

DOR: [20.1001.1.17354226.1400.16.2.1.6](https://doi.org/10.1001.1.17354226.1400.16.2.1.6)

### Original article

#### Evaluation of bio removal nitrate by *Thiobacillus denitrificans* in the presence of quantum dot carbon stabilized zero-valent iron nanoparticles (CQD-Fe<sup>0</sup>)

Hamdi E<sup>1</sup>, Rasekh B<sup>2,\*</sup>, Tajbakhsh E<sup>1</sup>, Yazdian F<sup>4</sup>, Ghobeh M<sup>5</sup>

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

\*Corresponding author: [b.rasekh@gmail.com](mailto:b.rasekh@gmail.com)

Received : 10/14/2021

Accepted 11/25/2021

Contamination of groundwater and surface water with nitrate has become a serious problem in many parts of the world. Adverse effects on aquatic ecosystems are one of the most important effects of high nitrate concentrations in aqueous solutions. Zero-valent iron (Fe<sup>0</sup>) metal nanoparticles are of great interest for the purification of toxic compounds from water. The aim of this study was to use nanostructure coated with carbon-quantum dot (CQD-Fe<sup>0</sup>) to investigate their role in biodenitrification of *Thiobacillus denitrificans*. For this purpose, Fe<sup>0</sup> nanoparticles were synthesized by the liquid phase reduction method and for biocompatibility, uniform distribution and non-agglomeration, Fe<sup>0</sup> was coated with carbon quantum-dot. Characterization of nanoparticles was determined by XRD, TEM, FESEM, FTIR and DLS. The FTIR spectrum confirmed the formation of CQD and Fe<sup>0</sup> bonds. The average diameter of CQD-Fe<sup>0</sup> nanoparticles was observed in the range of 29.31-38.32. According to the results, with increasing temperature, growth and bio-nitrification activity of *Thiobacillus denitrificans* microorganism increases.

**Keywords:** Contamination of groundwater, microorganism, nanostructure

## مقاله تحقیقی

ارزیابی حذف زیستی نیترات توسط تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوذرات آهن صفر ظرفیتی پایدار شده با کربن کوانتوم دات ( $CQD-Fe^0$ )الهه حمدی<sup>۱</sup>، بهنام راسخ<sup>۲\*</sup>، الهه تاجبخش<sup>۳</sup>، فاطمه یزدیان<sup>۴</sup>، مریم قبه<sup>۵</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. دانشیار پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران
۳. دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴. دانشیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۵. استادیار، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

محل انجام تحقیق: دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

\*مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: [b.rasekh@gmail.com](mailto:b.rasekh@gmail.com)

محل انجام تحقیق: دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۴

## چکیده

آلودگی آب‌های زیرزمینی و سطحی به نیترات در بسیاری از مناطق دنیا به یک مشکل جدی تبدیل شده است. ایجاد عوارض نامطلوب روی اکوسیستم‌های آبی از مهمترین اثرات غلظت بالای نیترات در محلول‌های آبی است. نانوذرات فلزی آهن صفر ظرفیتی ( $Fe^0$ ) برای تصفیه ترکیبات سمی از آب بسیار مورد توجه است. هدف از این پژوهش استفاده از نانوساختار فلزی پوشیده شده با کربن کوانتوم دات ( $CQD-Fe^0$ ) به منظور بررسی نقش آن‌ها در نیترازدایی زیستی تیوباسیلوس دنیتریفیکانس<sup>۱</sup> می‌باشد. به این منظور نانوذرات  $Fe^0$  به روش کاهش در فاز مایع سنتز شدند و به منظور زیست سازگاری، توزیع یکنواخت و عدم کلوخه شدن،  $Fe^0$  با کربن کوانتوم دات پوشش دار شد. مشخصه‌یابی نانوذرات توسط  $FTIR$ ،  $FESEM$ ،  $TEM$ ،  $XRD$  و  $DLS$  تعیین گردید. طیف  $FTIR$ ، تشکیل پیوند  $CQD$  و  $Fe^0$  را تأیید کرد. قطر متوسط نانوذرات  $CQD-Fe^0$  در محدوده  $38/32nm$  -  $29/31$  مشاهده شد. براساس نتایج با افزایش دما، رشد و فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس افزایش می‌یابد.

واژه های کلیدی: آلودگی آب های زیرزمینی، میکروارگانیسم، نانوساختار

<sup>1</sup> Thiobacillus denitrificans

## مقدمه

در بسیاری از مناطق شهری به دلیل استفاده روز افزون مواد شیمیایی محلول و نشت فاضلاب‌های خانگی و صنعتی و ورود آن‌ها به منابع آب، کیفیت آب‌ها به شدت کاهش یافته است. آب آشامیدنی ناسالم و با کیفیت پایین می‌تواند روی سلامتی انسان تاثیرگذار باشد و یک عامل بسیار مهم در مرگ و میر جوامع به حساب آید (۱). 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 زاید شهری و صنعتی و همچنین فعالیتهای کشاورزی وارد منابع آب و خاک شده و اثرات نامطلوبی بر سلامتی مصرف‌کنندگان برجا می‌گذارد (۲). طی سال‌های گذشته، تغییرات قابل توجهی در چرخه نیتروژن جهانی به وجود آمده است. غلظت و تحرک نیتروژن در مناطق وسیعی از زمین رو به افزایش است. به‌علاوه از طریق فعالیتهای مختلف انسانی مانند استفاده از آفت‌کش‌ها، استفاده از ترکیبات آلی یا معدنی، دفع نامناسب ضایعات صنعتی، رها شدن و نفوذ زباله‌های حاوی ازت مانند نیترات، رواناب شهری و کشاورزی وارد اکوسیستم‌های آبی محیط زیست می‌شود (۳). چرخه نیتروژن شامل واکنش‌های تثبیت نیترات (نیتروژن‌کاسیون) و نیترات زدایی (دینیتروژن‌کاسیون) است. طی فرآیند تثبیت نیترات یون آمونیوم یا آمونیاک توسط باکتری‌های *نیتروزوموناس* به نیتريت تبدیل می‌شود، در مرحله بعد باکتری‌های *نیتروباکتر* شامل *نیتروزوموناس*<sup>۲</sup> و *نیتروکوکوس*<sup>۳</sup> تبدیل نیتريت به نیترات را انجام می‌دهند. فرآیند تثبیت نیترات انرژی زاست و میکروارگانیسم‌های دخیل در این فرآیند اتوتروف هستند. حضور اکسیژن کافی و pH خنثی جهت تثبیت نیترات ضروری است (۴). طبق استاندارد اتحادیه اروپا و سازمان بهداشت جهانی چنانچه غلظت نیترات بیشتر از ۱۱/۳ mg/l باشد برای سلامت انسان، به‌ویژه نوزادان خطرناک است (۵). در کشور ایران نیز حد استاندارد برای نیترات در آب شرب ۱۰ mg/l است (۶). افزایش غلظت نیترات بیشتر از حد مطلوب استاندارد بین-

