نیترا ت زدایی زیستی میکروارگانسیم، نمونه گیری هر ۴ ساعت تا ۵۲ ساعت انجام شد.

محلول CQD حرارت داده شد، متعاقباً، ۵۱/۶ میلی گرم نانوذره Fe^0 به محلول افزوده شد و جهت همگن شدن، ده دقیقه هم زده 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 ۱-۲ قطره در ثانیه به محتویات بالن اضافه شد. با اضافه شدن قطرات این محلول ذرات سیاه رنگ Fe^0 شروع به تشکیل کرد. مخلوط سیاه رنگ مدت یک ساعت در دمای محیط هم زده 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^0 پایدار شده با نشاسته (St- Fe^0) و کربن کوانتوم دات (Fe^0 -CQD)

بعد از سنتز نانوذرات، با استفاده از روش های تحلیلی مختلف، مشخصه یابی انجام شد. آزمون XRD برای نانوذره (CQD- Fe^0) با استفاده از دستگاه پراش پرتو ایکس مدل PW 1730، تحت تابش $Cu-K\alpha$ ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$)، در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی آمپر انجام گرفت. محدوده اسکن 2 θ از ۸۰-۱۰ درجه قرار داده شد. تحلیل و بررسی نتایج حاصل از این آزمون توسط نرم افزار XPERT high score plus نسخه ۳،۰،۵ انجام شد. تأیید پیوند و برهم کنش بین کربن کوانتوم دات و نانوذره فلزی با استفاده از دستگاه FT-IR Spectrophotometer (مدل BRUKRE کشور آلمان) در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ انجام شد. جهت مطالعه ساختار سطحی و ریخت شناسی و اندازه نانوذرات از تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) استفاده شد. همچنین آنالیز FESEM نیز برای نانوذرات CQD- Fe^0 انجام شد.

پوشش سطح میکروارگانسیم با نانوذرات فلزی

جهت پوشش سطح میکروارگانسیم با نانوذرات St- Fe^0 و CQD- Fe^0 ، ۴ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری در ویال های ۴۰ میلی لیتر به ۳۶ میلی لیتر محیط کشت BSM اضافه شد، نانوذرات جداگانه با غلظت های ۰/۰۵، ۰/۵ و ۱ گرم/لیتر به محیط اضافه شدند.

بررسی فرآیند نیترا ت زدایی گروه های آزمایشی مختلف

Taq DNA Polymerase Master Mix, free Water Reverse, Primer Forward, RED(Amplicon) و cDNA الگو استفاده شد. طراحی پرایمر به کمک Primer3 انجام شد. خصوصیات ترمودینامیکی و شکل سه بعدی پرایمرها با نرم افزار Gene runner بررسی شد. پرایمرهای طراحی شده برای ژن های مورد نظر مطابق جدول ۱ است:

بررسی بیان ژن با استفاده از تکنیک Real time-PCR
روش بررسی بیان ژن
 جهت واکنش بیان ژن، RNA از سلول ها (میکروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس)، با استفاده از روش-RNX PLUS و طبق پروتکل شرکت سازنده RNJia استخراج شد. غلظت RNA به دست آمده با استفاده از دستگاه Nano drop با روش تعیین دانسیته نوری اندازه گیری شد. RNA در طول موج های ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر ارزیابی شد. جهت سنتز cDNA از پروتکل سازنده از یک کیت bioFact (bio Fact, Korea) استفاده شد. واکنش qPCR به روش سایبرگرین با استفاده از دستگاه Corbett انجام گرفت. مواد مورد نیاز انجام واکنش qPCR شامل: نمونه های cDNA، DNA ase و RNA ase

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی ژن های *recA* و *narH nirS* در تیوباسیلوس دنیتریفیکانس

