

Evaluation of Bionitrification Performance Using Nanophotocatalyst based Zinc and Titanium oxide in Bioreactor

Mohammadreza Ahmadiani Moghadam¹, Fatemeh Yazdian^{2*}, Hamid Rashedi³

1. Department of Environmental Engineering, Faculty of Environment, University of Tehran, Tehran, Iran

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

3. Department of Biotechnology, School of Chemical Engineering, College of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: The concentration of nitrate in natural surface waters from agricultural runoff is still a challenging problem in environmental chemistry. One of the promising strategies for denitrification is the use of photocatalysts whose light-centered excited states are able to reduce nitrate to nitrogen gas. The aim of this research is to optimize the nanophotocatalyst based on zinc oxide and titanium by response surface method (RSM) in order to investigate its role in biological denitrification.

Material and methods: The structural and morphological characteristics of the prepared nanophotocatalyst were determined by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscope (SEM), and X-ray diffraction (XRD). The photocatalytic effect of the prepared catalyst was investigated using nitrate solution and acid adsorbent at different concentrations. Two important operational parameters, including temperature (°C) and concentration of nanophotocatalyst carbon-quantum-dot/oxygen/titanium dioxide (CQDs/ZnO/TiO₂) which affect the denitrification of the bio-microorganism *Thiobacillus denitrificans* in the presence of nanophotocatalyst, were optimized by the response surface method (RSM). FTIR spectrum confirmed the formation of CQDs/ZnO/TiO₂ bonds.

Results: The average diameter of CQDs/ZnO/TiO₂ nanophotocatalyst was in the range of 29.31-38.32 nm. Denitrification in the presence of CQDs/ZnO/TiO₂ was achieved by increasing the temperature (38.5°C) and the nanophotocatalyst concentration (0.5 g/L) equal to 62.5%. After determining the optimal conditions, biological denitrification in the presence of nanophotocatalyst was investigated at different nitrate concentrations in the moving bed bioreactor. Based on the results, under batch conditions, the biological denitrification efficiency of *Thiobacillus denitrificans* in the presence of CQDs/ZnO/TiO₂ nanophotocatalyst was equal to 82.1%, while in the bioreactor, the biological denitrification efficiency of microorganisms in the presence of CQDs/ZnO/TiO₂ increased to 95%. In other words, the biological denitrification of microorganisms in the moving bed bioreactor was higher in the presence of CQDs/ZnO/TiO₂.

Conclusion: According to the results of this study, the CQDs/ZnO/TiO₂ nanophotocatalyst in the bioreactor showed higher efficiency in nitrate removal than the discontinuous system. Based on the results, the addition of Ti⁺⁴ and Zn⁺² metal nanoparticles will enhance biological denitrification and be useful for the development of cost-effective pollutant removal processes.

Keywords: CQDs/ZnO/TiO₂ nanophotocatalyst, Bionitrification, *Thiobacillus denitrificans*, Bioreactor.

Corresponding author:

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

Email: yazdian@ut.ac.ir

ارزیابی عملکرد نیتراژزادایی زیستی با استفاده از نانوفتوکاتالیست پایه روی و

تیتانیوم اکسید (II) در بیوراکتور

محمد رضا احمدیانی مقدم^۱، فاطمه یزدیان^{۲*}، حمید راشدی^۳

۱. گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده محیط زیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران

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

۳. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، پردیس فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: غلظت نیتراژ در آب‌های سطحی طبیعی توسط رواناب کشاورزی همچنان یک مشکل چالش‌برانگیز در شیمی محیطی است. یکی از استراتژی‌های امیدوارکننده نیتراژزادایی، استفاده از فوتوکاتالیست‌هایی است که حالت‌های برانگیخته نورمحور آن‌ها کاهش نیتراژ به گاز نیتروژن میسر می‌کنند. هدف از این پژوهش بهینه‌سازی نانوفتوکاتالیست پایه روی و تیتانیوم اکسید (II) توسط روش سطح پاسخ (RSM) به منظور بررسی نقش آن در نیتراژزادایی زیستی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: مشخصات ساختاری و مورفولوژیکی نانوفتوکاتالیست تهیه‌شده توسط طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و طیف‌سنجی پراش اشعه ایکس (XRD) مشخص شد. اثر فوتوکاتالیستی کاتالیزور تهیه‌شده با استفاده از محلول نیتراژ و جاذب اسید با غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. دو پارامتر عملیاتی مهم شامل دما (°C) و غلظت نانوفتوکاتالیست کربن کواتوم دات / اکسید روی / دی اکسید تیتانیوم (CQDs/ZnO/TiO₂) که بر نیتراژزادایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوفتوکاتالیست تأثیر می‌گذارند، توسط روش سطح پاسخ (RSM) بهینه شدند. طیف FTIR تشکیل پیوندهای CQDs/ZnO/TiO₂ را تأیید نمود.

یافته‌ها: میانگین قطر نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ در محدوده ۳۸/۳۲-۲۹/۳۱ نانومتر بود. نیتراژزادایی در حضور CQDs/ZnO/TiO₂ با افزایش دما (۳۸/۵°C) و غلظت نانوفتوکاتالیست (۰/۵ g/L) برابر ۶۲/۵٪ حاصل شد. پس از تعیین شرایط بهینه، نیتراژزادایی زیستی در حضور نانوفتوکاتالیست در غلظت‌های مختلف نیتراژ در بیوراکتور بستر متحرک مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، در شرایط ناپیوسته، کارایی نیتراژزادایی زیستی تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ برابر ۸۲/۱٪ بود، در حالی که در بیوراکتور، کارایی نیتراژزادایی زیستی میکروارگانیسم در حضور CQDs/ZnO/TiO₂ به ۹۵٪ افزایش یافت. به عبارت دیگر، نیتراژزادایی زیستی میکروارگانیسم در بیوراکتور بستر متحرک در حضور CQDs/ZnO/TiO₂ بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه، نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ در بیوراکتور نسبت به سیستم ناپیوسته کارایی بالاتری در حذف نیتراژ نشان داد. براساس یافته‌ها، با افزودن نانوذرات فلزی Zn²⁺ و Ti⁴⁺، نیتراژزادایی زیستی تقویت‌شده و برای توسعه فرآیندهای حذف آلاینده مقرون‌به‌صرفه و مفید خواهد بود.

واژگان کلیدی: نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂، نیتراژزادایی زیستی، تیوباسیلوس دنیتریفیکانس، بیوراکتور.

مقدمه

به حساب می‌آید (۱). یون نیتراژ از جمله مهم‌ترین آلاینده‌های منابع آب‌های زیرزمینی است و با توجه به حلالیت بالای آن، زدودن آن از آب آشامیدنی بسیار پرهزینه است. نیتراژ، علاوه بر چرخه طبیعی ازت در اثر ورود فاضلاب انسانی، مواد زائد شهری، صنعتی و همچنین

آب آشامیدنی ناسالم و با کیفیت پایین روی سلامت انسان تأثیرگذار است و یک عامل بسیار مهم در مرگ‌ومیر جوامع

نویسنده مسئول:

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین،

دانشگاه تهران، تهران، ایران

پست الکترونیکی: yazdian@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۰

اکسیداسیون پیشرفته به‌عنوان جایگزینی برای فرایندهای متداول تصفیه به‌کار می‌رود. این روش‌ها مبتنی بر تولید رادیکال‌های فعال مانند رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشند که قادرند گروه وسیعی از آلاینده‌های آلی را به‌سرعت اکسید کنند (۱۸). در میان فرایندهای اکسیداسیون پیشرفته، فتوکاتالیست‌های ناهمگن یک روش موفق برای تجزیه انواع آلاینده‌ها از جمله آلاینده‌های مقاوم و خطرناک به‌کار برده می‌شوند. کاربرد فرایندهای اکسیداسیون پیشرفته مانند روش‌های فوتون، الکتروفنتون و استفاده از فتوکاتالیزورها به‌ویژه نانوفتوکاتالیزورهای با سیستم ذره‌ای نیمه‌رسانا که منجر به تولید رادیکال‌های فعال در طی فرایند اکسیداسیون می‌گردد، باعث تخریب آلاینده‌ها می‌شوند. به‌تازگی فرایند فتوکاتالیست به‌عنوان یکی از راهکارهای زیست‌محیطی در کشورهای صنعتی جهان به‌کار می‌رود (۱۹). فتوکاتالیست ماده‌ای است که در اثر تابش نور بتواند منجر به بروز یک واکنش شیمیایی شود، درحالی‌که خود ماده دستخوش هیچ تغییری نشود. فتوکاتالیست‌ها فقط شرایط موردنیاز برای انجام واکنش‌های اکسایش و کاهش را فراهم می‌کنند (۲۰). نیتراژزدایی زیستی با احیای نیتراژ (توسط میکروارگانیسم‌های نیتراژزدا)، روشی مناسب برای حذف زیستی نیتراژ از منابع آبی می‌باشد. طی مسیر احیا، نیتراژ از طریق واکنش‌های احیا به گاز بی‌خطر نیتروژن تبدیل می‌شود (۲۱). در نیتراژزدایی زیستی، میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه باکتری‌ها نقش اصلی را در حذف نیتراژ از پساب به‌عهده دارند (۲۲). مزیت این سیستم‌ها عملکرد خوب میکروارگانیسم‌های نیتراژزدا برای حذف نیتراژ، هزینه پایین و سرعت بالای دنیتریفیکاسیون^۵ می‌باشد (۲۳، ۲۴). امروزه ترکیبات کاتالیستی مختلفی نظیر کادمیم سولفید (CdS)، روی اکسید (ZnO) و تیتانیوم دی‌اکسید (TiO₂)، اکسید آهن (III) (Fe₂O₃) (۲۵)، اکسید زیرکونیوم (ZrO₂) (۲۶)، نقره کلرید (AgCl) (۲۷) و کامپوزیت‌های آن‌ها به‌عنوان کاتالیست در تجزیه آلاینده‌های مختلف به‌خصوص نیتراژ مورد استفاده قرار می‌گیرند. فتوکاتالیست‌هایی چون ZnO و TiO₂ به‌دلیل پایداری در مقابل نور، هزینه کم، استفاده از نور خورشید به‌عنوان منبع نور، شرایط واکنش ملایم و فعالیت فتوشیمیایی بالا در محیط‌هایی با آلودگی کم به‌طور گسترده استفاده شده‌اند (۲۸). دی‌اکسید تیتانیوم (TiO₂) برای کاربردهای زیست‌محیطی بسیار مناسب است، زیرا از نظر بیولوژیکی و شیمیایی غیرفعال بوده، در برابر