المللی در منابع آب مایه نگرانی زیست محیطی در سراسر جهان شده است. انباشت نیترات در بدن در سطوح بالای غلظتی به عنوان علت بسیاری از عوارض از جمله متهموگلوبینی<sup>۴</sup> و دیابت، شناخته شده است (۳). به سبب این خطر، نیاز جدی به فناوری‌های موثر با کارایی بالا جهت پالایش منابع آب آلوده به نیترات احساس می‌شود. روش‌های متداول حذف نیترات از آب شامل روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی می‌باشد. در روش‌های فیزیکی حذف نیترات از آب (ابتدایی‌ترین روش حذف آلاینده‌های آب)، از نیروهای فیزیکی جهت حذف استفاده می‌شود که هزینه کم‌تری در مقایسه با دیگر روش‌های نیترات‌زدایی دارند اما کارایی چندانی در حذف نیترات از آب ندارند (۷). دینیتروژن‌کاسیون زیستی فرآیندی است که در آن ترکیبات اکسید شده نیتروژن به عنوان پذیرنده الکترون برای تولید انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۸). این روش می‌تواند هم زمان چند آلاینده را حذف کند در حالی که روش‌های فیزیکی و شیمیایی تنها یک آلاینده خاص را حذف می‌کنند (۹).

اخیرا 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 نیترات شده است. نیترات را می‌توان با استفاده از نانوذرات، نانوکریستال‌ها، نانوپلیمرها و دیگر محصولات حاصل از فرآیند نانو حذف نمود. ذرات نانو به دلیل داشتن اندازه کوچک، سطح مقطع زیاد، شکل کریستالی و نظم شبکه‌ای منحصر به فرد و در نتیجه واکنش پذیری زیاد می‌توانند برای تصفیه و تبدیل آلاینده‌ها به مواد بی‌ضرر و کم‌ضررتر استفاده شوند (۱۰).

نیترات زدایی زیستی با احیا نیترات (توسط میکروارگانیسم‌های نیترات‌زدا)، روشی مناسب برای حذف زیستی نیترات از منابع آبی می‌باشد. طی مسیر احیا، نیترات از طریق واکنش‌های احیا به گاز بی‌خطر نیتروژن تبدیل می‌شود. استفاده از نانوذرات توانسته بسیاری از محدودیت‌های نیترات‌زدایی زیستی را برطرف نموده و

<sup>۲</sup>Nitrosomonas<sup>۳</sup>Nitrococcus<sup>۴</sup> methaemoglobinaemia

تشکیل نمی‌دهد. این میکروارگانیسم کمولیتوتروف<sup>۶</sup> است که دنیتریفیکاسیون اتوتروف انجام می‌دهد و می‌تواند طیف وسیعی از ترکیبات کاهش یافته گوگرد را برای به دست آوردن انرژی اکسید کند. اکسیژن، نیتريت، نیترات، اکسیدنیتريك و اکسید نیتروژن به عنوان گیرنده نهایی الکترون برای اکسیداسیون گوگرد به کار می‌روند. از آن جایی که این میکروارگانیسم ترجیح به استفاده از اکسیژن به جای نیترات به عنوان یک گیرنده الکترون نهایی دارد، دنیتریفیکاسیون فقط تحت شرایط بی‌هوازی انتظار می‌رود (۱۸). از آنجایی که برای نیترات‌زدایی نیاز به یک منبع کربن است، از نانوذرات مختلف و اندازه‌های متفاوت به منظور تاثیر آن‌ها روی رهایش منبع کربنی استفاده شده است. از جمله چن و همکاران با استفاده از نانوذرات  $Fe^0$  بر سطح میکروارگانیسم پاراکوکوس دنیتریفیکانس، میزان ۷۶/۱۶ درصد نیترات‌زدایی زیستی را گزارش کردند (۱۹).

رجب‌بیگی و همکاران نیز عملکرد نانوذرات  $St-Fe^0$  را جهت فعالیت نیترات‌زدایی زیستی نیویاسیلوس دنیتریفیکانس بررسی کردند، طبق نتایج نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم در حضور نانوذرات  $St-Fe^0$  در بیوراکتور ۹۴/۷ درصد به‌دست آمد (۲۰).

در مطالعه بالزوکوا فرآیند دنیتریفیکاسیون اتوتروفیک مبتنی بر گوگرد با استفاده از نیویاسیلوس دنیتریفیکانس به عنوان یک روش جایگزین حذف نیترات از فاضلاب صنعتی مطالعه گردید. طبق نتایج افزودن  $Fe^{3+}$  افزایش قابل‌توجهی در حذف نیترات برابر با ۰.۱ mg/l ایجاد می‌کند (۲۱).

رضازاده و همکاران کارآیی استفاده از نانو ساختار  $St-Fe^0$  برای حذف نیترات را مورد بررسی قرار دادند. تاثیر نانوذرات  $St-Fe^0$  در حضور باکتری نیویاسیلوس دنیتریفیکانس برای حذف نیترات در نرم‌افزار مترال استودیو<sup>۷</sup> به دست آمد (۲۲).

سونگ و همکاران سنتز و خصوصیات کیتوزان لینک شده با اپی کلروهیدرین (CB-ECH) را برای حذف نیترات از آب بررسی کردند. در مطالعه آن‌ها، اپی کلروهیدرین ثبات

سبب بهبود این فرآیند شود. نانوذرات مبتنی بر آهن مانند  $Fe/Pd$ ،  $Fe/Ni$ ،  $Fe/Cu$  از تراکم آلاینده‌هایی مثل نیترات در سفره‌های آب‌یرزمینی جلوگیری می‌کنند (۱۱).