ژن	توالی (5' → 3')	عملکرد
<i>nirS</i>	F: CAC CCG GAG TTC ATC GTC R: ACC TTG TTG GAC TGG TGG G	مؤثر در مسیر نیتريت ردوكتاز
<i>narH</i>	F: GCC AAA ATT CGT TCA CAA GTC GG R: CCT GGA TGC GGC TCC GTT TTG CT	مؤثر در مسیر نیتريت ردوكتاز
<i>recA</i>	F: GCG TGC CTT GAA GTT TTA TTC TTC R: TGT TCC CCG GTT CCTT AAA TT	کنترل داخلی

شامل: واسرشت سازی 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 cDNA، از پرایمر کنترلی تعبیه شده در کیت استفاده شد (۲۰).

انجام واکنش Real-Time PCR برای ژن های *nirS* و *recA* و *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 به مدت ۹۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، برنامه دمایی و زمانی PCR برای ژن *nirS* شامل: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله باز شدن دو رشته در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای اتصال ۶۱ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه. برنامه دمایی و زمانی PCR برای ژن *recA*

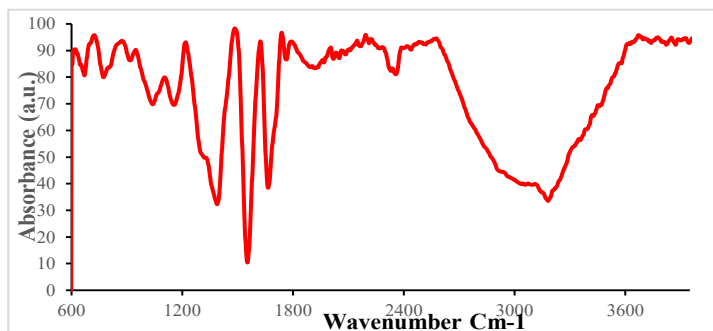
یافته‌ها

حالت ارتعاشات کششی گروه‌های C=C و C=O کربن کوانتوم دات و Fe نسبت داده می‌شود. پیک در ناحیه Cm^{-1} ۱۵۵۶ به ارتعاش کششی گروه NH اشاره دارد. پیک در ناحیه Cm^{-1} ۱۳۹۴ به پیوند C=C و در محدوده Cm^{-1} ۱۱۵۵ به ارتعاش کششی پیوند C-O-C اشاره دارد. پیک موجود در محدوده Cm^{-1} ۷۷۲ مربوط به گروه‌های C-H و N-H موجود در آلکن و آمین می‌باشد. نوار جذبی موجود در Cm^{-1} ۶۷۱ به گروه C-H= اشاره دارد. پیک جذبی Fe-O در ناحیه Cm^{-1} ۶۰۱ ظاهر شده است. طیف FTIR حاصله، تشکیل پیوند CQD و Fe^0 را تأیید کرد.

مشخصه یابی نانوذرات St-Fe^0 و CQD-Fe^0

طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

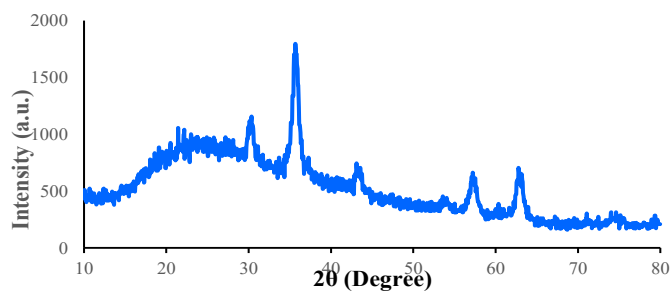
در طیف FTIR نانوذرات CQD-Fe^0 ، چندین پیک مشاهده شد که طیف‌های مربوط به گروه‌های عاملی CQD موجود بر سطح نانوذرات می‌باشند. براساس شکل ۱، پیک در محدوده Cm^{-1} ۳۱۸۲ به ارتعاشات کششی گروه O-H اشاره دارد. پیک در ناحیه Cm^{-1} ۲۰۵۰ می‌تواند مربوط به پیوند کششی N=C باشد، همچنین نوار جذبی در محدوده Cm^{-1} ۱۶۶۵ به