فعالیت‌های کشاورزی وارد منابع آب‌وخاک شده و اثرهای نامطلوبی بر سلامتی مصرف‌کنندگان می‌گذارد (۲). افزایش غلظت نیتراژ در منابع آب در درجه اول ناشی از منابع انسانی مانند استفاده بیش از حد کودها در کشاورزی، فاضلاب خانگی و صنعتی، همچنین فضولات حیوانی است. غلظت بالای نیتراژ ممکن است باعث اتروفیکاسیون^۱ (مغذی شدن) منابع آب طبیعی مانند رودخانه‌ها و دریاچه‌ها شود (۳). همچنین افزایش آلودگی آب‌های سطحی و زیرزمینی به نیتراژ به‌دلیل تأثیر آن بر محیط‌زیست و سلامت انسان باعث نگرانی شده‌است (۴). آب آشامیدنی می‌تواند آسیب‌های مختلفی به سلامتی انسان به‌ویژه سرطان و متهموگلوبینمی^۲ (سندرم نوزاد آبی) وارد کند (۵). حد توصیه‌شده نیتراژ در آب آشامیدنی توسط WHO ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (به‌عنوان نیتراژ) یا ۱۱/۳ میلی‌گرم در لیتر (به‌عنوان نیتروژن) است (۶). نیتراژزدایی آب به‌دلیل حلالیت و پایداری بالای یون نیتراژ در آب یک چالش بزرگ است. بنابراین، تلاش زیاد جهت توسعه تکنیک‌هایی برای حذف نیتراژ از آب مانند تبادل یونی، جذب، اسمز معکوس، الکترودیالیز، الکتروشیمیایی، فوتوکاتالیز، روش‌های مبتنی بر غشا و روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی انجام شده‌است (۷-۱۱). چرخه نیتروژن (تبدیل نیتروژن به اشکال اکسیدشده و احیاشده) برای کشاورزی، انرژی و محیط‌زیست اهمیت اساسی دارد. محرک مهم اخیر این چرخه، تثبیت نیتروژن انسانی بوده که عمدتاً به سمت نیتریفیکاسیون^۳ خاک برای کشاورزی و کاربرد در سنتز شیمیایی و ذخیره انرژی هدایت می‌شود (۱۲-۱۴). تثبیت نیتروژن انسانی یک به‌هم‌ریختگی قابل‌توجه در چرخه نیتروژن است، که منجر به تخریب محیط‌زیست می‌شود. برای متعادل کردن چرخه نیتروژن، شناسایی یک استراتژی نیتروژن‌زدایی مصنوعی که می‌تواند در مقیاس بزرگ اجرا شود ضروری است. در طبیعت، نیتراژزدایی عمدتاً از طریق کاهش متوالی NO_x به N₂ در موجودات میکروبی انجام می‌شود (۱۵، ۱۶). روش‌های اخیر تصفیه آب فرایند نیتراژزدایی طبیعی را تکرار می‌کنند و از باکتری‌ها برای کاتالیز کردن مسیر انتقال الکترون چندمرحله‌ای برای تبدیل NO_x به N₂ استفاده می‌کنند (۱۷). فرایندهای متداول تصفیه از قبیل روش‌های فیزیکی و شیمیایی باعث انتقال آلاینده از فاز مایع به فاز دیگر، افزایش غلظت آن‌ها، در نتیجه تولید یک آلاینده جدید می‌شوند که نیاز به تصفیه بیشتری دارند. در سال‌های اخیر فرایندهای

⁴ Advanced Oxidation Process⁵ Denitrification¹ Eutrophication² Methemoglobinemia³ Nitrification

پیدا خواهد کرد. در مقیاس نانو نه تنها سطح ذرات افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابد، بلکه اثرهای دیگری روی خواص نوری و الکترومغناطیسی خواهد داشت. مطالعات نشان می‌دهند با کاهش اندازه ذره و افزایش پتانسیل اکسیداسیون - احیا، سرعت واکنش فتوکاتالیستی به طور چشمگیری افزایش می‌یابد. حتی در برخی شرایط، انرژی ساطع شده از هر منبع نوری در محیط می‌تواند به جای تابش اشعه ماوراءبنفش منبع انرژی مؤثری برای فتوکاتالیست باشد. فتوکاتالیست‌های نانو ساختار با خواص آب دوستی و قدرت کاتالیستی زیاد به علت سطح به حجم بالای آن‌ها یکی از فناوری‌های مهم در کنترل آلودگی‌های زیست محیطی می‌باشند. از این فناوری می‌توان در سیستم‌های تصفیه آب، پساب و هوا برای حذف آلاینده‌های مقاوم و خطرناک به نحو مطلوبی بهره برد (۳۳).

نقاط کوانتومی کربن^۱ (CQD) یک خانواده جذاب از نانوذرات کربنی تعریف می‌شوند که عمدتاً از کربن‌هایی با اندازه حدود ۱۰ نانومتر تشکیل شده‌اند (۳۴). خواص شگفت انگیز CQD مانند بی‌اثری شیمیایی، سمیت پایین، خواص فیزیکی و شیمیایی مختلف و ویژگی‌های مطلوب مانند زیست-سازگاری بسیار عالی نسبت به رنگ‌های آلی معمولی و نقاط کوانتومی نیمه هادی معدنی، فعالیت فلورسنت بالا، حلالیت آلی بالا، خواص نوری متمایز و هزینه ساخت کم، توجه تحقیقاتی جامعی را به خود جلب کرده‌اند (۳۵-۳۸). CQD در بسیاری از زمینه‌های تحقیقاتی در تشخیص مولکول‌های زیستی (۳۹)، سنجش عناصر فلزات سنگین (۴۰)، فرآیند فتوکاتالیستی (۴۱) حساس کننده دستگاه فتوالکتروکرومیک (۴۲) تصویربرداری زیستی، کاتالیز و تحویل زیست مولکول دارو استفاده شده است (۴۳، ۴۴). تیوباسیلوس دنیتریفیکانس، یک میکروارگانیسم میله‌ای، گرم منفی و متحرک است که نیتراژزایی اتوتروف انجام می‌دهد و می‌تواند طیف وسیعی از ترکیبات کاهش یافته گوگرد را برای به دست آوردن انرژی اکسید کند. از آنجایی که این میکروارگانیسم ترجیح به استفاده از اکسیژن به جای نیتراژ به عنوان یک گیرنده الکترون نهایی دارد، فقط تحت شرایط بی‌هوازی روش دنیتریفیکاسیون انتظار می‌رود (۴۵). از آنجاکه جهت نیتراژزایی نیاز به یک منبع کربن است، از نانوذرات و نانوفتوکاتالیست و اندازه‌های مختلف آن‌ها به منظور تأثیر آن‌ها روی رهاپس منبع کربنی استفاده می‌گردد. پژوهشگرانی همچون فان^۲ و همکاران مکانیسم حذف NO روی فتوکاتالیست CQDs@MIL-100(Fe) را مطالعه نمودند. فتوکاتالیست CQDs@MIL-100(Fe) عملکرد فتوکاتالیستی عالی، با حداکثر ۷۰٪ راندمان حذف

خوردگی شیمیایی و فوتوشیمیایی پایدار است، همچنین به دلیل پایداری در شرایط سخت محیطی، در دسترس بودن آن از نقطه نظر تجاری، فرم چندشکلی مختلف با فعالیت نوری بالا، امکان پوشش نازک روی بسترهای جامد نگهدارنده و سهولت کار در آزمایشگاه، یکی از بهترین فتوکاتالیست‌هایی است که می‌تواند در تجزیه نوری آلاینده‌های محیطی از جمله نیتراژ استفاده شود (۲۷). با وجود این، فتوکاتالیست مورد نظر به دلیل شکاف انرژی بزرگ، حساسیت پایین به نور مرئی و تابش خورشید دارد و تنها می‌تواند تحت تابش‌های با طول موج کمتر از ۳۸۰ نانومتر، خاصیت فتوکاتالیستی از خود نشان دهد. نانومواد با توجه به اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بالا، بسیار واکنش پذیر هستند و همین امر آن‌ها را قادر می‌سازد که به عنوان جاذب مورد استفاده قرار گیرند (۲۹). با ورود فناوری‌های نوین از قبیل روش‌های ترکیبی استفاده از میکروارگانیسم‌ها و نانو ساختارها، مواد و راه‌حل‌های جدید جهت تصفیه فاضلاب‌های صنعتی و کشاورزی و آب شرب ایجاد شده و سبب بهبود کیفیت فرآیندهای حذف آلاینده نیتراژ شده است (۳۰). استفاده از نانوفتوکاتالیست‌ها روشی بسیار مناسب برای حذف ترکیبات نامطلوب از محیط است، به طوری که علاوه بر حذف CO₂ از جو منجر به تولید ترکیبات مفیدی همچون CH₄، C₂H₆، HCHO و CH₃OH می‌شوند (۳۱). اخیراً فرآیند فتوکاتالیست هتروژن به عنوان یک تکنیک با کاربردهای زیاد، از قبیل حذف کامل آلاینده‌های آلی طی چند ساعت با توجه به تولید رادیکال‌هایی از جمله هیدروکسیل، ضد عفونی کردن آب، استریزه کردن ابزارهای جراحی، قابلیت سازگاری با سیستم فتوراکتورها با طراحی ویژه، تهیه شیشه‌های خود تمیز شونده و تبدیل آب به گاز هیدروژن مورد توجه قرار گرفته است. اساس فرآیندهای فتوکاتالیست هتروژن، تابش دهی یک فتوکاتالیست نیمه رسانا با نور ماوراءبنفش یا مرئی است (۳۲). دلیل جذابیت روش نانوفتوکاتالیستی عدم امکان حذف بسیاری از آلاینده‌ها به روش‌های مرسوم و متداول، امکان استفاده از اکسیژن اتمسفری به عنوان اکسیدکننده، انجام فرآیند تحت شرایط محیطی و امکان معدنی شدن کامل مواد آلی به آب و دی‌اکسید کربن می‌باشد. فرآیند حذف نانوفتوکاتالیستی به دلیل مزایای متعدد از جمله عدم حساسیت به سمی بودن آلاینده، به عنوان یکی از راهکارهای نوین و مؤثر از بین بردن آلاینده‌های شیمیایی و میکروبی در حال توسعه است. فناوری نانو با ایجاد رویکردی نوین در صنعت فتوکاتالیست، کاربرد گسترده‌ای در آینده

۱ میلی‌لیتر محلول به لوله حاوی Nitrate Reagent A منتقل و ۱۰ بار تکان داده شد. سپس با کیف Nitrate Reagent B به لوله آزمایش اضافه و تا ظهور رنگ زرد ۱۰ بار تکان داده شد. و در نهایت میزان غلظت نیترات به دست آمد (۵۱).

