



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 یکی از آنیون‌های معدنی است که در نتیجه اکسیداسیون نیتروژن عنصری حاصل می‌شود. آلودگی آب‌های زیرزمینی و سطحی به نیترات در بسیاری از مناطق دنیا به یک مشکل مهم تبدیل شده است. بنابراین دستیابی به تکنولوژی‌های جدید برای حذف نیترات ضروری می‌باشد. هدف از این پژوهش بررسی مکانیسم مولکولی نیترازدایی زیستی توسط تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوذره فلزی کربن کوانتوم دات (CQD-Fe⁰) در بیوراکتور است.

مواد و روش‌ها: نانوذره Fe⁰ به‌روش کاهش در فاز مایع که روش کاهش بوروهیدرید نیز نامیده می‌شود، سنتز شده است و به‌منظور زیست سازگاری، توزیع یکنواخت و عدم کلوخه شدن، Fe⁰ با کربن کوانتوم‌دات پوشش‌دار 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 ۲۹/۳۱-۳۸/۳۲ 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 فوتوبلیچینگ 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 طیف‌وسعی 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 نیتريت به‌عنوان یک گیرنده الکترون نهایی دارد، دنیتریفیکاسیون فقط تحت شرایط بی‌هوازی انتظار می‌رود. محدوده pH برای رشد این میکروارگانیسم ۶-۸ است (۱۳). از آنجایی که برای نیتريت‌زدایی نیاز به یک منبع کربن است، از نانوذرات مختلف و اندازه‌های متفاوت به‌منظور تأثیر آن‌ها بر روی رهايش منبع کربنی استفاده شده است. مفردنيا و همکاران کارآیی استفاده از نانو ساختار $St-Fe^0$ برای حذف نیتريت را مورد بررسی قرار دادند. اثر نانوذرات آهن/نشاسته صفر ظرفیتی در حضور *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* برای حذف نیتريت 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^۱ و سازمان بهداشت جهانی^۲ چنان‌چه غلظت نیتريت بیشتر از ۱۱/۳ میلی‌گرم/لیتر باشد برای سلامت انسان، به‌ویژه نوزادان خطرناک است (۲). در کشور ایران نیز حد استاندارد برای نیتريت 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 نیتريت احساس می‌شود. روش‌های متداول حذف نیتريت 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 حالی‌که 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 نیتريت 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). نیتريت‌زدایی زیستی با احیا نیتريت (توسط میکروارگانیسم‌های نیتريت‌زدا)، روشی مناسب برای حذف زیستی نیتريت از منابع آبی می‌باشد. جهت کاربرد صنعتی نیتريت‌زدایی 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 نیتريت در سفره‌های آب زیرزمینی جلوگیری می‌کنند (۷). در بین نانوذرات صفر ظرفیتی، نانوذرات فلزی آهن صفر ظرفیتی (Fe^0) علاوه بر افزایش میزان فعالیت نیتريت‌زدایی 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

ظرفیتی و تیوباسیلوس دنیتریفیکانس، راندمان حذف نیترات به ۹۱٪ و در غیاب نانوذره به ۴۴/۴۴٪ رسید. (۱۴) درک مکانیسم های مولکولی کاهش دهنده نیترات در اکوسیستم های طبیعی بسیار مهم است. توالی ژن های مرتبط با آنزیم های درگیر در دنیتریفیکاسیون و DNRA (*napA*) *narH* *narG* *nirS* و *nrfa*) از این سیستم ها جدا شده و به طور قابل توجهی از توالی هایی که قبلاً ثبت شده اند متمایز هستند. ردوکتاز متصل به غشا اولین مرحله در کاهش نیترات را کاتالیز می کند. تجزیه و تحلیل دقیق ساختار ثانویه *narH* نشان داد این ژن (در مقایسه با *nirS* *napA* *narG* و *nirK*) به ژن ترجیحی برای مطالعات تنوع زیستی تبدیل شده است. علی رغم اهمیت اکولوژیکی، تحقیقات کمی در مورد چگونگی دنیتریفیکاسیون و ژن های مرتبط با آن انجام شده است. از این رو بیان ژن های درگیر در مسیر نیترات ردوکتاز در نیترات زدایی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس مؤثر هستند. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی مکانیسم مولکولی نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوذره آهن صفر ظرفیتی پوشیده شده با کربن کوانتوم دات (CQD-Fe⁰) در بیوراکتور انجام شد.