شکل ۱- طیف FTIR نانوذرات CQD-Fe^0

است. پیک در نواحی $2\theta = 44^\circ$ ، $2\theta = 57^\circ$ و $2\theta = 63^\circ$ مشخصه وجود Fe^0 در نانوذرات می‌باشد. اما قله‌هایی در نواحی 35° ، 30° و $2\theta = 57^\circ$ دیده می‌شود که دلالت بر وجود اکسیدها و هیدروکسیدهای آهن در محصول نهایی است.

الگوی پراش پرتو ایکس^۱

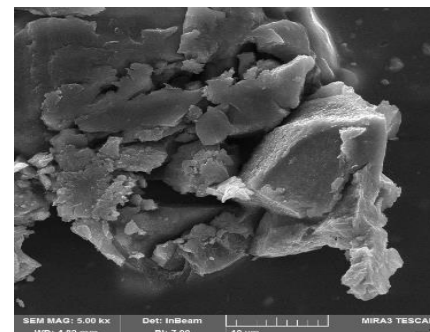
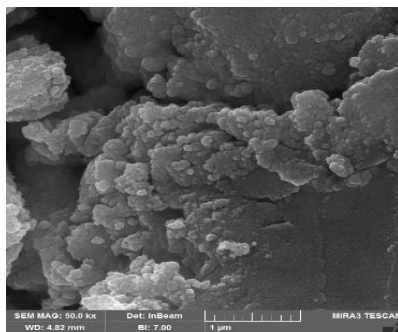
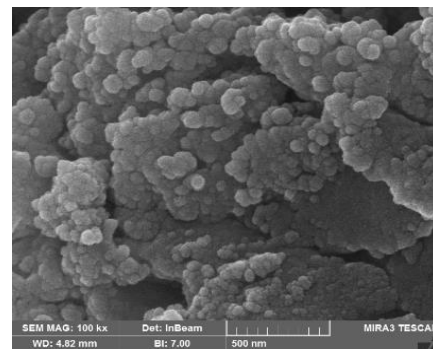
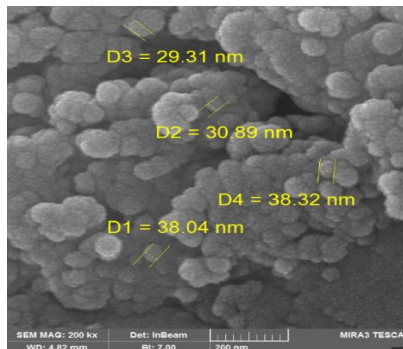
پیک‌های شاخص این ترکیب در نواحی $2\theta = 33^\circ$ ، $2\theta = 30^\circ$ ، $2\theta = 35^\circ$ ، $2\theta = 44^\circ$ ، $2\theta = 57^\circ$ و $2\theta = 63^\circ$ مشاهده می‌شود که پیک پهن در نواحی $2\theta = 22-23^\circ$ نشان‌دهنده CQD

شکل ۲- الگوی پراش پرتو ایکس نانوذرات CQD-Fe^0 ^۱ X- Ray Diffraction (XRD)

آنالیز FESEM

دستگاه FESEM مجهز به آشکارساز EDS، علاوه بر تصویربرداری از سطح نمونه، داده‌های مربوط به عناصر تشکیل دهنده نمونه نیز قابل استخراج می‌باشد. طبق تصاویر FESEM شکل ۳، نانوذرات فلزی CQD-Fe^0 دارای اشکال

کروی و ساختار یکنواخت بوده، سطح نانوسامانه همگن به نظر می‌رسد که نشان‌دهنده سازگاری خوب بین Fe^0 و CQD می‌باشد. قطر متوسط نانوذرات فلزی CQD-Fe^0 در محدوده ۲۹/۳۱-۳۸/۳۲ نانومتر مشاهده شد.