اندازه‌گیری رشد سلولی

جهت اندازه‌گیری رشد سلولی ۴ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری به ویال‌های ۴۰ میلی‌لیتر حاوی ۳۶ میلی‌لیتر محیط BSM منتقل شد. پتاسیم نیترات به‌عنوان منبع نیترات با غلظت ۳۰۰ mg/L به محیط BSM اضافه شد. محیط‌کشت در انکوباتور 37°C مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت همراه ویال شاهد بدون سلول باکتری گرماگذاری شد. نمونه‌گیری با فاصله ۶ ساعت انجام شد. میزان رشد میکروارگانیسم با اندازه‌گیری غلظت میکروارگانیسم برحسب ppm و اندازه‌گیری نیترات حذف‌شده در طول موج ۴۱۰ نانومتر انجام شد (۵۲).

NO را نشان داد (۴۶). همچنین اسدی و همکاران جهت حذف فوتوکاتالیستی یون نیترات از محلول‌های آبی، نانوجندساز کربن نیتريد گرافیتی/کائولن را تهیه کردند (۴۷). جهت نیترات‌زدایی زیستی از بیوراکتور نیز استفاده می‌گردد. مونتلوو و همکاران در بیوراکتور دمای 35°C ، با استفاده از جمعیت میکروارگانیسم‌های اتوتروف و هتروتروف تثبیت‌شده بر بستر ژئولیت ۹۵٪ نیترات‌زدایی مشاهده گردید (۴۸).

با توجه به اینکه امروزه استفاده از نانومواد در تصفیه آلاینده‌های محیط بسیار مورد توجه است، هدف از این تحقیق بررسی عملکرد نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ در حذف زیستی نیترات توسط میکروارگانیسم تیوباسیلوس-دنیتریفیکانس، بهینه‌سازی فرآیند نیترات‌زدایی توسط روش سطح پاسخ (RSM) و بررسی شرایط بهینه حذف در بیوراکتور است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس ATCC23644 استفاده شد. میکروارگانیسم یاد شده اتوتروف می‌باشد و به یک منبع گوگردی (سولفید هیدروژن، گوگرد عنصری یا تیوسولفات) به‌عنوان منبع انرژی نیازمند است. میکروارگانیسم مورد استفاده در پژوهش از مجموعه میکروبی DSMZ آلمان تهیه شد. برای کشت سویه باکتریایی تیوباسیلوس دنیتریفیکانس از محیط معدنی پایه استفاده شد.

جهت تعیین خصوصیات ساختاری و مورفولوژی نانوفتوکاتالیست، اندازه‌گیری متوسط سایز ذرات از دستگاه‌های Perkin Elmer Spectrum، 10.03.06 FT-IR، میکروسکوپ الکترونی روبشی 3200 KYKY-EM، اسپکتروفتومتر PG Instrument، دستگاه شیکر، انکوباتور مدل IKA و دستگاه سانتریفوژ مدل Sigma استفاده شد.

آزمون سنجش نیترات

در روش Chromotropic Acid جهت سنجش نیترات (۴۹)، در اثر واکنش Nitrate Reagent و Nitrate Reagent A با نیترات محلول زرد رنگ ایجاد و در طول موج ۴۱۰ نانومتر میزان جذب محلول حاصل اندازه‌گیری شد. به‌منظور سنجش نیترات نمونه‌ها، سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه از محیط‌کشت توسط سانتریفوژ در ۵۰۰۰ دور در دقیقه جداسازی شدند. پس از عبور از فیلتر و عملیات رقیق‌سازی،

تهیه کربن کوانتوم‌دات (CQDs) به روش هیدروترمال ابتدا مقدار ۲ گرم دی‌آمونیم هیدروژن فسفات به ۷۵ میلی‌لیتر آب اضافه و روی هم‌زن مغناطیسی قرار داده شد تا به‌صورت کامل حل شود. سپس در درون بمب هیدروترمال ریخته و بمب هیدروترمال را در 150°C به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شد و در نهایت کربن کوانتوم‌دات با غلظت ۲۶/۶۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

تهیه ZnO /CQDs

از کربن کوانتوم‌دات سنتز شده در مرحله قبل، ۳۰ میلی‌لیتر کربن کوانتوم‌دات با غلظت ۱۰ میلی‌گرم رقیق‌سازی شد و میزان ۷۵ میلی‌گرم ZnO اضافه نموده و در حمام آلتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد تا همگن شود، سپس میزان ۰/۰۱ گرم سدیم بورهیدرات اضافه نموده تا سطح کربن کوانتوم‌دات احیا شده و ZnO به سطح کربن کوانتوم‌دات متصل گردد. در حین واکنش گاز هیدروژن آزاد شد. در نهایت محلول کربن کوانتوم‌دات / ZnO با غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (۵۳).

تهیه نانوفتوکاتالیست TiO₂/ZnO/CQDs

در مرحله بعد مقدار ۷۵ میلی‌گرم TiO₂ به محلول اضافه نموده و به مدت ۳۰ دقیقه روی هم‌زن مغناطیسی قرار گرفت تا کاملاً حل شود و در نهایت محلول

جهت پوشش سطح میکروارگانیسم با نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂، ۴ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری در ویال‌های ۴۰ میلی‌لیتر به ۳۶ میلی‌لیتر محیط کشت BSM اضافه شد، نانوذرات جداگانه با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۱ و ۱/۱ به محیط اضافه شدند.

بهبودسازی آماری فرآیند نیترازدایی زیستی نانوفتوکاتالیست و میکروارگانیسم پوشش یافته در حضور نانوفتوکاتالیست

به منظور بهبودسازی آماری فعالیت نیترازدایی نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂، هم‌چنین فعالیت نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتوکاتالیست، دما (A) و غلظت نانوفتوکاتالیست (B) به عنوان دو متغیر تأثیرگذار در فعالیت نیترازدایی انتخاب شدند. جهت بهبودسازی دو عامل، نرم‌افزار روش پاسخ و به منظور غربال‌گری و ارزیابی شاخص‌های مهم در فعالیت نیترازدایی، نرم‌افزار Design-Expert برای طراحی آزمایش (DOE)^۱ مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش‌ها براساس طراحی آزمایش پلاکت برمن^۲ انجام شد. جهت طراحی آزمایش محدوده سطوح متغیرها پنج سطح انتخاب شدند (جدول ۱).

ZnO/TiO₂/CQDs با غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. جهت پودر کردن نمونه نیز از دستگاه فریز-درایر استفاده نموده بدین صورت که نمونه را ابتدا سانتریفیوژ کرده سپس در یخچال ۲۰°C- گذاشته تا فریز شود و سپس فریز-درایر می‌گردد.

مشخصه‌یابی نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂

بعد از سنتز نانوفتوکاتالیست، با استفاده از روش‌های تحلیلی مختلف، مشخصه‌یابی انجام شد. آزمون XRD برای نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ با دستگاه پراش پرتوی ایکس مدل PW 1730، تحت تابش Cu-Kα (λ=۱/۰۵۶۴۰۵۶ Å)، در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی‌آمپر انجام گرفت. تحلیل و بررسی نتایج این آزمون توسط نرم‌افزار XPERT high score plus نسخه 3.0.5 انجام شد. تأیید پیوند و برهمکنش بین کربن کوانتوم‌دات و نانوذرات ZnO و TiO₂ با دستگاه FT-IR Spectrophotometer (BRUKRE آلمان) در محدوده ۴۰۰-۴۰۰۰ cm^{-۱} انجام شد.

پوشش سطح میکروارگانیسم با نانوفتوکاتالیست فلزی

جدول ۱- سطوح متغیرها در بهبودسازی آماری فرآیند نیترازدایی نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ و فعالیت نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم پوشش یافته با نانوفتوکاتالیست

علامت	متغیر	سطح		
		پایین (-)	مرکزی (۰)	بالا (+)
A	دما (C)	۲۵	۳۰	۳۵
	غلظت			۳۸/۵
B	نانوفتوکاتالیست (g/L)	۰/۰۵	۰/۵	۱
				۱/۱

بررسی فرآیند نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم میکروارگانیسم در محیط BSM با غلظت ۳۰۰ mg/L نیترازدایی به مدت ۴۸ ساعت در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۳۸/۵ درجه سانتیگراد انجام شد. به منظور ارزیابی اثر دما در نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم، نمونه‌گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج بررسی شد.

آزمایش در ویال‌های ۴۰ میلی‌لیتر حاوی ۳۶ میلی‌لیتر محیط کشت انجام شد. محیط‌های کشت حاوی غلظت ۳۰۰ mg/L نیترازدایی ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰°C^۱ استرون شدند. نانوفتوکاتالیست جداگانه به محیط کشت اضافه و میزان حذف نیترازدایی بررسی گردید. پس از تلقیح میکروارگانیسم و نانوفتوکاتالیست تحت شرایط استرون، فلاسک‌ها در دمای ۳۰°C^۱ مدت ۲۵، ۳۵ و ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفته و فعالیت نیترازدایی زیستی ارزیابی شد.