مواد و روش ها

در این پژوهش از میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس ATCC 23644 استفاده شد. میکروارگانیسم 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 میلی گرم/لیتر ۲-۳۰/۰). در این روش در اثر واکنش معرف نیترات A و معرف نیترات B با نیترات محلول زرد رنگ ایجاد می شود. از طریق اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۰ نانومتر میزان جذب محلول حاصل اندازه گیری می شود. برای تهیه منحنی

¹ Basal Salt Medium

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

اندازه گیری رشد سلولی و میزان نیترات زدایی میکروارگانیسم

به منظور اندازه گیری رشد سلولی ۴ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری به ویال های ۴۰ میلی لیتر حاوی ۳۶ میلی لیتر محیط معدنی پایه^۱ منتقل شد. پتاسیم نیترات به عنوان منبع نیترات با غلظت ۳۰۰ میلی گرم/میلی لیتر به محیط BSM اضافه شد. محیط کشت در انکوباتور (۳۰ درجه سلسیوس) مدت ۴۸-۲۴ ساعت همراه ویال شاهد بدون سلول باکتری گرماگذاری شدند. نمونه گیری با فاصله زمانی ۶ ساعت انجام شد. میزان رشد میکروارگانیسم میزان رشد میکروارگانیسم با خواندن جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. همچنین، به منظور مطالعه و بررسی میزان فرآیند نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم 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)

روش های متعددی برای ساخت نانوذرات Fe⁰ وجود دارد. در این میان، روش کاهش در فاز مایع (روش کاهش بوروهیدرید) مورد توجه می باشد، که شامل افزودن کاهنده قوی به محلول حاوی یون های آهن و کاهش آن ها به نانوذرات فلزی می باشد (۱۷). کربن کوانتوم دات با استفاده از روش هیدروترمال سنتز شد (۱۸). به طور خلاصه، ۲ گرم دی آمونیوم سیترات هیدروژن در ۷۵ میلی لیتر آب مقطر دمای ۲۵ درجه سلسیوس حل شد. این مخلوط در یک بمب هیدروترمال مدت ۱۸ ساعت در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به منظور تولید ۲۶/۶ میلی گرم/میلی لیتر

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

گروه دوم: نانوذرات فلزی $QCD-Fe^0$ در محیط BSM با غلظت نیترات ۳۰۰ میلی گرم/میلی لیتر در سه غلظت ۰/۵، 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 نیترات-زدایی نانوذرات فلزی، نمونه گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج با استفاده از کیت نیترات بررسی شد.

گروه سوم: میکروارگانیزم های پوشش یافته با نانوذره $QCD-Fe^0$ در محیط BSM با غلظت ۳۰۰ میلی گرم/میلی لیتر نیترات مدت ۴۸ ساعت در سه غلظت ۰/۵، 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 نیترات زدایی زیستی میکروارگانیزم پوشش یافته با نانوذره $QCD-Fe^0$ نمونه گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج با استفاده از کیت نیترات بررسی شد.

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

پس از بررسی رشد و فعالیت نیترات زدایی میکروارگانیزم تیوباسیلیوس دنیتریفیکانس در ویال ۴۰ میلی لیتر با ۳۶ میلی-لیتر محیط کشت BSM در حضور و عدم حضور نانوذره $QCD-Fe^0$ ، میکروارگانیزم 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 $QCD-Fe^0$ (۰/۷۵ گرم لیتر)، به محیط کشت سترون افزوده شدند. بیوراکتور در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و pH ۷ تنظیم گردید. به منظور بررسی رشد و فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانیزم، نمونه گیری هر ۴ ساعت تا ۵۲ ساعت انجام شد.