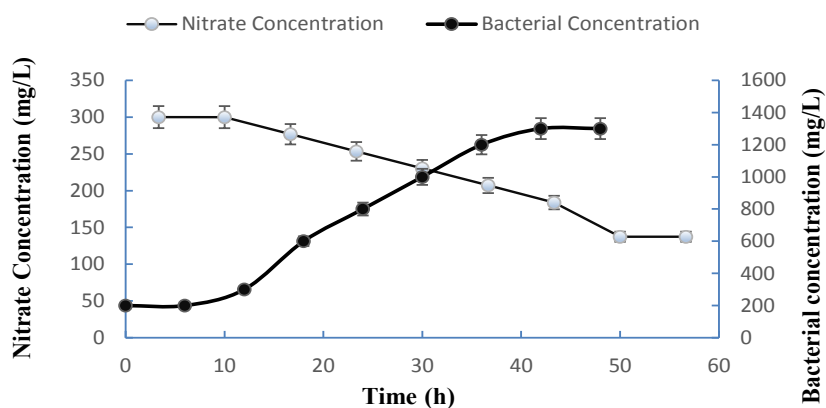


شکل ۳- تصاویر FESEM نانوذرات فلزی CQD-Fe^0 به روش کاهش در فاز مایع

میزان رشد و فعالیت نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم

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

میزان رشد و فعالیت نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم از طریق میزان حذف نیترات و اندازه‌گیری میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر با استفاده از کیت نیترازدایی مشخص شد. منحنی استاندارد نیترات با استفاده از رقت‌هایی از نیترات با محدوده غلظت ۰-۳۰۰ میلی‌گرم/لیتر تهیه و بر حسب



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

بررسی فرآیند نیترات زدایی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس

نتایج حاصل از جدول ۲ نشان می دهد با افزایش دما، رشد و فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم افزایش می یابد.

جدول ۲- بررسی فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در دماهای مختلف

آزمایش	دما (سلسیوس)	مقدار اولیه نیترات (میلی - گرم /لیتر)	حذف نیترات (%)
۱	۳۵	۳۰۰	۴۰,۴۵
۲	۳۰	۳۰۰	۳۷,۱
۳	۲۵	۳۰۰	۱۶,۳۶

بررسی فرآیند نیترات زدایی نانوذرات فلزی

حذف غیرزیستی توسط نانوذرات CQD-Fe^0 برابر $73/43\%$ نیترات در 35 درجه سلسیوس و $2/5\%$ در دمای 25 درجه سلسیوس در طی 48 ساعت مشاهده شد. نتایج به خوبی نشان می دهد احیا غیرزیستی به شدت تحت تأثیر درجه حرارت بوده و در دماهای بالاتر با سرعت بالاتر انجام می شود. در واقع، با افزایش غلظت نانوذرات میزان حذف نیترات افزایش می یابد. با افزایش غلظت نانوذرات فلزی امکان برخورد بیش تر بین نیترات و نانوذرات و واکنش های احیا ایجاد می شوند (21).

بررسی فرآیند نیترات زدایی زیستی میکروارگانسیم پوشش یافته با نانوذرات

طبق نتایج، میکروارگانسیم در حضور نانوذرات CQD-Fe^0 مقدار $79/8312\%$ نیترات زدایی زیستی دارد. احیا زیستی

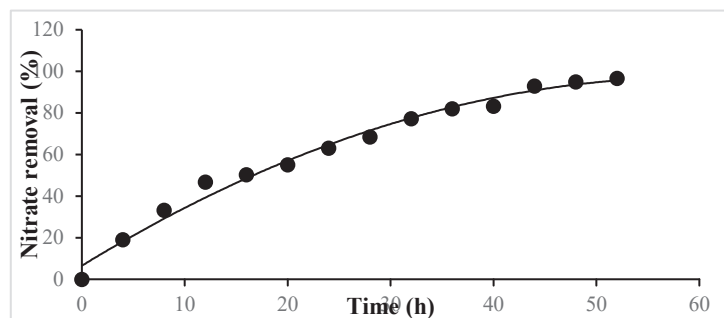
نیترات در حضور نانوذرات تحت تأثیر دما می باشد. افزایش دما سبب افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و افزایش فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانسیم می شود.