در بین نانوذرات صفر ظرفیتی، نانوذرات فلزی آهن صفر ظرفیتی ( $Fe^0$ ) علاوه بر افزایش میزان فعالیت نیترات‌زدایی زیستی میکروارگانیسم، جداسازی مغناطیسی بیوکاتالیست را سبب می‌شود.  $Fe^0$  به خاطر کارایی مناسب در پاک‌سازی طیف گسترده‌ای از آلاینده‌های محیطی، بیشترین کاربرد را در بین فلزات صفر ظرفیتی دارد (۱۲). نانوذرات  $Fe^0$  به دلیل ویژگی‌های مکانیکی، نوری، مغناطیسی، الکترونیکی، کاتالیتیکی، شیمیایی، ساختار ملکولی و اتمی ویژه و اندازه کوچک در تصفیه بسیاری از آلاینده‌های محیط کاربرد دارند (۱۳). واکنش بین  $Fe^0$  و نیترات یک واکنش اکسایش-کاهش است که طی آن انحلال اکسایشی  $Fe^0$  اتفاق می‌افتد و نتیجه آن ایجاد یون‌های فلزی است. این واکنش حضور آمونیاک، نیتريت و گاز نیتروژن را در نتیجه احیا نیترات توسط  $Fe^0$  نشان می‌دهد (۱۴). بررسی واکنش‌های احیای  $Fe^0$  در محلول‌های آبی نشان می‌دهد آهن فلزی،  $Fe^{2+}$  و هیدروژن، احیاکننده‌های اصلی در محیط هستند (۱۵). اگر نانوذرات  $Fe^0$  به طور 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 به وسیله عوامل حفاظتی ضروری است (۱۶).

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 نسبت به پلیمر یا سیلیکا دارند، مورد توجه قرار گرفته است. خواص شگفت‌انگیز 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<sup>۵</sup> و حلالیت آلی بالا بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۷). نیویاسیلوس دنیتریفیکانس، یک میکروارگانیسم میله‌ای، گرم منفی، متحرک است که اسپور

<sup>۶</sup> chemolithoautotroph

<sup>۷</sup> material studio

<sup>۵</sup> Photobleaching

استفاده از نیترات پتاسیم تهیه شد. به هر یک از لوله های آزمایش حاوی Nitrate Reagent A، ۱ ml محلول نیترات اضافه شد و لوله ۱۰ بار تکان داده شدند، سپس با کیف Nitrate Reagent B به هر یک از لوله ها اضافه شد و لوله ها مجدداً ۱۰ بار تکان داده شدند. پس از ظهور کامل رنگ زرد، جذب هر یک از لوله ها در طول موج ۴۱۰nm خوانده شد و منحنی استاندارد نیترات به دست آمد. به منظور سنجش میزان نیترات نمونه ها، سلول ها از محیط کشت توسط سانتریفوژ در شرایط ۵۰۰۰ rpm مدت ۲۰ دقیقه جداسازی شدند. پس از عبور از فیلتر و عملیات رقیق سازی، ۱ml محلول به لوله حاوی Nitrate Reagent A منتقل شد و ۱۰ بار تکان داده شد. سپس با استفاده از کیف Nitrate Reagent B به لوله آزمایش اضافه شد و مجدداً ۱۰ بار تکان داده شد تا رنگ زرد کاملاً ظاهر شود. نهایتاً میزان غلظت نیترات به دست آمد (۲۴).

#### اندازه گیری رشد سلولی

به منظور اندازه گیری رشد سلولی ۴ml سوسپانسیون باکتری به ویال های ۴۰ml حاوی ۳۶ml محیط BSM منتقل شد. پتاسیم نیترات به عنوان منبع نیترات با غلظت ۳۰۰mg/l به محیط BSM اضافه شد. محیط کشت در انکوباتور (۳۰°C) مدت ۲۴-۴۸ ساعت همراه ویال شاهد بدون سلول باکتری گرماگذاری شدند. نمونه گیری با فاصله زمانی ۶ ساعت انجام شد. میزان رشد میکروارگانیسم با اندازه گیری غلظت میکروارگانیسم برحسب ppm و اندازه گیری نیترات حذف شده در طول موج ۴۱۰nm اندازه گیری شد (۲۵).

#### تهیه نانوذرات فلزی Fe<sup>0</sup>

روش های متعددی برای ساخت نانوذرات Fe<sup>0</sup> وجود دارد. در این میان، روش کاهش در فاز مایع (روش کاهش بوروهیدرید<sup>۹</sup>) مورد توجه می باشد، که شامل افزودن کاهنده قوی به محلول حاوی یون های آهن و کاهش آنها به نانوذرات فلزی می باشد (۱۹).

حرارتی بالاتری داشته است و در مقایسه با دانه های کیتوزان خالص منافذ نانو به خوبی توسعه یافته است (۲۳). در این پژوهش ابتدا نانوذرات فلزی Fe<sup>0</sup> به روش کاهش در فاز مایع سنتز شدند. به جهت زیست سازگاری و عدم کلوخه شدن، Fe<sup>0</sup> با کربن کوانتوم دات پوشش دار شد، سپس نانوذرات فلزی CQD-Fe<sup>0</sup> مشخصه یابی شد و از این نانوذرات به عنوان احیاکننده نیترات و منبع الکترون برای میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس استفاده شد. بنابراین، مطالعه ای حاضر با هدف بررسی نیترات زدایی زیستی باکتری تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در حضور نانوذرات آهن صفر ظرفیتی پایدار شده با کربن کوانتوم دات در محیط آبی انجام شده است.

#### مواد و روش ها

در این پژوهش از میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس ATCC 23644 استفاده شد. میکروارگانیسم یاد شده اتوتروف می باشد و به یک منبع گوگردی (سولفید هیدروژن، گوگرد عنصری یا تیوسولفات) به عنوان 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<sup>۸</sup> استفاده شد. ترکیبات محیط معدنی پایه در جدول ۱ ارائه شده است.

#### آزمون سنجش نیترات

آمونیم و گاز نیتروژن شایع ترین محصولات نهایی نیترات زدایی زیستی می باشند. جهت سنجش میزان نیترات از روش Chromotropic Acid استفاده شد (دامنه سنجش برای نیترات برحسب ازت ۰/۲-۳۰ mg/L) (۲۴). در این روش در اثر واکنش Nitrate و Nitrate Reagent A و Reagent B با نیترات محلول زرد رنگ ایجاد می شود. از طریق اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۰nm میزان جذب محلول حاصل اندازه گیری می شود. برای تهیه منحنی استاندارد نیترات، محلول نیترات با غلظت های مختلف با

<sup>9</sup> borohydride reduction method

<sup>8</sup> Basal Salt Medium

جدول ۱- ترکیبات محیط BSM

فرمول شیمیایی	نام ترکیب	نام شرکت سازنده	مقدار (g/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	دی هیدروژن فسفات پتاسیم	Merck	۱/۸
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	هیدروژن فسفات دی سدیم	Merck	۱/۲
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	سولفات منیزیم ۷ آبه	Merck	۰/۱
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	آمونیم سولفات	Merck	۰/۱
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	کلرید کلسیم ۲ آبه	Merck	۰/۰۳
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	تیوسولفات سدیم ۵ آبه	Merck	۱۵
Trace elements solution	محلول عناصر کم مقدار	-	mL ۱
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	کلرید آهن (III) ۶ آبه	Merck	۰/۰۲
$\text{MnSO}_4$	سولفات منگنز	Merck	۰/۰۲
$\text{NaHCO}_3$	سدیم هیدروژن کربنات	Merck	۰/۵
$\text{KNO}_3$	پتاسیم نیترات	Merck	۵