محلول QCD 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 ($QCD-Fe^0$)

بعد از سنتز نانوذرات، با استفاده از روش های تحلیلی مختلف، مشخصه یابی انجام شد. آزمون XRD برای نانوذره $QCD-Fe^0$ با استفاده از دستگاه پراش پرتو ایکس مدل PW 1730، تحت تابش $Cu-K\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$)، در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی آمپر انجام گرفت. محدوده اسکن ۲θ 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 $QCD-Fe^0$ انجام شد.

پوشش سطح میکروارگانیزم با نانوذرات فلزی

جهت پوشش سطح میکروارگانیزم با نانوذرات $St-Fe^0$ و $QCD-Fe^0$ ، 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 ۰/۵، ۰/۵ و ۱ گرم/لیتر به محیط اضافه شدند.

بررسی فرآیند نیترات زدایی گروه های آزمایشی مختلف

بررسی بیان ژن با استفاده از تکنیک Real time-PCR

روش بررسی بیان ژن

جهت واکنش بیان ژن، RNA از سلول‌ها (میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس)، با استفاده از روش-RNX PLUS و طبق پروتکل شرکت سازنده RNJia استخراج شد. غلظت RNA به دست آمده با استفاده از دستگاه Nano drop با روش تعیین دانسیته نوری اندازه گیری شد. RNA در طول موج‌های 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: نمونه‌های cDNA، DNA ase و RNA ase

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 سه‌بعدی پرایمرها با نرم‌افزار Gene runner بررسی شد. پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های مورد نظر مطابق جدول ۱ است:

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی ژن‌های *recA* و *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: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله باز شدن دو رشته در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای اتصال ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ ثانیه، پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۱ ثانیه. جهت تست cDNA، از پرایمر کنترلی تعبیه شده در کیت استفاده شد (۲۰).

انجام واکنش Real-Time PCR برای ژن‌های *nirS*

recA و *nirH*

برنامه دمایی و زمانی PCR برای ژن *narH* شامل: واسرشت‌سازی 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: واسرشت‌سازی 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*

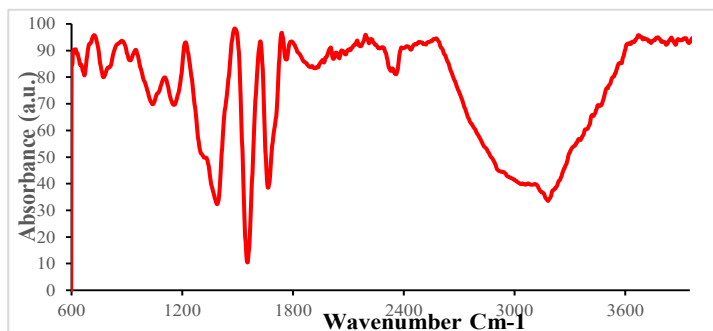
یافته‌ها

مشخصه یابی نانوذرات CQD-Fe^0 و St-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 3182 cm^{-1} به ارتعاشات کششی گروه O-H اشاره دارد. پیک در ناحیه 2050 cm^{-1} می‌تواند مربوط به پیوند کششی $\text{N}=\text{C}$ باشد، همچنین نوار جذبی در محدوده 1665 cm^{-1} به

حالت ارتعاشات کششی گروه‌های $\text{C}=\text{C}$ و $\text{C}=\text{O}$ کربن کوانتوم دات و Fe نسبت داده می‌شود. پیک در ناحیه 1556 cm^{-1} به ارتعاش کششی گروه NH اشاره دارد. پیک در ناحیه 1394 cm^{-1} به پیوند $\text{C}=\text{C}$ و در محدوده 1155 cm^{-1} به ارتعاش کششی پیوند C-O-C اشاره دارد. پیک موجود در محدوده 772 cm^{-1} مربوط به گروه‌های C-H و N-H موجود در آلکن و آمین می‌باشد. نوار جذبی موجود در 671 cm^{-1} به گروه $\text{C}-\text{H}$ اشاره دارد. پیک جذبی $\text{Fe}-\text{O}$ در ناحیه 601 cm^{-1} ظاهر شده است. طیف FTIR حاصله، تشکیل پیوند CQD و Fe^0 را تأیید کرد.