بررسی فرآیند نیترات زدایی زیستی در بیوراکتور در حضور نانوذره CQD-Fe^0

جدول 3 نتایج حاصل از نیترات زدایی زیستی میکروارگانسیم در حضور نانوذره CQD-Fe^0 را نشان می دهد. همچنین در نمودار 2 میزان حذف نیترات توسط میکروارگانسیم در حضور نانوذره CQD-Fe^0 در زمان های مختلف نشان داده شده است.

جدول 3- نیترات زدایی زیستی میکروارگانسیم تیواسیلیوس دنتریفیکانس در حضور نانوذرات CQD-Fe^0 و St-Fe^0 در بیوراکتور

آزمایش	زمان (ساعت)	نیترات زدایی زیستی ریزسازواره در حضور نانوذرات CQD-Fe^0 (%)
1	0	0
2	4	19
3	8	33/2
4	12	46/7
5	16	50/3
6	20	55
7	24	63
8	28	68/4
9	32	77/3
10	36	82
11	40	83/2
12	44	93
13	48	95
14	52	96/7



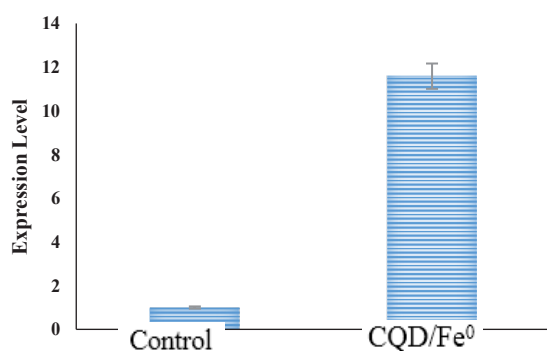
نمودار ۲- میزان نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوذرات CQD-Fe⁰ در بیوراکتور

تسریع شد. پس از ۴۸ ساعت نیترات زدایی زیستی ۹۵٪ حاصل شد و پس از گذشت ۵۲ ساعت نیترات زدایی زیستی افزایش یافته و ۹۶/۷٪ می باشد.

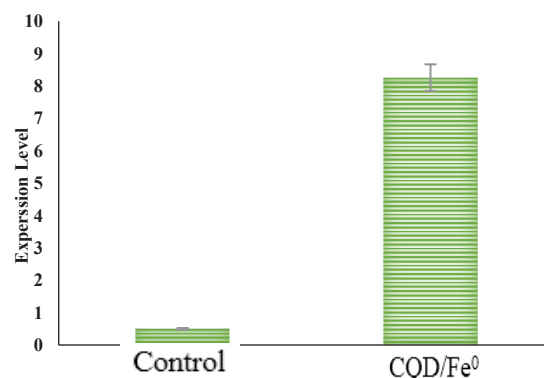
آنالیز و ارزیابی کمی ژن‌ها با استفاده از تکنیک Real time-PCR

مطابق شکل ۴، آنالیز داده‌ها نشان داد، بیان هر سه ژن *nirS*، *recA* و *narH* در سلول‌های تیمار شده با نانوذره CQD-Fe⁰ نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی داشته است، که نشان‌دهنده تأثیر بالای این نانوذرات در نیترات زدایی زیستی سلول‌های میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس تیمار شده با این نانوذره می باشد.