^۱ Design of experiments

^۲ Plackett Burman

نانوفتوکاتالیست $CQDs/ZnO/TiO_2$ ، میکروارگانسیم در بیوراکتور با حجم ۱۵ میلی‌لیتر حاوی ۱۲ میلی‌لیتر محیط کشت BSM (سترون در اتوکلاو) $121^\circ C$ به مدت ۱۵ دقیقه) به مدت ۴۸ ساعت با فیلتر تحت جریان گاز نیتروژن جهت خروج اکسیژن و ایجاد شرایط بی‌هوازی قرار گرفت و در شرایط مشابه ویال، کشت داده شد. مایع تلقیح و ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون نانوفتوکاتالیست جداگانه به محیط کشت افزوده شدند. بیوراکتور در دمای $35^\circ C$ و pH ۷ تنظیم شد. جهت بررسی رشد و فعالیت نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانسیم، نمونه‌گیری هر ۴ ساعت تا ۵۲ ساعت انجام شد.

تحلیل آماری

جهت مقایسه اختلاف معنی‌دار مقادیر به دست آمده بین گروه‌های مطالعه، آزمون آماری One-way ANOVA در سطح آماری ۰/۰۵٪ انجام شد. مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS22 مورد تجزیه آماری قرار گرفت.

نتایج

تعیین خصوصیات مورفولوژی و بیوشیم یایی

میکروارگانسیم

ویژگی‌های عمومی، مورفولوژی و بیوشیمیایی میکروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در جدول ۲ خلاصه شده است.

بررسی فرآیند نیترات‌زدایی نانوفتوکاتالیست

$CQDs/ZnO/TiO_2$

نانوفتوکاتالیست $CQDs/ZnO/TiO_2$ در محیط BSM با غلظت نیترات ۳۰۰ ppm، در پنج غلظت ۰/۰۱ g/L، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۱/۱ از نانوفتوکاتالیست در دماهای $25^\circ C$ ، $30^\circ C$ ، $35^\circ C$ و $38/5^\circ C$ به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور گرماگذاری شدند. به منظور بررسی اثر غلظت نانوفتوکاتالیست و دما بر میزان نیترات‌زدایی نانوفتوکاتالیست، نمونه‌گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج بررسی شد.

بررسی فرآیند نیترات‌زدایی زیستی

میکروارگانسیم پوشش‌یافته با

$CQDs/ZnO/TiO_2$ نانوفتوکاتالیست

میکروارگانسیم‌های پوشش‌یافته با $CQDs/ZnO/TiO_2$ در محیط BSM با غلظت ۳۰۰ mg/L نیترات به مدت ۴۸ ساعت در غلظت‌های ۰/۰۱ g/L، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱/۱ از نانوفتوکاتالیست در دماهای $25^\circ C$ ، $30^\circ C$ ، $35^\circ C$ و $38/5^\circ C$ گرماگذاری شدند. جهت بررسی اثر دما و غلظت نانوفتوکاتالیست بر میزان نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانسیم پوشش‌یافته با $CQDs/ZnO/TiO_2$ ، نمونه‌گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج با کیت نیترات بررسی شد.

بررسی فرآیند نیترات‌زدایی زیستی در بیوراکتور در

حضور نانوفتوکاتالیست $CQDs/ZnO/TiO_2$

پس از بررسی رشد و فعالیت نیترات‌زدایی میکروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در ویال ۴۰ میلی‌لیتر با ۳۶ میلی‌لیتر محیط کشت BSM در حضور و عدم حضور

جدول ۲- خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی میکروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس

رنگ	قهوه‌ای
شکل سلول	باسیل
ویژگی‌های کلنی	میله ای شکل کوتاه
اندازه کلنی	0.5×1-3µm
تشکیل هاگ	-
واکنش گرم	-

به Ti است و حضور TiO_2 را در نانوکامپوزیت تأیید می‌کند. به‌طور کلی حضور پیک در محدوده $450-800\text{ cm}^{-1}$ به ارتعاشات کشش باند O-Ti اختصاص دارد. پیک موجود در $1315/97\text{ cm}^{-1}$ تقریباً روی خط زمینه پیک است و پیک خاصی نیست. پیک قوی در $1633/97\text{ cm}^{-1}$ مشاهده شده مربوط به ارتعاش کششی TiO_4-Zn_2 می‌باشد. پیک موجود در $3429/68\text{ cm}^{-1}$ پیک نسبتاً پهن و مربوط به گروه عاملی OH- آب و ارتعاشات این گروه است و با توجه به اندازه پیک، مربوط به رطوبت جذب شده توسط نمونه می‌باشد. طیف FTIR به‌دست آمده، تشکیل پیوند CQD- ZnO و TiO_2 را تأیید نمود.

الگوی پراش پرتوی ایکس (XRD)

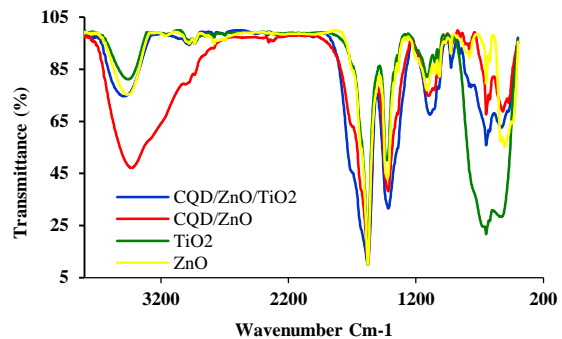
طیف پراش پرتوی ایکس نانوفتوکاتالیست ZnO و TiO_2 ، $CQDs/ZnO$ و نانوذرات $CQDs/ZnO/TiO_2$ در شکل ۲ آورده شده است. پیک‌های موجود در زوایای 30° ، 35° ، $46/5^\circ$ ، $56/5^\circ$ ، $64/4^\circ$ ، $69/5^\circ$ به ترتیب با سطوح کریستالی 100 ، 002 ، 110 ، 103 ، 112 و 201 مربوط به نانوذرات ZnO هم‌خوانی دارد. پیک‌های موجود در زوایای $25/5^\circ$ ، 38° ، $48/5^\circ$ ، 54° ، $69/5^\circ$ ، 77° ، $2\theta = 20^\circ$ دیده می‌شود که به ترتیب با سطوح کریستالی 101 ، 004 ، 200 ، 105 ، 204 ، 116 و 301 نانوذرات TiO_2 هم‌خوانی دارد. بنابراین نانوذرات ZnO و TiO_2 در نمونه نانوفتوکاتالیست تأیید شد. پیک پهن در نواحی $2\theta = 22/57^\circ$ ، $2\theta = 22/87^\circ$ و $2\theta = 23/25^\circ$ مشاهده می‌شود، مطابق پژوهش‌های گوپتا (۵۴) پیک‌ها در نواحی $2\theta = 22^\circ$ نشان دهنده CQD در نانوذره است. در نتیجه ساختار نانوذره CQD مورد تأیید است (۵۵). پیک‌های شاخص طیف پراش اشعه ایکس نانوذرات CQD- TiO_2 در نواحی $2\theta = 21/61^\circ$ ، $2\theta = 22/01^\circ$ ، $2\theta = 26/46^\circ$ ، $2\theta = 28/33^\circ$ و $2\theta = 29/21^\circ$ دیده می‌شوند، که نشان‌دهنده ترکیب CQD در نانوذرات می‌باشد. نتایج نشان می‌دهند که با افزودن نانوذرات ZnO و CQD از بلورینگی نانوذرات TiO_2 کاسته شده است (شکل ۲).

مشخصه‌یابی نانوفتوکاتالیست $CQDs/ZnO/TiO_2$

نانوفتوکاتالیست $CQDs/ZnO/TiO_2$ پس از سنتز، توسط روش‌های طیف FTIR، پراش اشعه ایکس XRD و بررسی مورفولوژی مشخصه‌یابی شد.

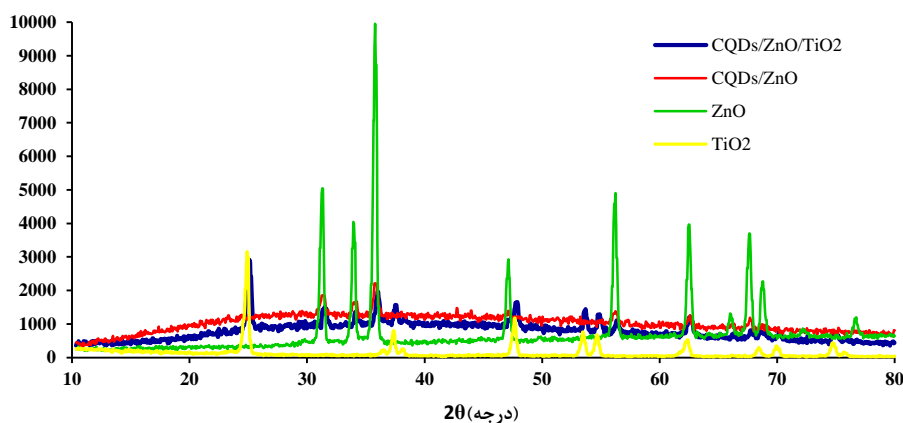
طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)

آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز (BRUKRE آلمان) به‌منظور حصول اطمینان از پیوند بین نانوذرات اکسید تیتانیوم و اکسید روی، تعیین برهم‌کنش بین کربن کوانتوم‌دات و نانوذرات روی و تیتانیوم اکسید (II) استفاده شد. در این روش، نمونه با استفاده از اسپکتروفتومتر در محدوده طول موج $4000-400\text{ cm}^{-1}$ مشخصه‌یابی شد.