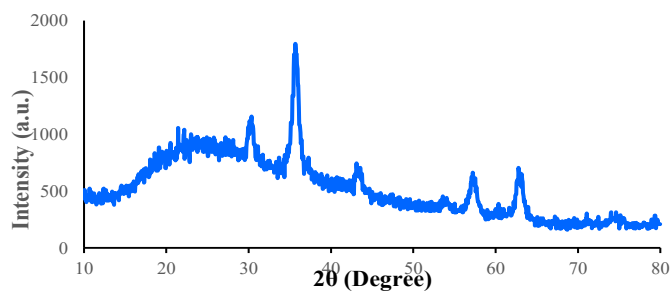


شکل ۱- طیف FTIR نانوذرات CQD-Fe^0

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



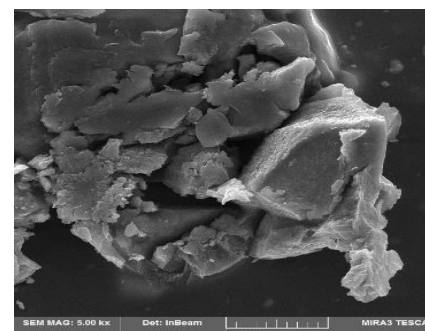
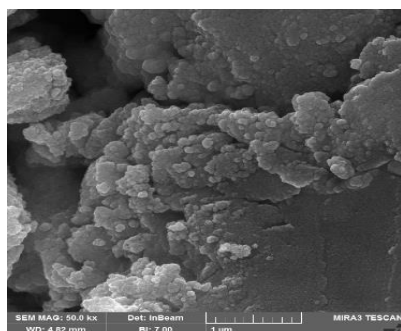
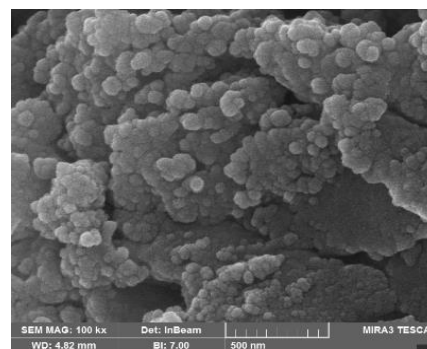
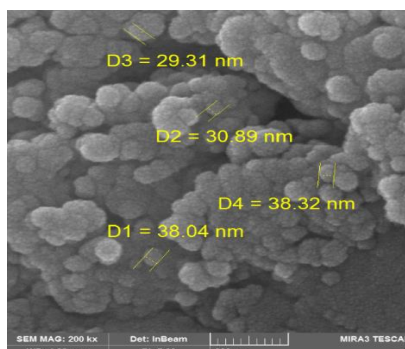
شکل ۲- الگوی پراش پرتو ایکس نانوذرات CQD-Fe^0

^۱ X- Ray Diffraction (XRD)

آنالیز FESEM

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.