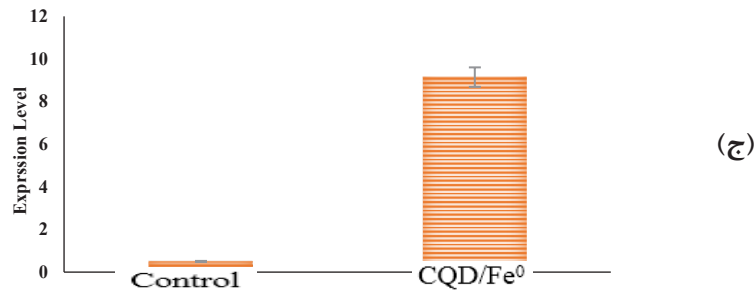
بررسی نتایج مشخص می‌کند نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوذرات فلزی در بیوراکتور در مقایسه با سامانه ناپیوسته (ویال) کارایی بالاتری در حذف نیترات دارد. در بیوراکتور جهت ایجاد شرایط بی‌هوازی به منظور اکسایش نانوذرات و تولید الکترون، جریان گاز نیتروژن توسط کپسول نیتروژن به مدت ۴۸ ساعت ایجاد شد. طی انجام فرآیند نیترات زدایی در فرماتور به منظور ایجاد pH ۷، اسید و باز اتوکلاو شده وارد سامانه و pH سامانه به طور کامل کنترل شد. در شرایط ناپیوسته نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوذره در بهترین شرایط پس از ۴۸ ساعت برابر با ۷۹/۸۳۱۲٪ حاصل شد. در سامانه بیوراکتور نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوذره فلزی،



(الف)



(ب)



شکل ۴- نمودار بیان ژن الف (*narH*، ب) *nirS* و ج) *recA* با روش q-PCR

بحث

یکی از مشکلات فرآیندهای زیستی بازده پایین حذف نیترا بوده و میزان فعالیت نیترازدایی 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 نیترازدایی زیستی می‌باشند. Krishna و همکاران در سال ۲۰۰۵ فعالیت نیترازدایی زیستی میکروارگانیزم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* را بررسی نمودند، نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد، در ۴۸ ساعت و ۳۴ درجه سلسیوس میکروارگانیزم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* بیشترین میزان رشد و حذف نیترا را دارد (۱۶) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد میزان فعالیت نیترازدایی میکروارگانیزم و میزان حذف نیترا، متناسب با رشد باکتری می‌باشد. زیرا میزان حذف نیترا در مرحله تأخیر میکروارگانیزم به میزان کم می‌باشد و در مرحله لگاریتمی رشد، میزان حذف نیترا افزایش می‌یابد و بیشترین میزان حذف در ۴۸ ساعت می‌باشد. تغییرات رنگ محلول نیترا و ایجاد رنگ زرد نتیجه برهم‌کنش بین نیترا و کروموتروپیک اسید می‌باشد. در مطالعه Chen و همکاران با استفاده از نانوذرات Fe^0 بر سطح میکروارگانیزم پاراکوکوس دنیتریفیکانس، میزان $76/16\%$ نیترازدایی زیستی گزارش شد (۱۷). Montalvo و همکاران در بیوراکتور دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از جمعیت میکروارگانیزم‌های اتوتروف و هتروتروف تثبیت شده بر بستر ژئولیت 95% نیترازدایی مشاهده گردید (۲۳). Rajab و Beigy همکاران نیز عملکرد نانوذرات $St-Fe^0$ را جهت فعالیت نیترازدایی زیستی *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس*