شکل ۱- طیف FTIR نانوفتوکاتالیست $CQDs/ZnO/TiO_2$ و نانوذرات ZnO و TiO_2 ، $CQDs/ZnO$

در طیف FTIR $CQDs/ZnO/TiO_2$ چندین پیک مشاهده شد که طیف‌های مربوط به گروه‌های عاملی CQD موجود بر سطح نانوذرات می‌باشند. براساس شکل ۱، پیک در محدوده 3412 cm^{-1} به ارتعاشات کششی گروه O-H اشاره دارد. پیک در ناحیه 2050 cm^{-1} می‌تواند مربوط به پیوند کششی N=C باشد، نوار جذبی در 1665 cm^{-1} به ارتعاشات کششی گروه‌های C=O و C=C کربن کوانتوم‌دات نسبت داده می‌شود. پیک در 1556 cm^{-1} به ارتعاش کششی NH اشاره دارد. پیک در 1394 cm^{-1} به پیوند C=C و در 1155 cm^{-1} به ارتعاش کششی پیوند C-O-C اشاره دارد. پیک موجود در 772 cm^{-1} مربوط به گروه‌های C-H و N-H موجود در آلکن و آمین می‌باشد. نوار جذبی در 671 cm^{-1} به C-H اشاره دارد. پیک قوی در $581/71\text{ cm}^{-1}$ مربوط

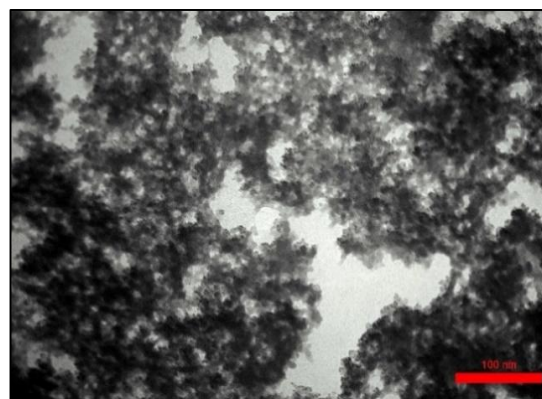


شکل ۲- طیف XRD نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ و نانوذرات CQDs/ZnO، TiO₂ و ZnO

در تصویر نشان داده شده به علت سبکی، نرمی و ابعاد نانومتری ذرات TiO₂ سنتز شده، چسبندگی و آگلومره شدن مشاهده می‌شود، و همچنین با افزودن نانوذرات ZnO از یکنواختی نانوفتوکاتالیست کاسته می‌گردد.

مورفولوژی نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂
مورفولوژی نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ توسط تصویر SEM تعیین گردید (شکل ۳ الف و ب). همان‌طور که

۱۱۵



شکل ۳- الف و ب. تصاویر (SEM) نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ در دو بزرگ‌نمایی مختلف

۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۳۸/۵ در انکوباتور قرار داده شد. به منظور ارزیابی اثر دما در نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم، نمونه‌گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج بررسی شد (جدول ۳).

بررسی میزان حذف نیترات توسط میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس
میکروارگانیسم در محیط BSM با غلظت ۳۰۰ mg/L نیترات و pH ۷ به مدت ۴۸ ساعت در دماهای ۲۱/۵ °C،

جدول ۳- بهینه‌سازی عوامل برای نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ در حذف نیترات

آزمایش	دما (C)	غلظت نانوفتوکاتالیست (g/L)	درصد حذف نیترات (%)
۱	-۱	-۱	۵
۲	۱	-۱	۱۴/۲
۳	-۱	۱	۳۱/۷
۴	۱	۱	۶۲/۵
۵	-۱/۴۱	۰	۱۲
۶	۱/۴۱	۰	۴۳
۷	۰	-۱/۴۱	۱۶
۸	۰	۱/۴۱	۵۱/۱
۹	۰	۰	۲۳
۱۰	۰	۰	۲۳
۱۱	۰	۰	۲۳
۱۲	۰	۰	۲۳
۱۳	۰	۰	۲۳

نیترات است. جدول ۴ نیز پاسخ R₁ نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ را نشان می‌دهد. در نرم‌افزار سطح پاسخ، p < ۰/۰۵ به‌عنوان سطح اطمینان از مؤثر بودن ضریب در نظر گرفته می‌شود. با توجه به جدول ۴، مقدار p-value برای ترم‌های دما (A) و غلظت نانوفتوکاتالیست (B) کمتر از ۰/۰۵ است، لذا این ترم‌ها برای نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ هم‌چنین برهم‌کنش پارامترهای A و B، بر درصد حذف نیترات (پاسخ R₁)، اثرگذار هستند. معادله نهایی فعالیت نیترات‌زدایی نانوذرات با عبارت‌های کد شده، برای نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ مطابق رابطه ۱ می‌باشد:

$$R_1 = +23.00 + 10.79A + 15.89B + 6.02AB + 1.86A^2 + 4.89B^2 \quad (\text{رابطه ۱})$$

همچنین شرایط بهینه پاسخ R₁ برای نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ در جدول ۵ ارائه شده‌است.

بهینه‌سازی آماری شاخص‌های عملیاتی مؤثر در افزایش نیترات‌زدایی نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

دو متغیر A معرف دما (C) و B معرف غلظت نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ برای بهینه‌سازی فعالیت نیترات‌زدایی نانوفتوکاتالیست در محیط کشت BSM با غلظت ۳۰۰ mg/L نیترات و pH ۷ در نظر گرفته شد. بهینه‌سازی این دو عامل توسط روش سطح پاسخ انجام شد. پاسخ R₁ برای بررسی درصد حذف نیترات می‌باشد. آزمایش‌ها برای نمونه شاهد (بدون حضور نانوفتوکاتالیست) 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 نانوفتوکاتالیست (جدول ۳) مشخص شد. پاسخ R₁ مربوط به درصد حذف

جدول ۴- شاخص‌های نرم‌افزاری بهینه‌سازی فعالیت نیترازدایی نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂

عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی	مربع میانگین	F value	p-value Probe> F	R-
	۳۲۷۴/۳۷	۵	۶۵۴/۸۷	۴۴/۹۲	<۰/۰۰۰۱	
A-A	۹۳۱/۸۴	۱	۹۳۱/۸۴	۶۳/۹۱	<۰/۰۰۰۱	
B-B	۲۰۲۰/۵۴	۱	۲۰۲۰/۵۴	۱۳۸/۵۸	<۰/۰۰۰۱	
AB	۱۴۵/۲۰	۱	۱۴۵/۲۰	۹/۹۶	۰/۰۱۶۰	
A ²	۲۴/۱۳	۱	۲۴/۱۳	۱/۶۶	۰/۲۳۹۲	
B ²	۱۶۶/۱۸	۱	۱۶۶/۱۸	۱۱/۴۰	۰/۰۱۱۸	

Squared = ۰/۹۶۹۸

جدول ۵- شرایط بهینه پاسخ R₁ برای نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ (حجم ۱۰۰ میلی لیتر)

A (°C)	B (g/L)	R ₁	نانوفتوکاتالیست
۱/۰۰	۱/۰۰	۶۲/۴۵۹۹	CQDs/ZnO/TiO ₂

(A) و غلظت نانوفتوکاتالیست (B) (g/L) در نظر گرفته شد. برای تحلیل بهتر مدل متغیر (R₂) R-Square ارائه می‌شود. پاسخ R₂ بررسی درصد حذف نیترازدایی توسط میکروارگانیزم در حضور نانوفتوکاتالیست است. جدول ۶ بهینه‌سازی عوامل مورد نظر برای میکروارگانیزم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ را نشان می‌دهد.

آنالیز داده‌ها به روش RSM برای میکروارگانیزم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂

شاخص‌های نرم‌افزاری بهینه‌سازی افزایش نیترازدایی زیستی میکروارگانیزم در حضور نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ در جدول ۷ نشان داده شده است.

همان‌طور که مشاهده می‌شود، حذف غیرزیستی توسط نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ برابر ۶۲/۴۵۹۹٪ نیترازدایی در ۳۵ و ۵٪ در دمای ۲۵^{°C} طی ۴۸ ساعت مشاهده شد (جدول ۵). نتایج به وضوح نشان می‌دهند که احیای غیرزیستی به شدت تحت تأثیر درجه حرارت بوده و در دماهای بالاتر با سرعت بیشتر انجام می‌شود.

بهینه‌سازی آماری شاخص‌های عملیاتی موثر در افزایش نیترازدایی زیستی میکروارگانیزم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂

جهت بهینه‌سازی فعالیت نیترازدایی زیستی میکروارگانیزم در حضور نانوفتوکاتالیست در محیط کشت BSM با غلظت نیترازدایی ۳۰۰ mg/L و pH ۷، دو عامل دما (°C)

جدول ۶- بهینه‌سازی عوامل برای میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂

حذف نیترات	غلظت	دما	آزمایش
(%)	نانوفتوکاتالیست	(°C)	
)	(g/L)		
(CQDs/ZnO/TiO ₂)			
۲۱	-۱	-۱	۱
۴۶/۸	۱	-۱	۲
۳۰	-۱	۱	۳
۶۷/۸	۱	۱	۴
۴۰/۱	-۱/۴۱	۰	۵
۸۲/۱	۱/۴۱	۰	۶
۴۵/۱	۰	-۱/۴۱	۷
۶۷/۹	۰	۱/۴۱	۸
۶۸/۱	۰	۰	۹
۶۹	۰	۰	۱۰
۶۹	۰	۰	۱۱
۶۹	۰	۰	۱۲
۶۹	۰	۰	۱۳

جدول ۷- شاخص‌های نرم‌افزاری بهینه‌سازی افزایش نیترات‌زدایی زیستی تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور CQDs/ZnO/TiO₂

عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی	مربع میانگین	F value	p-value Probe> F
	۳۴۵۸/۲۶	۵	۶۹۱/۶۵	۸/۲۸	۰/۰۰۷۵
A-A	۱۸۲۲/۰۹	۱	۱۸۲۲/۰۹	۲۱/۸۲	۰/۰۰۲۳
B-B	۴۸۴/۲۹	۱	۴۸۴/۲۹	۵/۸۰	۰/۰۴۶۹
AB	۳۶/۰۰	۱	۳۶/۰۰	۰/۴۳	۰/۵۳۲۴
A ²	۵۰۳/۷۹	۱	۵۰۳/۷۹	۶/۰۳	۰/۰۴۳۷
B ²	۷۵۳/۸۷	۱	۷۵۳/۸۷	۹/۰۳	۰/۰۱۹۸

R-Squared = ۰/۸۵۵۴

بهینه‌سازی فعالیت نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ با عبارت‌های کد شده، مطابق رابطه ۲ می‌باشد:

$$R_1 = +68.82 + 15.09A + 7.78B + 3.00AB - 8.51A^2 - 10.41B^2 \quad (\text{رابطه } 2)$$

شرایط بهینه‌سازی پاسخ R₂ برای میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ در جدول ۸ ارائه شد.