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

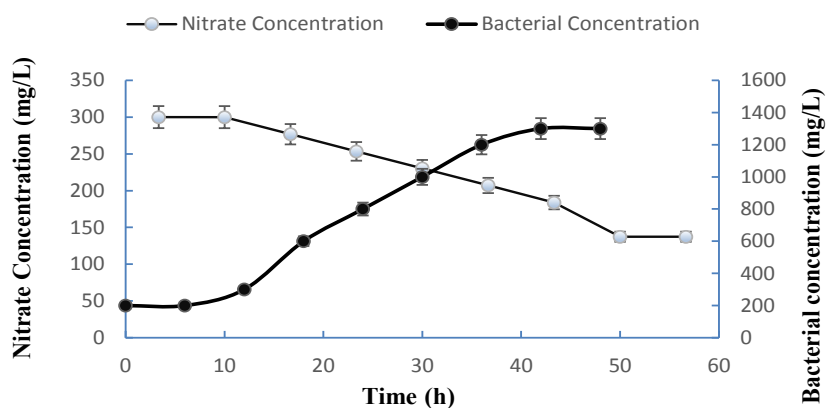


شکل ۳- تصاویر FESEM نانوذرات فلزی CQD-Fe^0 به روش کاهش در فاز مایع

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

میزان رشد و فعالیت نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیزم

میزان رشد و فعالیت نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیزم از طریق میزان حذف نیترات و اندازه‌گیری میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر با استفاده از کیت نیترات مشخص شد. منحنی استاندارد نیترات با استفاده از رقت‌هایی از نیترات با محدوده غلظت 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°C درجه سلسیوس و $3/5\%$ در دمای 25°C 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 میکروارگانیسم پوشش یافته با نانوذرات

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

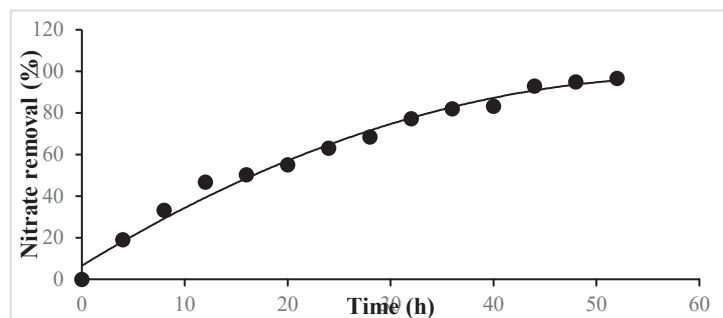
نیترات در حضور نانوذرات تحت تأثیر دما می باشد. افزایش دما سبب افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و افزایش فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم می شود.

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

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

جدول 3- نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم تیواسیلیوس دنیتریفیکانس 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



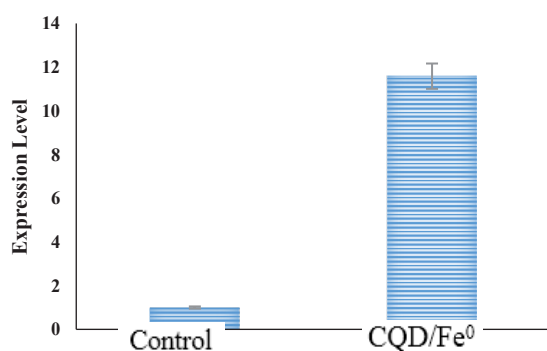
نمودار ۲- میزان نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوذرات CQD-Fe⁰ در بیوراکتور

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.

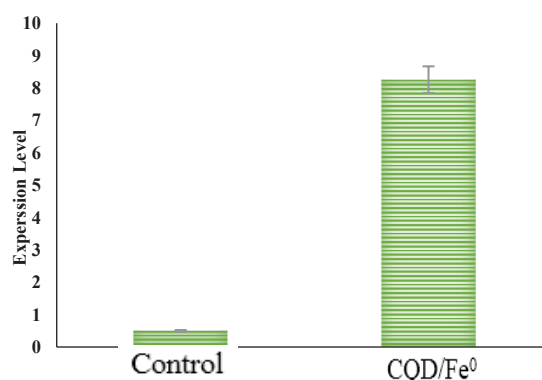
آنالیز و ارزیابی کمی ژن ها با استفاده از تکنیک Real time-PCR