بررسی کردند، طبق نتایج نیترازدایی زیستی میکروارگانیزم در حضور نانوذرات $St-Fe^0$ در بیوراکتور $94/17\%$ به‌دست آمد (۲۴). در مطالعه Blažková فرآیند دنیتریفیکاسیون اتوتروفیک مبتنی بر گوگرد با استفاده از *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* به عنوان یک روش جایگزین حذف نیترا از فاضلاب صنعتی مطالعه گردید. هدف از مطالعه آن‌ها بررسی تاثیر افزودن Fe^{3+} به مخلوط واکنش و تعیین دوز بهینه برای شرایط خاص بود. نتایج نشان داد افزودن Fe^{3+} افزایش قابل توجهی در حذف نیترا برابر با $0/1$ میلی‌گرم/لیتر ایجاد می‌کند (۲۵). با توجه به مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر استفاده از نانوذرات فلزی صفر ظرفیتی به‌ویژه Fe^0 توانسته است بسیاری از محدودیت‌های نیترازدایی زیستی را برطرف نموده و سبب افزایش نیترازدایی زیستی شود (۲۲). با کاهش غلظت نیترا انتقال یون نیترا بر سطح نانوذرات با بازده بالاتری صورت می‌گیرد. طبق نتایج مطالعه اخیر، کارایی حذف نیترا توسط نانوذرات با افزایش غلظت نیترا کاهش می‌یابد که این نتایج با پژوهش Sun و همکاران (۲۶) و Anotai و همکاران (۲۷) مطابقت دارد. با افزایش غلظت نیترا سرعت اکسید شدن نانوذرات فلزی در محیط آبی شتاب کم‌تری داشته، در نتیجه نیترا کم‌تری حذف می‌گردد (۲۸). همچنین با افزایش غلظت نیترا اولیه، میزان یون فروس به سرعت کاهش پیدا کرده و به پایین‌ترین سطح می‌رسد که این امر سبب کاهش کارایی حذف نیترا می‌گردد (۲۷). در پژوهشی مشابه، اثر غلظت‌های مختلف نیترا (۶۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ پی پی ام) بر رشد و فعالیت نیترازدایی زیستی ریزسازواره *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* ارزیابی شد. طبق نتایج با افزایش غلظت نیترا

داده شده است. انواع مختلفی از نیتراژ ردوکتاز شامل نیتراژ ردوکتاز متصل به غشاء که توسط ژن های *Nar* کدگذاری می-شوند شناسایی شده است (۲۹). در بررسی بیان مشخص شد در سلول های تیمار شده با نانوذره Fe^0 -CQD بیان هر سه ژن *nirS*، *narH* و *recA* نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی داشته، که نشان دهنده تأثیر بالای این نانوذره در نیتراژ زدایی زیستی سلول های میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس تیمار شده با این نانوذرات می باشد. در مطالعه Hang و همکاران، مبنی بر حذف هم زمان فسفر و نیتراژ زدایی هتروتروفیک توسط $Fe(II)$ مشخص شد بیان ژن های نیتراژ زدایی *narG*، *nirS* و *nosZ* افزایش یافتند. چنین افزایشی نباید به دلیل اکسیداسیون آهن وابسته به نیتراژ که در محیط های کمبود آلی غالب است، باشد. در محیطی با تأمین مداوم $Fe(II)$ و منابع کربن فراوان، چرخه افزایش فعالیت آنزیم نیتراژ زدایی در حضور $Fe(II)$ با تسهیل استفاده از بستر نیتروژن، تصور بر این بود تحریک متابولیسم و رشد نیتراژ زدایی، بالا بردن فراوانی ژن های نیتراژ زدا و افزایش بیان آنزیم های نیتراژ زدا مسئول نیتراژ زدایی هتروتروفیک افزایش یافته توسط $Fe(II)$ است (۳۰).

نتیجه گیری

در این پژوهش برای نخستین بار از نانوذرات فلزی CQD- Fe^0 جهت بررسی نقش آن در نیتراژ زدایی زیستی استفاده شد. طبق نتایج می توان گفت درصد نیتراژ زدایی زیستی میکروارگانیسم در بیوراکتور بستر متحرک در حضور نانوذرات Fe^0 -CQD نسبت به سامانه ناپیوسته درصد بیشتری است. در این پژوهش، بیان هر سه ژن *nirS*، *narH* و *recA* در سلول های تیمار شده با Fe^0 -CQD نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی داشته، که نشان دهنده تأثیر بالای این-نانوذرات در نیتراژ زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس می باشد. یافته های این مطالعه نشان داد، با افزودن نانوذرات فلزی Fe^0 در ضد عفونی و حذف آلاینده ها، نیتراژ زدایی زیستی تقویت شده و برای توسعه فرآیندهای حذف آلاینده مقرون به صرفه مفید خواهد بود.