به‌طور معمول R₂ بزرگتر از ۰/۷، بیانگر ضریب همبستگی نسبتاً خوب بوده و هرچه قدر این ضریب به یک نزدیک‌تر باشد، انطباق داده‌های تجربی و مدل حاصل از رگرسیون بیشتر و مدل از دقت بالاتری برخوردار است. p-value < ۰/۰۵ به‌عنوان سطح اطمینان از مؤثر بودن ضریب در نظر گرفته شده‌است. بر اساس نتایج جدول ۸، مقدار p-value برای ترم‌های دما (A) و غلظت نانوفتوکاتالیست (B) کمتر از ۰/۰۵ است، لذا شرایط بهینه بر درصد حذف نیترات (پاسخ R₂)، تحت تأثیر پارامترهای A و B، برای میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوفتوکاتالیست می‌باشد. معادله نهایی جهت

جدول ۸- شرایط بهینه پاسخ R₂ برای میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂

غلظت نانوفتوکاتالیست (gr)	دما (°C)	R ₂	نانوفتوکاتالیست
۰/۵۱	۰/۹۸	۷۸/۱۹۷۱	CQDs/ZnO/TiO ₂ 2

افزایش دما سبب افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و افزایش فعالیت نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم می‌گردد.

همان‌طور که نتایج جدول ۸ نشان می‌دهند، در شرایط بهینه، میکروارگانیسم در حضور CQDs/ZnO/TiO₂ به میزان ۷۸/۱۹۷۱٪ نیترات‌زدایی زیستی دارد. در پژوهش اخیر، احیای زیستی نیترات در حضور نانوفتوکاتالیست تحت تأثیر دما می‌باشد.

مقایسه نیترات‌زدایی نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ و نیترات‌زدایی زیستی

میکروارگانیسم در حضور CQDs/ZnO/TiO₂

پس از بررسی میزان نیترات‌زدایی نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂، هم‌چنین نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتوکاتالیست، نتایج حذف و درصد اختلاف در میزان نیترات حذف شده در جدول ۹ ارائه شده است. در جدول ۹ حذف ۸۲/۱٪ نیترات طی ۴۸ ساعت در نمونه حاوی CQDs/ZnO/TiO₂ و میکروارگانیسم مشاهده شد. مقدار ۶۲/۵٪ از مقدار اولیه نیترات طی ۴۸ ساعت در نمونه حاوی نانوفتوکاتالیست حذف شد. در نمونه‌های کنترل حاوی محیط کشت، حذف قابل ملاحظه از نیترات مشاهده نشد. نتایج آماری اختلاف معنی‌داری (P<۰/۱) را نشان می‌دهند، به طوری که بهترین شرایط مربوط به نمونه‌های حاوی نانوفتوکاتالیست و میکروارگانیسم است. در این پژوهش نیترات‌زدایی اتوتروفیک با یون‌های Ti⁴⁺ و Zn²⁺ تولید شده توسط نانوفتوکاتالیست، قادر به کاهش نیترات می‌باشد.

جدول ۹- مقایسه نیترازدایی نانوفتوکاتالیست و نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتوکاتالیست

اختلاف حذف (%)	نیترازدایی زیستی در حضور نانوفتوکاتالیست (%)	نیترازدایی نانوفتوکاتالیست (%)	غلظت نانوفتوکاتالیست (g/L)	دما (°C)	آزمایش
۱۶	۲۱	۵	۰/۰۵	۲۵	۱
۳۲/۶	۴۶/۸	۱۴/۲	۰/۰۵	۳۵	۲
۱/۷	۳۰	۳۱/۷	۱	۲۵	۳
۵/۳	۶۷/۸	۶۲/۵	۱	۳۵	۴
۲۸/۱	۴۰/۱	۱۲	۰/۵	۱۲/۵	۵
۳۷/۵	۸۲/۱	۴۳	۰/۵	۴۲/۵	۶
۲۹/۱	۴۵/۱	۱۶	۰/۰۱	۳۰	۷
۱۶/۸	۶۷/۹	۵۱/۱	۱/۱	۳۰	۸
۴۵/۱	۶۸/۱	۲۳	۰/۵	۳۰	۹
۴۶	۶۹	۲۳	۰/۵	۳۰	۱۰
۴۶	۶۹	۲۳	۰/۵	۳۰	۱۱
۴۶	۶۹	۲۳	۰/۵	۳۰	۱۲
۴۶	۶۹	۲۳	۰/۵	۳۰	۱۳

الکترون، جریان گاز نیتروژن توسط کپسول نیتروژن ۴۸ ساعت ایجاد شد. طی انجام نیترازدایی در بیوراکتور به‌منظور ایجاد pH ۷، اسید و باز اتوکلاو شده وارد سامانه و pH سامانه کامل کنترل گردید. در شرایط ناپیوسته نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتوکاتالیست در بهترین شرایط پس از ۴۸ ساعت برابر ۸۲/۱٪ حاصل شد. در سامانه بیوراکتور نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتوکاتالیست، تسریع شد و پس از ۴۴ ساعت نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور CQDs/ZnO/TiO₂ ۹۵٪ می‌باشد و پس از ۴۸ ساعت نیترازدایی زیستی افزایش یافت و به ۹۶٪ رسید.

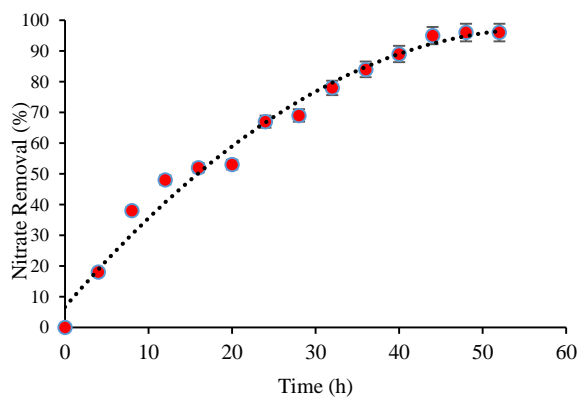
بررسی فرآیند نیترازدایی زیستی در بیوراکتور در حضور نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂

نتایج نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ در بیوراکتور در جدول ۱۰ و میزان حذف نیترازدایی توسط میکروارگانیسم در حضور نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO₂ در بیوراکتور در زمان‌های مختلف در نمودار ۱ نشان داده شده‌است. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهند، نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور CQDs/ZnO/TiO₂ در بیوراکتور کارایی بالاتری در حذف نیترازدایی دارد. در بیوراکتور جهت ایجاد شرایط بی‌هوازی به‌منظور اکسایش نانوفتوکاتالیست و تولید

جدول ۱۰- نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوفتوکاتالیست $CQDs/ZnO/TiO_2$ در بیوراکتور

نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور $CQDs/ZnO/TiO_2$ نانوفتوکاتالیست (%)	زمان (ساعت)	آزمایش
۰٪	۰	۱
۱۸	۴	۲
۳۸	۸	۳
۴۸/۹	۱۲	۴
۵۲/۱	۱۶	۵
۵۳/۴	۲۰	۶
۶۷/۱	۲۴	۷
۶۹	۲۸	۸
۷۸	۳۲	۹
۸۴/۱	۳۶	۱۰
۸۹	۴۰	۱۱
۹۵	۴۴	۱۲
۹۶	۴۸	۱۳
۹۶	۵۲	۱۴

نمودار ۱- نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتوکاتالیست $CQDs/ZnO/TiO_2$ در بیوراکتور



پیشنهاد شده که بسیاری از محدودیت‌های نیترات زدایی زیستی را برطرف نموده و سبب افزایش نیترات زدایی زیستی می‌گردد (۵۷). فرآیندهای فتوکاتالیستی به دلیل اکسیداسیون کامل، عدم تشکیل متابولیت‌های چند سیکله و در دسترس بودن کاتالیست‌ها از قابلیت بالایی برای حذف نیترات برخوردار هستند (۵۶). تیت-سانیم دی‌اکسید

بحث

نیترات به دلیل حلالیت بسیار بالای آن به آسانی به درون خاک و آب‌های زیرزمینی نفوذ می‌کند. آب‌های سطحی مانند دریاچه‌ها، مخازن و رودخانه‌ها در معرض آلودگی با نیترات هستند (۵۶). حذف نیترات در فرآیندهای زیستی بازده پایین داشته، به همین دلیل استفاده از نانوذرات فلزی