#### مشخصه یابی نانوذرات $\text{Fe}^0$ پایدار شده با کربن کوانتوم دات ( $\text{CQD-Fe}^0$ )

بعد از سنتز نانوذرات، با استفاده از روش‌های تحلیلی مختلف، مشخصه‌یابی انجام شد. آزمون XRD برای نانوذرات  $\text{CQD-Fe}^0$  با استفاده از دستگاه پراش پرتو ایکس مدل PW 1730، تحت تابش  $\text{Cu-K}\alpha$  ( $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$ )، در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی‌آمپر انجام گرفت. تحلیل و بررسی نتایج حاصل از این آزمون توسط نرم‌افزار XPERT high score plus نسخه ۳.۰.۵ انجام شد. تایید پیوند و برهمکنش بین کربن کوانتوم دات و نانوذره فلزی  $\text{Fe}^0$  با استفاده از دستگاه FT-IR Spectrophotometer (مدل BRUKRE آلمان) در محدوده  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  انجام شد. ارزیابی پتانسیل زتا و آنالیز FESEM نیز انجام شد.

#### پوشش سطح میکروارگانیزم با نانوذرات فلزی

جهت پوشش سطح میکروارگانیزم با نانوذرات  $\text{CQD-Fe}^0$ ، ۴ ml سوسپانسیون باکتری در ویال‌های ۴۰ ml به ۳۶ ml محیط کشت BSM اضافه شد، نانوذرات جداگانه با غلظت‌های ۱/۰۵، ۰/۰۵ و ۱ به محیط اضافه شدند.

#### تهیه CQD و بهبود سطح نانوذرات با کربن کوانتوم دات ( $\text{CQD-Fe}^0$ )

کربن کوانتوم دات با استفاده از روش هیدروترمال سنتز شد (۲۶). به طور خلاصه، ۲ gr دی‌آمونیم سیترات هیدروژن در ۷۵ ml آب مقطر دمای  $25^\circ\text{C}$  حل شد. این مخلوط در یک بامب هیدروترمال مدت ۱۸ ساعت در دمای  $150^\circ\text{C}$  به منظور تولید ۲۶.۶ mg/ml محلول CQD حرارت داده شد، متعاقباً، ۵۱.۶ mg نانوذره  $\text{Fe}^0$  به محلول افزوده شد و جهت همگن شدن، ده دقیقه همزده شد. پس از ۳۰ دقیقه به محلول، ۵/۴ g پتاسیم بوروهیدرید در ۲۰ ml آب و ۳۰ ml 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  $\text{Fe}^0$  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  $80^\circ\text{C}$  خشک گردید (۲۷).

### بررسی فرآیند نیترات زدایی میکروارگانسیم

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

### بررسی فرآیند نیترات زدایی نانوذرات فلزی

نانوذرات فلزی CQD-Fe<sup>0</sup> در محیط BSM با غلظت نیترات ۳۰۰ ppm، درسه غلظت ۰/۵، ۰/۱۰۵، ۰/۵، ۱ از نانوذرات در دماهای ۲۵، ۳۰°C و ۳۵ مدت ۴۸ ساعت در

انکوباتور گرماداری شدند. به منظور بررسی اثر غلظت نانوذرات و دما بر میزان نیترات زدایی نانوذرات فلزی، نمونه-گیری پس از ۴۸ ساعت انجام و نتایج بررسی شد.

### نتایج

#### تعیین خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی میکروارگانسیم

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

جدول ۲- خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی میکروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس.

Color	Brown
Shape of Cell	Bacilli
Colony features	Short rod-shaped
Size of the colony	0.5×1-3µm
Spore formation	-
Gram reaction	-

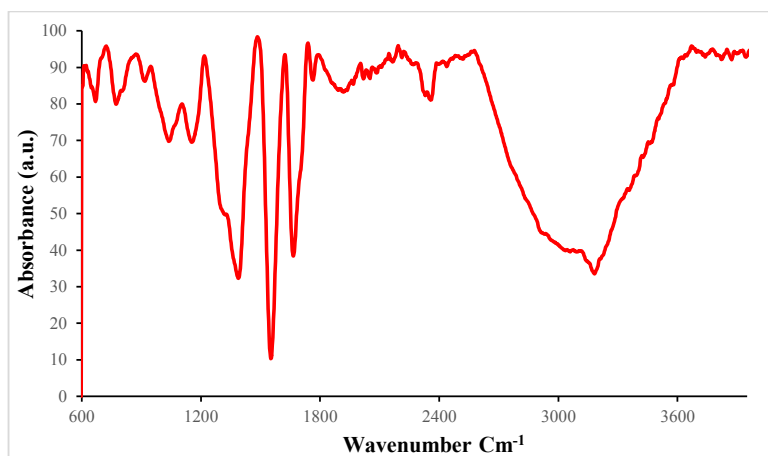
### مشخصه یابی نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup>

نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup> پس از سنتز، توسط روش های طیف FTIR، پراش اشعه ایکس XRD و بررسی مورفولوژی مشخصه یابی شدند.

### طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

آنالیز طیف سنجی مادون قرمز به منظور حصول اطمینان از پیوند بین CQD و نانوذره Fe<sup>0</sup>، هم چنین تعیین برهم کنش بین CQD و Fe<sup>0</sup> استفاده شد (۲۸). در حالیکه در طیف FTIR نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup>، چندین پیک مشاهده شد که طیفها مربوط به گروه های عاملی CQD موجود بر سطح نانوذره Fe<sup>0</sup> می باشند. بر اساس شکل ۱، پیک در محدوده- ۳۱۸۲ Cm<sup>-1</sup> به ارتعاشات کششی گروه O-H اشاره دارد.