به عنوان سوبسترای محدودکننده، سرعت رشد و فعالیت نیتراژ زدایی زیستی میکروارگانیسم افزایش می یابد که با نتایج حاصل از این پژوهش هم خوانی دارد (۱۹). با بررسی غلظت های مختلف نانوذرات (۰/۵، ۱ و ۵ گرم/لیتر) و اندازه گیری میزان نیتراژ زدایی زیستی میکروارگانیسم مشخص شد غلظت مناسب نانوذرات Fe^0 -St و Fe^0 -CQD برابر ۰/۵ گرم/لیتر می باشد. در غلظت های بالاتر از ۰/۵ گرم/لیتر از نانوذرات، اثرات سمی حاصل از اکسیدهای فلزی نانوذرات بر سلول ایجاد می شود و رشد و فعالیت نیتراژ زدایی زیستی میکروارگانیسم را کاهش می دهد. یون های Fe^{2+} و هیدروژن در غلظت مناسب می توانند به عنوان منبع الکترون اضافه در اختیار میکروارگانیسم قرار گرفته و فرآیند نیتراژ زدایی زیستی را تسهیل بخشند. ازدیاد محصولات سمی حاصل از اکسیداسیون نانوذره Fe^0 -CQD سبب فروپاشی غشا میکروارگانیسم و ایجاد استرس اکسیداتیو می شود و از این طریق میکروارگانیسم را غیرفعال کرده و سبب کاهش فعالیت نیتراژ زدایی زیستی میکروارگانیسم می شود (۲۸).

در این پژوهش فعالیت نیتراژ زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوذره Fe^0 -CQD در بیوراکتور بستر متحرک حاوی محیط BSM و ۳۰۰ میلی-گرم/میلی لیتر نیتراژ و در pH ۷ مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج میزان رشد و فعالیت نیتراژ زدایی زیستی میکروارگانیسم در بیوراکتور در حضور Fe^0 -CQD برابر ۹۶/۷٪ به دست آمد. اختلاف نیتراژ زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوذرات فلزی در سامانه ناپیوسته و سامانه بیوراکتور نشان داد شرایط بهینه شامل غلظت اکسیژن حل شده (برابر با صفر)، دمای ۳۵ درجه سلسیوس و pH که از جمله عوامل مهم در افزایش نیتراژ زدایی زیستی می باشند، به خوبی در سامانه بیوراکتور بستر متحرک ایجاد شده است و رشد میکروارگانیسم تسهیل و فعالیت نیتراژ زدایی زیستی میکروارگانیسم تسریع گردید. به طور کلی، تیوباسیلوس دنیتریفیکانس به عنوان باکتری عملکردی در سیستم نیتراژ-زدایی مبتنی بر گوگرد شناسایی می شود. مسیر نیتراژ زدایی به طور کامل برای این باکتری با تجزیه و تحلیل ژنوم نشان

1. 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
2. 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.
8. Kamali M, Costa M.E.V, Otero-Irurueta G, Capela I, Capela I. Ultrasonic irradiation as a green production route for coupling crystallinity and high specific surface area in iron nanomaterials. *J. Clean. Prod*. 2019; 211:185-197.
9. 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.
11. 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.
13. 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 zero-valent 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 *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol*.2008; 42: 4927- 4933.
19. Navaee M, Yazdian F, Hamed 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 Pb²⁺ from aqueous solution: Reactivity, characterization and mechanism. *Water Res.* 2011;45: 3481-3488.
23. Montalvo S, Huiliner 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. Blaťková V, Trousil E, Sleřová 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, Wei 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, Jiabin 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.