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

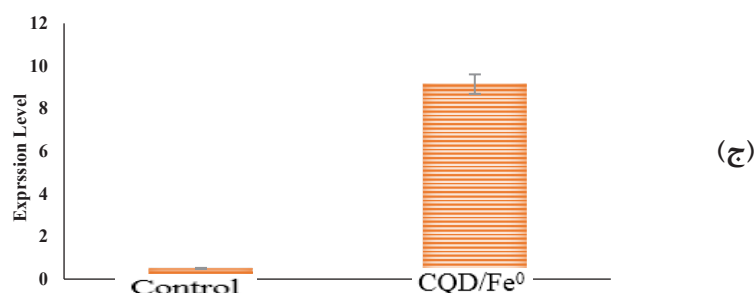
بررسی نتایج مشخص می کند نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوذرات فلزی در بیوراکتور در مقایسه با سامانه ناپیوسته (ویال) کارایی بالاتری در حذف نیترات دارد. در بیوراکتور جهت ایجاد شرایط بی هوازی به منظور اکسایش نانوذرات و تولید الکترون، جریان گاز نیتروژن توسط کپسول نیتروژن به مدت ۴۸ ساعت ایجاد شد. طی انجام فرآیند نیترات زدایی در فرمانتور 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 ۷۹/۸۳٪ 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 می باشد (۲۲). سرعت پایین واکنش، فعالیت کم آنزیم ها، پایداری کم بیوکاتالیست و مشکلات جداسازی بیوکاتالیست از جمله عوامل مؤثر در کاهش نیترازدایی زیستی می باشند. Krishna و همکاران در سال ۲۰۰۵ فعالیت نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* را بررسی نمودند، نتایج پژوهش آن ها نشان داد، در ۴۸ ساعت و ۳۴ درجه سلسیوس میکروارگانیسم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* بیشترین میزان رشد و حذف نیترا را دارد (۱۶) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد میزان فعالیت نیترازدایی میکروارگانیسم و میزان حذف نیترا، متناسب با رشد باکتری می باشد. زیرا میزان حذف نیترا در مرحله تأخیر میکروارگانیسم به میزان کم می باشد و در مرحله لگاریتمی رشد، میزان حذف نیترا افزایش می یابد و بیشترین میزان حذف در ۴۸ ساعت می باشد. تغییرات رنگ محلول نیترا و ایجاد رنگ زرد نتیجه برهم کنش بین نیترا و کروموتروپیک اسید می باشد. در مطالعه Chen و همکاران با استفاده از نانوذرات Fe^0 بر سطح میکروارگانیسم *پاراکوکوس دنیتریفیکانس*، میزان ۷۶/۱۶٪ نیترازدایی زیستی گزارش شد (۱۷). Montalvo و همکاران در بیوراکتور دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، با استفاده از جمعیت میکروارگانیسم های اتوتروف و هتروتروف تثبیت شده بر بستر ژئولیت ۹۵٪ نیترازدایی مشاهده گردید (۲۳). Rajab و Beigy و همکاران نیز عملکرد نانوذرات $St-Fe^0$ را جهت فعالیت نیترازدایی زیستی *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس*

بررسی کردند، طبق نتایج نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوذرات $St-Fe^0$ در بیوراکتور ۹۴/۷٪ به دست 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 آن ها 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 ۰/۱ میلی گرم/لیتر ایجاد می کند (۲۵). با توجه به مطالعات انجام شده در سال های اخیر استفاده از نانوذرات فلزی صفر ظرفیتی به ویژه Fe^0 توانسته است بسیاری از محدودیت های 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 می گیرد. طبق نتایج مطالعه اخیر، کارایی حذف نیترا توسط نانوذرات با افزایش غلظت نیترا کاهش می یابد 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 می گردد (۲۸). همچنین با افزایش غلظت نیترا اولیه، میزان یون فروس به سرعت کاهش پیدا کرده و به پایین ترین سطح می رسد که این امر سبب کاهش کارایی حذف نیترا می گردد (۲۷). در پژوهشی مشابه، اثر غلظت های 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