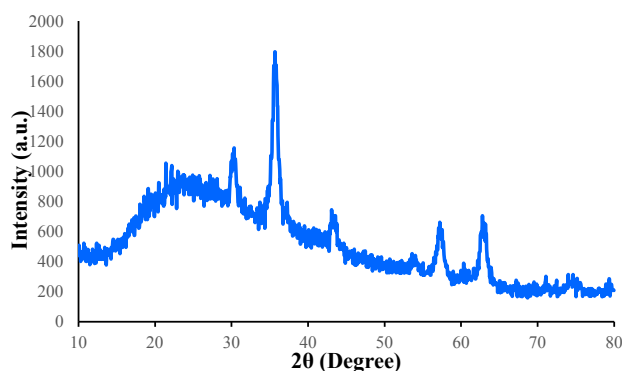
پیک در ناحیه ۲۰۵۰ Cm<sup>-1</sup> می تواند مربوط به پیوند کششی N=C باشد، همچنین نوار جذبی در محدوده ۱۶۶۵ Cm<sup>-1</sup> به حالت ارتعاشات کششی گروه های C=C و C=O کربن-کوانتوم دات نسبت داده می شود. پیک در ناحیه ۱۵۵۶ Cm<sup>-1</sup> به ارتعاش کششی گروه NH، پیک در ناحیه ۱۳۹۴<sup>۱</sup> به پیوند C=C و در محدوده ۱۱۵۵ Cm<sup>-1</sup> به ارتعاش کششی پیوند C-O-C اشاره دارد. پیک موجود در محدوده- ۷۷۲ Cm<sup>-1</sup> مربوط به گروه های C-H و N-H موجود در آلکن و آمین می باشد. نوار جذبی موجود در ۶۷۱ Cm<sup>-1</sup> به گروه C-H = اشاره دارد. پیک جذبی Fe-O در ناحیه ۶۰۱ Cm<sup>-1</sup> ظاهر شده است. طیف FTIR حاصله، تشکیل پیوند CQD و Fe<sup>0</sup> را تأیید کرد.

شکل ۱- طیف FTIR نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup>

Fe<sup>0</sup> را به روش کاهش در فاز مایع انجام دادند. نتایج پژوهش آن‌ها در زاویه ۴۴/۷۶، قله تیزی را نشان داد که بیانگر تشکیل Fe<sup>0</sup> می‌باشد (۳۱). در تحقیق حاضر پیک در نواحی ۴۴، ۵۷ و ۶۳ مشخصه وجود Fe<sup>0</sup> در نانوذرات می‌باشد. تشکیل قله در زاویه ۴۴، با نتایج حاصل از پژوهش لیو و همکاران هم خوانی دارد (۳۲). اما قله‌هایی در نواحی ۳۵- و ۳۰ و ۵۷ دیده می‌شود که دلالت بر وجود اکسیدها و هیدروکسیدهای آهن در محصول نهایی است (۳۳).

### الگوی پراش پرتو ایکس

طیف پراش اشعه ایکس نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup> در شکل ۲ آورده شده است. پیک‌های شاخص این ترکیب در نواحی ۲۳، ۳۰، ۳۵، ۴۴، ۵۷ و ۶۳ مشاهده می‌شود که پیک پهن در نواحی ۲۲-۲۳ نشان‌دهنده CQD است. مطابق پژوهش‌های گوپتا (۲۹) پیک‌ها در نواحی ۲۲ نشان‌دهنده CQD در نانوذره است، در نتیجه ساختار نانوذره CQD مورد تایید است (۳۰). پرابو و همکاران سنتز نانوذرات

شکل ۲- الگوی پراش پرتو ایکس نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup>

تصاویر FESEM شکل ۳، نانوذرات فلزی CQD-Fe<sup>0</sup> دارای اشکال کروی و ساختار یکنواخت بوده، سطح نانو سامانه همگن به نظر می‌رسد که نشان‌دهنده سازگاری خوب بین

### آنالیز FESEM

دستگاه FESEM مجهز به آشکارساز EDS، علاوه بر تصویربرداری از سطح نمونه، داده‌های مربوط به عناصر تشکیل‌دهنده نمونه نیز قابل استخراج می‌باشد. طبق

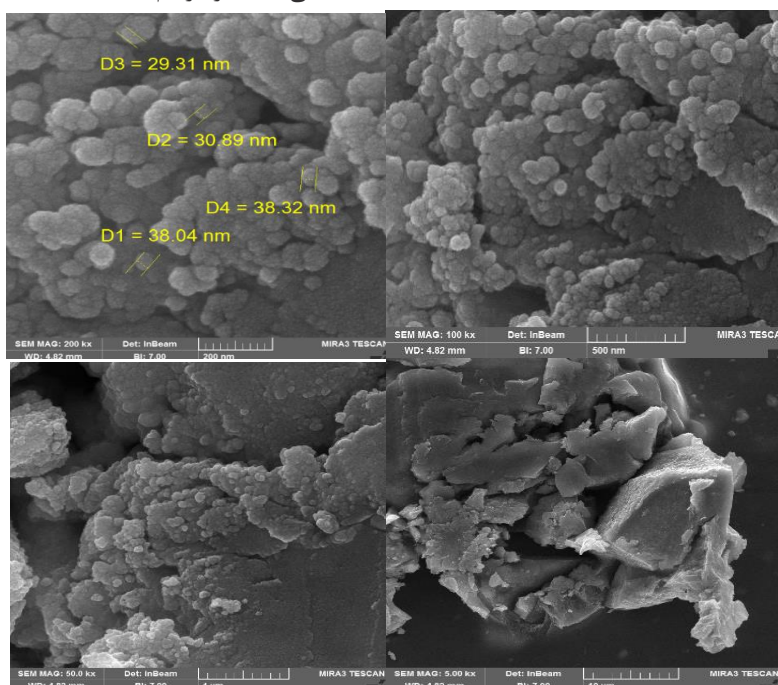


### میزان رشد و فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانسیم

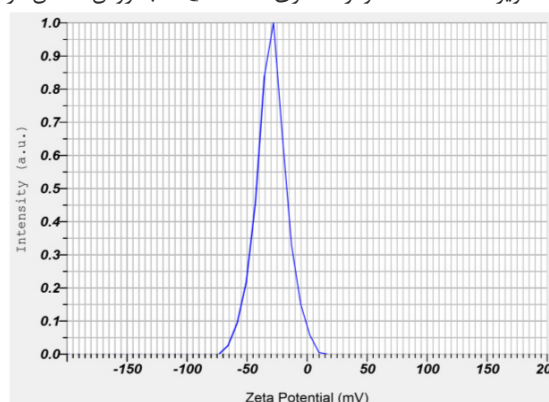
میزان رشد و فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانسیم از طریق میزان حذف نیترات و اندازه‌گیری میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰nm با استفاده از کیت نیترات مشخص شد (۲۵). منحنی استاندارد نیترات با استفاده از رقت‌هایی از نیترات با محدوده غلظت ۰-۱۰ mg/l - ۱۳۰ تهیه و برحسب میزان جذب هر یک از غلظت‌ها منحنی استاندارد رسم شد.