نانوفتو کاتالیست CQDs/ZnO/TiO_2 در بیوراکتور حاوی محیط BSM و 300 mg/L نیترات و 7 pH بررسی گردید. نتایج مشخص می‌کند نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتو کاتالیست در بیوراکتور کارایی بالاتری در حذف نیترات دارد. در شرایط ناپیوسته نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتو کاتالیست در بهترین شرایط پس از ۴۸ ساعت برابر $1/82\%$ حاصل شد. در سامانه بیوراکتور نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتو کاتالیست، تسریع شد. طبق نتایج، پس از ۴۴ ساعت میزان نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور CQDs/ZnO/TiO_2 95% بود و پس از ۴۸ ساعت افزایش یافت و به 96% رسید. در این راستا اکرامی و همکاران نیز عملکرد نانوساختارهای گرافنی پایه آلومینیوم rGO/Al و کلسیم rGO/Ca را جهت فعالیت نیترات‌زدایی زیستی تیوباسیلوس دنیتریفیکانس بررسی نمودند، نتایج نشان دادند که نیترات‌زدایی زیستی این میکروارگانیسم در حضور نانو ساختارهای rGO/Al و rGO/Ca به ترتیب میزان $76/69\%$ و $85/26\%$ حاصل شد. درصد نیترات‌زدایی زیستی در حضور rGO/Al نسبت به rGO/Ca بیشتر بوده و در حضور rGO/Al میزان 98% حاصل شد، بنابراین این نانو ساختار در بیوراکتور کارایی بالاتری در حذف نیترات نشان داد (60). در مطالعه Hmadi و همکاران سنتز و بهینه سازی نانوذرات Fe^0 پوشیده شده با نشاسته (St-Fe^0) و کربن کوانتوم‌دات (CQD-Fe^0) به منظور بررسی نقش آن‌ها در نیترات‌زدایی زیستی و بررسی بیان ژن‌های narH و recA ارزیابی گردید. براساس نتایج در شرایط ناپیوسته نیترات‌زدایی زیستی نانوذرات St-Fe^0 برابر $80/10\%$ و نانوذرات CQD-Fe^0 برابر $79/83\%$ حاصل شد. در حالی که در بیوراکتور کارایی نیترات‌زدایی زیستی در حضور St-Fe^0 به $94/07\%$ و CQD-Fe^0 به 95% افزایش یافت. به عبارتی نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم در بیوراکتور بستر متحرک در حضور CQD-Fe^0 نسبت به St-Fe^0 بیشتر بود (61). در مطالعه اخیر اختلاف نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتو کاتالیست CQDs/ZnO/TiO_2 در ارلن و بیوراکتور نشان داد، شرایط بهینه (غلظت اکسیژن حل شده (صفر)، دمای 35°C و 7 pH)، به خوبی در بیوراکتور ایجاد شده و رشد میکروارگانیسم تسهیل یافته و فعالیت نیترات‌زدایی زیستی تسریع گردید.

فوتوکاتالیستی است که به دلیل بی‌اثر بودن بیولوژیکی و شیمیایی، عدم سمیت، ارزان بودن، پایداری خوب در محیط آبی و کاربرد ایمن و بی‌خطر نسبت به سایر فوتوکاتالیست‌ها، کاربرد زیست‌محیطی بسیار گسترده دارد (58). در پژوهش حاضر دو پارامتر دما ($^\circ\text{C}$) (A) و غلظت نانوفتو کاتالیست CQDs/ZnO/TiO_2 از پارامترهای تأثیرگذار بر فعالیت نیترات‌زدایی می‌باشند. جهت بهینه‌سازی غلظت نانوفتو کاتالیست پنج سطح، مقدار کمینه (کد ۱- $0/05 \text{ g/L}$)، مقدار بیشینه (کد $1/01 \text{ g/L}$)، حد وسط این دو (کد صفر) $0/05 \text{ g/L}$ (کد $1/41$) و $0/01 \text{ g/L}$ (کد $1/41$) در نظر گرفته شد. برای این دو پارامتر، توسط نرم‌افزار Design-expert، 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 نانوفتو کاتالیست CQDs/ZnO/TiO_2 با افزایش پارامتر A (دما $^\circ\text{C}$) به سمت مقدار بیشینه ($38/5^\circ\text{C}$) و افزایش پارامتر B به سمت بیشینه (1 g/L) مقدار کاهش نیترات $62/5\%$ حاصل شد. در نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوفتو کاتالیست CQDs/ZnO/TiO_2 ، با افزایش پارامتر A (دما $^\circ\text{C}$) به سمت بیشینه $38/5^\circ\text{C}$ و تغییر پارامتر B به سمت کد مرکزی ($0/5 \text{ g/L}$) پاسخ R_2 (درصد حذف نیترات) افزایش یافت. طبق نتایج، این نانوفتو کاتالیست در غلظت معین نه تنها اثر سمی بر رشد و فعالیت نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم ندارد بلکه با تحریک رشد و تأمین منبع الکترون اضافه، سبب افزایش فعالیت نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم به میزان $82/1\%$ در حضور نانوفتو کاتالیست CQDs/ZnO/TiO_2 شد. با بررسی غلظت‌های مختلف نانوفتو کاتالیست ($0/05$ ، $0/01$ ، $0/05$ ، 1 و $1/1$) و اندازه‌گیری میزان نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم مشخص شد غلظت مناسب نانوفتو کاتالیست CQDs/ZnO/TiO_2 برابر $0/5 \text{ g/L}$ می‌باشد. در غلظت‌های بالاتر از $0/5 \text{ g/L}$ نانوفتو کاتالیست CQDs/ZnO/TiO_2 ، اثرهای سمی حاصل از اکسیدهای فلزی نانوفتو کاتالیست بر سلول ایجاد می‌شود و رشد و فعالیت نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم را کاهش می‌دهد (59). در تحقیق حاضر، نیترات‌زدایی اتوتروفیک با یون‌های Zn^{2+} و Ti^{4+} تولید شده توسط نانوفتو کاتالیست، قادر به کاهش نیترات می‌باشد. در این پژوهش، شرایط بهینه فعالیت نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور

نتیجه‌گیری

تصفیه آب آشامیدنی از نیترات برای حفظ سلامت انسان و محیط‌زیست ضروری است. در این پژوهش برای نخستین‌بار از نانوفتوکاتالیست CQDs/ZnO/TiO_2 جهت بررسی نقش آن در نیترات‌زدایی زیستی استفاده شد. پارامترهای عملیاتی مؤثر دما ($^{\circ}\text{C}$) و غلظت نانوفتوکاتالیست (g/L) در نیترات‌زدایی و نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتو کاتالیست توسط روش RSM بهینه شد. نانوفتوکاتالیست تهیه‌شده توسط دستگاه‌های SEM, XRD, FTIR مشخصه‌یابی شد. طیف FTIR، برهم‌کنش بین TiO_2 و ZnO , CQD را تأیید نمود. پس از تعیین شرایط بهینه، نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوفتوکاتالیست و در بیوراکتور بررسی شد. طبق نتایج، میکروارگانیسم در حضور نانوفتو کاتالیست ۸۲/۱٪

نیترات‌زدایی زیستی داشت. در بیوراکتور نیز در حضور CQDs/ZnO/TiO_2 ۹۶٪ نیترات‌زدایی زیستی حاصل شد و این نانوفتوکاتالیست در بیوراکتور کارایی بالاتری در حذف نیترات نشان داد. یافته‌های این مطالعه نشان دادند، با افزودن نانوذرات فلزی Ti^{4+} و Zn^{2+} در حذف آلاینده‌ها، نیترات‌زدایی زیستی تقویت‌شده و برای توسعه فرآیندهای حذف آلاینده مقرون‌به‌صرفه، مفید خواهد بود.

ملاحظات اخلاقی

ندارد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

1. Mahvi AH, Asgari A, Nazemi S, Moradnia M. A Survey on drinking water quality in qazvin in 2015. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2017 Apr 10;16(1):3-16.
2. mehrabinia P, Kermanezhad J. Investigation of Nitrate Absorption Methods from Contaminated Waters Using Biochar. *J Water Sustainab Develop*, 2020; 7(1): 79-90. doi: 10.22067/jwsd. v7i1.81367.
3. Lucchetti R, Onotri L, Clarizia L, Natale F.D, Somma I.D, Andreozzi R, Marotta R. Removal of nitrate and simultaneous hydrogen generation through photocatalytic reforming of glycerol over “in situ” prepared zero-valent nano copper/P25. *Appl Catal B*, 2017; 202: 539-549.
4. Soliman A.M, Alshamsi D, Murad A.A, Aldahan A, Ali I.M, Ayesh A.I, Elhaty I.A. Photocatalytic removal of nitrate from water using activated carbon-loaded with bimetallic Pd-Ag nanoparticles under natural solar radiation. *J Photochem Photobiol A: Chem*, 2022; 1;433:114175.
5. Schaider L.A, Swetschinski L, Campbell C, Rudel R.A. Environmental justice and drinking water quality: are there socioeconomic disparities in nitrate levels in US drinking water? *Environ Health*, 2019; 18:1-15.
6. F. Edition Guidelines for drinking-water quality WHO Chronicle, 2011; 38: 104-108.
7. El Ouardi M, Qourzal S, Alahiane S, Assabbane A, Douch J. Effective removal of nitrates ions from aqueous solution using new clay as potential low-cost adsorbent. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*. 2015 26;5(4):178-90.
8. Sarkar J, Saha A, Roy A, Bose H, Pal S, Sar P, Kazy SK. Development of nitrate stimulated hydrocarbon degrading microbial consortia from refinery sludge as potent bioaugmenting agent for enhanced bioremediation of petroleum contaminated waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020 Oct;36:1-20.
9. Moussavi G, Shekoohiyan S. Simultaneous nitrate reduction and acetaminophen oxidation using the continuous-flow chemical-less VUV process as an integrated advanced oxidation and reduction process. *J Hazard Mater*, 2016; 318: 329-338.
10. Sowmya A, Meenakshi S. Photocatalytic reduction of nitrate over Ag-TiO₂ in the presence of oxalic acid. *J Water Process Eng*, 2015; 8: e23-e30.
11. Jung W, Hwang Y.J. Material strategies in the electrochemical nitrate reduction reaction to ammonia production, *Mater Chem Front*. 2021; 5: 6803-6823.
12. Valera-Medina A, Xiao H, Owen-Jones M, David W. I. F, Bowen P. J. Ammonia for power. *Prog Energy Combust Sci*, 2018; 69: 63–102.
13. Valera-Medina A, Amer-Hatem F, Azad AK, Dedoussi IC, De Joannon M, Fernandes RX, Glarborg P, Hashemi H, He X, Mashruk S, McGowan J. Review on ammonia as a potential fuel: from synthesis to economics. *Energy & Fuels*. 2021 Feb 28;35(9):6964-7029.
14. Chen JG, Crooks RM, Seefeldt LC, Bren KL, Bullock RM, Darensbourg MY, Holland PL, Hoffman B, Janik MJ, Jones AK, Kanatzidis MG. Beyond fossil fuel-driven nitrogen transformations. *Science*. 2018 May 25;360(6391):eaar6611.
15. Skiba U. Denitrification. In *Encyclopedia of Ecology*; Jørgensen S.E, Fath B.D, Eds. Academic Press: Oxford, 2008; 866–871.
16. Maia LB, Moura JJ. How biology handles nitrite. *Chemical Reviews*. 2014 May 28;114(10):97.
17. Tugaoen HO, Garcia-Segura S, Hristovski K, Westerhoff P. Challenges in photocatalytic reduction of nitrate as a water treatment technology. *Science of the total environment*. 2017 Dec 1;599:1524-51.
18. Gholami M, Nassehinia HR, Jonidi-Jafari A, Nasserli S, Esrafilia A. Comparison of Benzene & Toluene removal from synthetic polluted air with use of Nano photocatalytic TiO₂/ZNO process. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2014 Dec;12:1-8.
19. Kabra K, Chaudhary R, Sawhney RL. Treatment of hazardous organic and inorganic compounds through aqueous-phase photocatalysis: a review. *Industrial & engineering chemistry research*. 2004 Nov 24;43(24):7683-96.
20. Akyol A, Yatmaz H, Bayramoglu M. Photo catalytic dechlorination of remazol Red RR in aqueous ZnO suspensions. *Appl Catalys B Environ*, 2004; 54(1): 19-24.
21. 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.
22. Kim JY, Park HJ, Lee C, Nelson KL, Sedlak DL, Yoon J. Inactivation of escherichia coli by nanoparticulate zerovalent iron and ferrous ion. *Appl Environ Microbiol*, 2010;76 (22): 7668-7670.