به عنوان سوپسترای محدودکننده، سرعت رشد و فعالیت نیترازدایی 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 نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم مشخص شد غلظت مناسب نانوذرات $St-Fe^0$ و $CQD-Fe^0$ 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 نیترازدایی 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 فرایند نیترازدایی زیستی را تسهیل بخشند. ازدیاد محصولات سمی حاصل از اکسیداسیون نانوذره $CQD-Fe^0$ سبب فروپاشی غشا میکروارگانیسم و ایجاد استرس اکسیداتیو می شود و از این طریق میکروارگانیسم را غیرفعال کرده و سبب کاهش فعالیت نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم می شود (۲۸).

در این پژوهش فعالیت نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* در حضور نانوذره $CQD-Fe^0$ در بیوراکتور بستر متحرک حاوی محیط BSM و ۳۰۰ میلی-گرم/میلی لیتر نیترا و در pH ۷ مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج میزان رشد و فعالیت نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم در بیوراکتور در حضور $CQD-Fe^0$ برابر ۹۶/۷٪ به دست آمد. اختلاف نیترازدایی 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 نیترازدایی زیستی می باشند، به خوبی در سامانه بیوراکتور بستر متحرک ایجاد شده است و رشد میکروارگانیسم تسهیل و فعالیت نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم تسریع گردید. به طور کلی، *تیوباسیلوس دنیتریفیکانس* به عنوان باکتری عملکردی در سیستم نیترازدایی مبتنی بر گوگرد شناسایی می شود. مسیر نیترازدایی به طور کامل برای این باکتری با تجزیه و تحلیل ژنوم نشان

داده شده است. انواع مختلفی از نیترازدوکتاز شامل نیترازدوکتاز 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 $CQD-Fe^0$ بیان هر سه ژن *nirS*، *narH* و *recA* نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی داشته، که نشان دهنده تأثیر بالای این نانوذره در نیترازدایی 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 نیترازدایی هتروتروفیک توسط $Fe(II)$ ، مشخص شد بیان ژن های نیترازدایی *narG*، *nirS* و *nosZ* افزایش یافتند. چنین افزایشی نباید به دلیل اکسیداسیون آهن وابسته به نیترازدایی که در محیط های کمبود آلی غالب است، باشد. در محیطی با تأمین مداوم $Fe(II)$ و منابع کربن فراوان، چرخه افزایش فعالیت آنزیم نیترازدایی در حضور $Fe(II)$ با تسهیل استفاده از بستر نیتروژن، تصور بر این بود تحریک متابولیسم و رشد نیترازدایی، بالا بردن فراوانی ژن های نیترازدایی و افزایش بیان آنزیم های نیترازدایی مسئول نیترازدایی 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 نیترازدایی زیستی استفاده شد. طبق نتایج می توان گفت درصد نیترازدایی زیستی میکروارگانیسم در بیوراکتور بستر متحرک در حضور نانوذرات $CQD-Fe^0$ نسبت به سامانه ناپیوسته درصد بیشتری است. در این پژوهش، بیان هر سه ژن *nirS*، *narH* و *recA* در سلول های تیمار شده با $CQD-Fe^0$ نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی داشته، که نشان دهنده تأثیر بالای این-نانوذرات در نیترازدایی 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، نیتريت زدایی زیستی تقویت شده و برای توسعه فرآیندهای حذف آلاینده مقرون به صرفه مفید خواهد بود.

منابع:

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 productionroute 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, Karbalaee 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, Huilinar 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, Sleňhová 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, Jiaxin Zh, Tongzhou L. Fe (II) enhances simultaneous phosphorus removal and denitrification in heterotrophic denitrification by chemical precipitation and stimulating denitrifiers activity. *Environ. Pollut.* 2021; 287: 117668.