Fe<sup>0</sup> و CQD می‌باشد. قطر متوسط نانوذرات فلزی CQD-Fe<sup>0</sup> در محدوده ۲۹/۳۱-۳۸/۳۲nm مشاهده شد.

ثبات ذرات نانوذرات با مقادیر پتانسیل زتا آن تایید می‌شود. اهمیت اندازه‌گیری پتانسیل زتا این است که مقدار آن نقش مهمی در پایداری نانوذرات در برابر تجمع، الحاق، و تداخل بین مواد باردار دارد. با توجه به شکل ۴، پتانسیل زتا نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup> مقدار ۲۹/۸mV- به دست آمد.



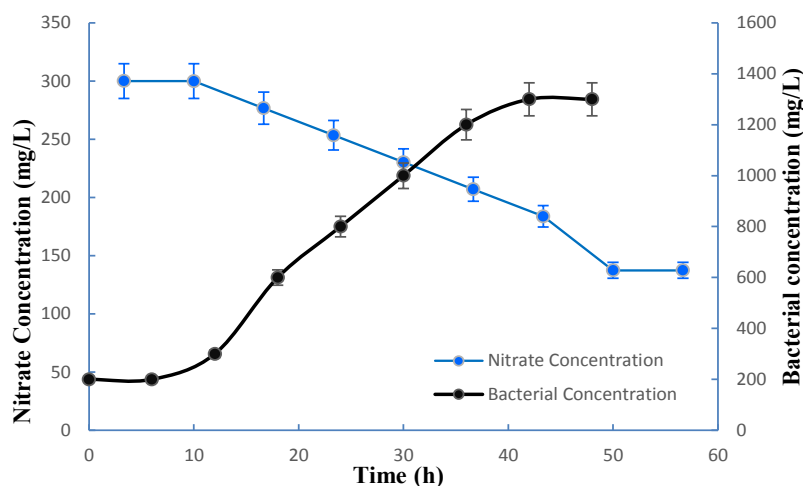
شکل ۳- تصاویر FESEM نانوذرات فلزی CQD-Fe<sup>0</sup> به روش کاهش در فاز مایع.



شکل ۴- پتانسیل زتا نانوذرات CQD-Fe<sup>0</sup>.

در مرحله بعد به علت کمبود مواد غذایی و انباشته شدن متابولیت های سمی در محیط کشت، سرعت رشد میکروارگانیسم ها ثابت شده و وارد مرحله سکون می شوند. میکروارگانیسم ها در نهایت وارد مرحله مرگ می شوند که طی آن سرعت رشد کاهش می یابد و دلیل اصلی آن کمبود مواد غذایی و تغییر شرایط محیطی مانند pH می باشد. جهت رسم منحنی رشد، پس از تلقیح میکروارگانیسم ها در ویال های ۴۰ ml و قرار دادن در انکوباتور دمای ۳۰°C، نمونه گیری در فاصله ۶ ساعت یک بار انجام شد و تا ۶۰ ساعت ادامه یافت و میزان غلظت میکروارگانیسم محاسبه شد. میزان حذف نیترات توسط میکروارگانیسم در طول موج ۴۱۰ nm خوانده شد (نمودار ۱).

**تعیین منحنی رشد میکروارگانیسم به روش اندازه گیری غلظت میکروارگانیسم و میزان حذف نیترات**  
هر میکروارگانیسم در طول رشد خود چهار مرحله شامل، مرحله تاخیر، مرحله رشد لگاریتمی، مرحله سکون و در نهایت مرحله مرگ را طی می کند. مرحله تاخیر مدت زمانی است که سلول ها خود را با شرایط جدید تطبیق می دهند که برای میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس ۶ ساعت می باشد. در این مرحله آنزیم های لازم جهت رشد سلول ها فعال می شوند. مرحله رشد لگاریتمی، سلول ها با سرعت زیاد به صورت تصاعدی تکثیر می شوند که برای میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس ۴۸ ساعت می باشد.



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

نتایج جدول ۳ نشان می دهد با افزایش دما، فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم افزایش می یابد. کریشنا و همکاران در سال ۲۰۰۵ فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس را بررسی نمودند، نتایج پژوهش آن ها نشان داد، در ۴۸ ساعت و ۳۴ درجه سانتی گراد میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس بیشترین میزان رشد و حذف نیترات را دارد (۲۵). تورنتو و همکاران در سال ۲۰۱۰ فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس را بررسی نمودند. نتایج پژوهش آن ها نشان می دهد، این

### بررسی میزان حذف نیترات توسط میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس

جهت بررسی اثر دما بر رشد و فعالیت حذف نیترات توسط میکروارگانیسم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس در عدم حضور نانوذرات فلزی، میکروارگانیسم در غلظت ۳۰۰ mg/l نیترات و pH ۷ در دماهای مختلف ۲۵°C، ۳۰°C و ۳۵°C در انکوباتور قرار داده شد. نتایج حاصل از حذف نیترات در دماهای مختلف پس از ۴۸ ساعت، با روش کروموتروپیک اسید، با استفاده از کیت نیترات بررسی شد (جدول ۳).

میزان کم می باشد و در مرحله لگاریتمی رشد، میزان حذف نیترات افزایش می یابد و بیش ترین میزان حذف در ۴۸ ساعت می باشد. تغییرات رنگ محلول نیترات و ایجاد رنگ زرد نتیجه برهم کنش بین نیترات و کروموتروپیک اسید می باشد.

میکروارگانسیم در ۴۲ ساعت بیش ترین میزان حذف نیترات را دارد (۳۴).  
میزان فعالیت نیترات زدایی میکروارگانسیم و میزان حذف نیترات، متناسب با رشد میکروارگانسیم می باشد. زیرا میزان حذف نیترات در مرحله تاخیر میکروارگانسیم به

جدول ۳- بررسی فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانسیم در دماهای مختلف

آزمایش	دما (°C)	مقدار اولیه نیترات (mg/L)	حذف نیترات (%)
۱	۳۵	۳۰۰	۴۰.۴۵
۲	۳۰	۳۰۰	۳۷.۱
۳	۲۵	۳۰۰	۱۶.۳۶