23. Mohammadi M, Sedighi M, Alimohammadi V. Modeling and optimization of Nitrate and total Iron removal from wastewater by TiO₂/SiO₂ nanocomposites. *International Journal of Nano Dimension*. 2019 Apr 1;10(2):195-208.
24. 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(4): 301-10.
25. Zhang AY, Wang WK, Pei DN, Yu HQ. Degradation of refractory pollutants under solar light irradiation by a robust and self-protected ZnO/CdS/TiO₂ hybrid photocatalyst. *Water Res*, 2016; 92: 78-86.
26. Fakhri A, Behrouz S, Tyagi I, Agarwal S, Gupta VK. Synthesis and characterization of ZrO₂ and carbon-doped ZrO₂ nanoparticles for photocatalytic application. *J Molecul Liq*, 2016; 216: 342-46.
27. Geng Z, Chen Z, Li Z, Qi X, Yang X, Fan W, Huo M. Enhanced photocatalytic conversion and selectivity of nitrate reduction to nitrogen over AgCl/TiO₂ nanotubes. *Dalton Transactions*, 2018; 47(32): 11104-12.
28. Reñones P, Fresno F, Fierro JL, de la Peña O'Shea VA. Effect of La as Promoter in the Photoreduction of CO₂ Over TiO₂ Catalysts. *Topics in Catalysis*. 2017 Sep;60:1119-28.
29. Tyagi S, Rawtani D, Khatri N, Tharmavaram M. Strategies for nitrate removal from aqueous environment using nanotechnology: a review. *Journal of water process engineering*. 2018 Feb 1;21:84-95.
30. Samadi MT, Saghi MH, Ghadiri K, Hadi M, Beikmohammadi M. Performance of simple nano zeolite Y and modified nano zeolite Y in phosphor removal from aqueous solutions. *Iranian J Health Environ*, 2010; 3(1): 27- 36.
31. Mahmodi G.h, Sharifnia S.h, Madani M, Vatanpour V. Photoreduction of carbon dioxide in the presence of H₂, H₂O and CH₄ over TiO₂ and ZnO photocatalysts. *Solar Energ*, 2013; 97:186-194.
32. Eskandarloo H, Badieli A, Tavakoli A.R, Behnajady M.A, Ziarani G.M. Simple and safe educational experiments for demonstration of environmental application of heterogeneous photocatalysis process using the example of natural fruit juice dye degradation. *J Mater Educ*, 2014; 111-116.
33. Xue B, Yang Y, Sun Y, Fan J, Li X, Zhang Z. Photoluminescent lignin hybridized carbon quantum dots composites for bioimaging applications. *Int J Biol Macromol*, 2019; 122: 954-61. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.018.
34. Molaei M.J. Principles, mechanisms, and application of carbon quantum dots in sensors: a review. *Anal Method*, 2020; 12: 1266-1287.
35. Kou X, Jiang S, Park S.J, Meng L.Y. A review: recent advances in preparations and applications of heteroatom-doped carbon quantum dots. *Dalton Trans*, 2020; 49: 6915-6928.
36. Katzen JM, Tserkezis C, Cai Q, Li LH, Kim JM, Lee G, Yi GR, Hendren WR, Santos EJ, Bowman RM, Huang F. Strong coupling of carbon quantum dots in plasmonic nanocavities. *ACS applied materials & interfaces*. 2020 Apr 8;12(17):19866-73.
37. Shi Y, Liu X, Wang M, Huang J, Jiang X, Pang J, et al. Synthesis of N-doped carbon quantum dots from bio-waste lignin for selective irons detection and cellular imaging. *Int J Biol Macromol*, 2019;128: 537-545. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019. 01.146.
38. Abd Manan FA, Hong WW, Abdullah J, Yusof NA, Ahmad I. Nanocrystalline cellulose decorated quantum dots based tyrosinase biosensor for phenol determination. *Materials Science and Engineering: C*. 2019 Jun 1;99:37-46. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.082
39. Athika M, Prasath A, Duraisamy E, Sankar Devi V, Selva Sharma A, Elumalai P. Carbon-quantum dots derived from denatured milk for efficient chromium-ion sensing and supercapacitor applications. *Mater Lett*, 2019; 241:156-9.doi.org/10.1016/j.matlet.2019.01.064.
40. Ratnayake S.P, Mantilaka MMMGPG, Sandaruwan C, Dahanayake D, Murugan E, Kumar S, et al. Carbon quantum dots-decorated nano-zirconia: A highly efficient photocatalyst. *Appl Catal A Gen*, 2019; 570:23-30. doi.org/10.1016/j.apcata.2018.10.022.
41. Shen K, Luo G, Liu J, Zheng J, Xu C. Highly transparent photo electrochromic device based on carbon quantum dots sensitized photoanode. *Sol Energy Mater Sol Cells*, 2019; 193: 372-378. doi.org/10.1016/j.solmat.2019.01.004.
42. Su W, Guo R, Yuan F, Li Y, Li X, Zhang Y, Zhou S, Fan L. Red-emissive carbon quantum dots for nuclear drug delivery in cancer stem cells. *The journal of physical chemistry letters*. 2020 Feb 4;11(4):1357-63.
43. Karakoçak B.B, Laradji A, Primeau T, Berezin M.Y, Li S, Revi N. Hyaluronan-Conjugated Carbon Quantum Dots for Bioimaging Use. *ACS Appl Mater Interfac*, 2021; 13: 277-286.
44. Xiao X, Shao Z, Yu L. A Perspective of the Engineering Applications of Carbon-based Selenium-containing Materials, *Chin Chem Lett*. 2021; 32: 2933-2938.
45. 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.
46. Fan X, Hu H, Qin J, Cao X, Zhao R, Wang D. Mechanism study on NO removal over the CQDs@MIL-100 (Fe) composite photocatalyst. *Environ Technol Innovat*, 2021; 24: 101809.
47. Asadi E, Ghasemi MH, Ahmadi P, Monajjemi N, Afsharpour M, Baghdadi M. Synthesis and characterization of graphitic carbon nitride/kaolin nanocomposite for photocatalytic removal of nitrate from aqueous solutions.
48. 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. *Inter Biodeteriorat Biodegradat*, 2016; 108:158-165.
49. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association.; 1926.

50. Krishna NM, Philip L. Thiobacillus denitrificans immobilized biotrickling filter for NO₂ removal. Clean Technologies and Environmental Policy. 2005 Nov;7:285-93.
51. Liu Y, Li S, Chen Z, Megharaj M, Naidu R. Influence of zero-valent iron nanoparticles on nitrate removal by Paracoccus sp. Chemospher, 2014; 108: 426-432. doi. /10.1016/j.chemosphere.2014.02.045.
52. 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.
53. Bozetine H, Wang Q, Barras A, Li M, Hadjersi T, Szunerits S, Boukherroub R. Green Chemistry Approach for the Synthesis of ZnO-Carbon Dots Nanocomposites with Good Photocatalytic Properties under Visible Light. J Colloid Interface Sci, 2016; 465: 286–294
54. Gupta V, Saleh TA. Syntheses of carbon nanotube-metal oxides composites; adsorption and photo-degradation. Carbon Nanotubes-From Research to Applications. 2011 Jul 20;17:295-312.
55. Wang L, Wang Y, Xu T, Liao H, Yao Ch, Liu Y, et al. Gram-scale synthesis of single-crystalline graphene quantum dots with superior optical properties. Nat Commun, 2014; 5(1): 5357.
56. Pourkhabbaz A, Zeidi A, Mehrjo F. Survey of Nitrate Removal Method from Aqueous Solutions Using Titanium Dioxide Nano-Photocatalyst. J Health, 2020; 10(4): 396-410.
57. 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.
58. Li F, Sun S, Jiang Y, Xia M, Sun M, Xue B. Photodegradation of an azo dye using immobilized nanoparticles of TiO₂ supported by natural porous mineral. Journal of Hazardous Materials. 2008 Apr 15;152(3):1037-44.
59. Kim JY, Park HJ, Lee C, Nelson KL, Sedlak DL, Yoon J. Inactivation of Escherichia coli by nanoparticulate zerovalent iron and ferrous ion. Applied and Environmental Microbiology. 2010 Nov 15;76(22):7668-70.doi. /10.1128/AEM.01009-10.
60. Ekrami A, Taghavi L, Rasekh B, Yazdian F. Optimization of Bionitrification Using Aluminum and Calcium Based Graphene Nanostructures in Bioreactor. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2023 Mar 10;13(50):49-66.
61. Hamdi E, Rasekh B, Tajbakhsh E, Yazdian F, Ghobeh M. Investigating the Molecular Mechanism of Optimized Bio Denitrification by *Thiobacillus denitrificans* in the Presence of Metal Nanostructures in Bioreactor. Geomicrobiol J, 2022; 39 (9): 791-803, DOI: 10.1080/01490451.2022.2078446.