آهن عامل مهمی در میزان دنیتریفیکاسیون کمولیتوتروفیک در نظر گرفته می شوند (۳۷). در سال های اخیر استفاده از نانوذرات فلزی صفر ظرفیتی به ویژه  $Fe^0$  توانسته است بسیاری از محدودیت های نیترات زدایی زیستی را برطرف نموده و سبب افزایش نیترات زدایی زیستی شود (۳۵). با کاهش غلظت نیترات انتقال یون نیترات بر سطح نانوذرات با بازده بالاتری صورت می گیرد. طبق نتایج مطالعه اخیر، کارایی حذف نیترات توسط نانوذرات با افزایش غلظت نیترات کاهش می یابد که این نتایج با پژوهش سان و همکاران (۳۸) و آنوتی و همکاران (۳۵) مطابقت دارد. با افزایش غلظت نیترات سرعت اکسید شدن نانوذرات فلزی در محیط آبی شتاب کمتری داشته، در نتیجه نیترات کمتری حذف می گردد (۳۳). هم چنین با افزایش غلظت نیترات اولیه، میزان یون فروس به سرعت کاهش پیدا کرده و به پایین ترین سطح می رسد که این امر سبب کاهش کارایی حذف نیترات می گردد (۳۴). هم چنین نتایج پژوهش وانگ و همکاران نشان داد با افزایش غلظت نیترات از  $120 \text{ mg/L}$  به  $400 \text{ mg/L}$  زمان لازم برای حذف نیترات توسط نانوذره فلزی آهن صفر ظرفیتی افزایش می یابد (۳۰). در پژوهشی مشابه، اثر غلظت های مختلف نیترات (600, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 ppm) بر رشد و فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانسیم تیوباسیلوس دنیتریفیکانس ارزیابی شد. طبق نتایج با افزایش غلظت نیترات به عنوان سوبسترای محدود کننده، سرعت رشد و فعالیت نیترات زدایی زیستی

## بحث

یکی از مشکلات فرآیندهای زیستی بازده پایین حذف نیترات بوده و میزان فعالیت نیترات زدایی زیستی، برای فرآیندهای صنعتی و تجاری پایین می باشد (۳۵). سرعت پایین واکنش، فعالیت کم آنزیم ها، پایداری کم بیوکاتالیست و مشکلات جداسازی بیوکاتالیست از جمله عوامل موثر در کاهش نیترات زدایی زیستی می باشند. همچنین، دنیتریفیکاسیون توسط جمعیت های مختلف میکروارگانسیم ها نیز تحت تاثیر قرار می گیرد. میکروارگانسیم های دنیتراته کننده در همه جا حضور دارند. این میکروارگانسیم ها در طبیعت به طور کلی هتروتروف هستند و از منبع کربن به عنوان گونه دهنده الکترون استفاده می کنند. همچنین تعداد کمی از میکروارگانسیم ها، دنیتریفیکاسیون کمولیتوتروفیک را نشان می دهند و از ترکیبات غیر آلی، به عنوان مثال، یون آهن، ترکیبات سولفور، کربن آلی، هیدروژن، آهن و یا نانوذرات آلیاژ و اورانیوم به عنوان دهنده الکترون استفاده می کنند. انتخاب سویه میکروارگانسیم دنیتراته کننده مناسب با توانایی تشکیل بیوفیلم پایدار، موجب افزایش عملکرد نیترات زدایی و همچنین به طور همزمان منجر به آب تصفیه شده با کیفیت بالا می شود (۳۶). جمعیت های میکروبی بزرگ توانایی رشد در شکاف های کوچک که سطح در دسترس کمی برای رشد میکروب فراهم می کنند را ندارند و این امر در نهایت منجر به کاهش در میزان دنیتریفیکاسیون می شود. سطح و اندازه نانوذرات

تقویت شده و برای توسعه فرآیند های حذف آلاینده مقرون به صرفه خواهد بود.

#### تقدیر و تشکر

با سپاس و تقدیر ویژه از خانم دکتر جهانی که در مراحل مختلف این پژوهش، راهنمایی ارزنده و سازنده ی خود را ارزانی داشته و همچنین با تشکر از دانشکده علوم و فنون دانشگاه تهران و پژوهشگاه صنعت نفت که همواره از هیچ تلاش و امکاناتی در راستای پژوهش انجام شده دریغ نکردند.

میکروارگانسیم افزایش می یابد که با نتایج حاصل از این پژوهش هم خوانی دارد (۲۵). در این پژوهش برای نخستین بار از نانوذرات فلزی  $QD-Fe^0$  جهت بررسی نقش آن در نیترات زدایی زیستی استفاده شد. به این منظور، نانوذرات فلزی  $QD-Fe^0$  سنتز و توسط روش های XRD ، FESEM ، FTIR و DLS مشخصه یابی شدند. طیف FTIR، تشکیل پیوند  $QD$  و  $Fe^0$  را تأیید کرد. بررسی میزان حذف نیترات توسط میکروارگانسیم تیویاسیلوس دنیتریفیکانس انجام شد و مشخص شد با افزایش دما، رشد و فعالیت نیترات زدایی زیستی میکروارگانسیم افزایش می یابد. یافته های این مطالعه نشان داد با افزودن نانوذرات فلزی آهن صفر ظرفیتی در ضد عفونی و حذف آلاینده ها نیترات زدایی زیستی

#### منابع مورد استفاده

- Panahi Fard, M., Mahvi, A.H., Asgari, A., Nazemi, S., Moradnia, M., 2017. A survey on drinking water quality in Qazvin in 2015. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences* 16 (1): 3-16.
- Mehrabinia, P., and Kermannezhad, J., 2020. 'Investigation of Nitrate Absorption Methods from Contaminated Waters Using Biochar'. *Journal of Water and Sustainable Development*, 7(1),79-90. doi: 10.22067/jwsd.v7i1.81367
- Takai, K., 2019- The Nitrogen Cycle: A Large, Fast, and Mystifying Cycle. *Microbes and Environments*, 34(3) : 223-25.
- Bandekar, M., Ramaiah, N., Meena, R. M., 2018. Diversity and abundance of denitrifying and anammox bacteria from the Arabian Sea oxygen minimum zone. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 156: 19-26.
- Eslami, H., Tajik, R., Esmaili, M., Esmaili, A. and Mobini, M., 2020. Assessment of the Quality of Rafsanjan Drinking Water Resources using Water Quality Index (WQI) Model in 2018. *A Descriptive Study*, 18 (10) :996-985.
- Krishan, G., Singh, S., Kumar, C., Garg, P., Suman, G., 2016. Assessment of Groundwater Quality for Drinking Purpose by Using Water Quality Index (WQI) in Muzaffarnagar and Shamli Districts, Uttar Pradesh, India. *Hydrology: Current Research*, 7(227): 1-4.
- Hwang, Y.H., Kim, D.G. and Shin, H.S., 2011. Mechanism study of nitrate reduction by nano zero valent iron. *Journal of Hazardous Materials*, 185:1513- 1521.
- Chu, L.B. and Wang, J.L., 2016. Denitrification of groundwater using PHBV blends in packed bed reactors and the microbial diversity. *Chemosphere*, 155 (3): 463-470.
- Hemmes, K., Luimes, P., Giesen, A., Hammenga, A., Aravind, P.V. and Spanjers, H., 2011. Ammonium and phosphate recovery from wastewater to produce energy in a fuel cell. *Water Practice and Technology*, 6: 1-2.
- Samadi, M.T, Saghi, M.H, Ghadiri, K., Hadi, M. and Beikmohammadi, M., 2010. Performance of simple nano zeolite Y and modified nano zeolite Y in phosphor removal from aque solutions. *Iranian Journal of Health and Environment*, 3(1):27- 36.
- Su, J., Lin, S., Chen, Z.L., Megharaj, M. , Naidu, R. , 2011. Dechlorination of p-chlorophenol from aqueous solution using bentonite supported Fe/Pd nanoparticles: synthesis, characterization and kinetics. *Desalination*, 280:167-173.
- Cundy, A.B., Hopkinson, L. and Whitby, R.L.D. ,2008. Use of iron-based technologies in contaminated land and groundwater remediation: a review. *Science of the Total Environment*, 400: 42-51.
- Kamali, M., Costa, M.E.V., Otero-Irurueta, G., Capela, I. and Capela, I., 2019. Ultrasonic irradiation as a green production route for coupling crystallinity and high specific surface area in iron nanomaterials. *Journal of Cleaner Production*, 211,185-197.

14. Barreto-Rodrigues, M., Silveira, J., Zazo, J.A. and Rodriguez, J.J., 2017. Synthesis, characterization and application of nanoscale zero-valent iron in the degradation of the azo dye Disperse Red 1. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 628–634.
15. Machado, S. and Pacheco, J.G., 2016. 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, 108–120.
16. Zhang, Y., Kohler, N., Zhang, M., 2002. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*, 23(7):1553-61.
17. Farshbaf, M., Davaran, S., Rahimi, F., Annabi, N., Salehi, R. and Akbarzadeh, A., 2018. Carbon quantum dots: recent progresses on synthesis, surface modification and applications, *Artificial Cells. Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(7): 1331-1348.
18. Chen, M., Zhou, X., Chen, X., Cai, Q., Zeng, R. J. and Zhou, S., 2020. Mechanisms of nitrous oxide emission during photoelectrotrophic denitrification by self-photosensitized *Thiobacillus denitrificans*. *Water Research*, 172, 115501.
19. Chenghong, J., Xuping, X., Mallavarapu, M., Ravendra, N., Zuliang, Ch., 2015. Inhibition or promotion of biodegradation of nitrate by *Paracoccus* sp. In the presence of nanoscale zero-valent iron. *Science of the Total Environment*, 530(531): 241–246.
20. Rajab Beigy, M., Rasekh, B., Yazdian, F., Aminzadeh, B., Shekarriz, M., 2018. High nitrate removal by starch-stabilized Fe<sup>0</sup> nanoparticles in aqueous solution in a controlled system. *Engineering in Life Sciences*, 18(3):187-195.
21. Z. Blaťková, V., Trousil, E., Slešková, J., Palarčík, M., Slezák, J., 2017. Influence of Fe<sup>3+</sup> Ions on Nitrate Removal by Autotrophic Denitrification Using *Thiobacillus denitrificans*. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 31 (2) 167–172.
22. Mofradnia, S.R., Ashouri, R., Tavakoli, Z., Shahmoradi, F., Rashedi, H., Yazdian, F., 2019. Effect of zero-valent iron/starch nanoparticle on nitrate removal using MD simulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121:727–33.
23. Seung, J.L., Kyung-Jun, H., Yongjoon, Y., Sang-Chai, K., Soon-Do, Y., 2021. Synthesis and Characteristic Properties of Crosslinked Chitosan with Epichlorohydrin for Nitrate Removal from Water. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 21(9):4974-4979. doi: 10.1166/jnn.2021.19271.
24. APHA., 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed. American Public Health Association. Washington. DC. 8.
25. Krishna, M., Philip, L., 2005. *Thiobacillus denitrificans* immobilized biotrickling filter for NO<sub>2</sub> removal. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 7: 285- 293.
26. Navae, M., Yazdian, F., Hamed, J., Pourmadadi, M., Karbalaee, A., Malmir, S. 2020. Antibacterial properties of a bacterial cellulose CQD-TiO<sub>2</sub> nanocomposite. *Carbohydrate Polymers*, 234: 115835.
27. Lee, C., Kim, J.Y., Lee, W.I., Nelson, K.L., Yoon, J. and Sedlak D.L., 2008. Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environmental Science and Technology*, 42: 4927- 4933.
28. Li, J., Chen, Ch., Zhu, K. and Wang, X., 2015. Nanoscale zero-valent iron particles modified on reduced graphene oxides using a plasma technique for Cd (II) removal. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 59: 389-394.
29. Gupta, V., Saleh, T.A., 2011. Syntheses of carbon nanotube-metal oxides composites; adsorption and photo-degradation. *Carbon Nanotubes-From Research to Applications*, InTech.
30. Wang, L., Wang, Y., Xu, T., Liao, H., Yao, Ch. and Liu, Y., 2014. Gram-scale synthesis of single-crystalline graphene quantum dots with superior optical properties. *Nature Communications*, 5(1):5357.
31. Prabu, D. and Parthiban, R., 2013. Synthesis and Characterization of Nanoscale Zero Valent Iron (NZVI) Nanoparticles for Environmental Remediation. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology*, 4: 181- 184.
32. Liu, Y., Li, Sh., Chen, Z., Megharaj, M. and Naidu, R., 2014. Influence of zero-valent iron nanoparticles on nitrate removal by *Paracoccus* sp. *Chemosphere*, 108:426-432.
33. Hsu, J.C., Liao, C.H. and Wei, Y.L., 2011. Nitrate removal by synthetic nanoscale zero-valent iron in aqueous recirculated reactor. *Sustainable Environment Research*, 21: 353-359.
34. Torrentó, C., Cama, J., Urmeneta, J., Otero, N. and Soler, A., 2010. Denitrification of groundwater with pyrite and *Thiobacillus denitrificans*. *Chemical Geology*, 278: 80–91.

35. Anotai, J., Liao, C.H. and Ruangchanikom, C ., 2010. Nitrate removal by Fe<sup>0</sup>/Co<sup>2</sup> process using an innovative continuous flow reactor. *Environmental Engineering and Management Journal*, 20: 77-84.
36. Dan, C., Kai, Y. , Hongyu, Wang., 2016. Effects of important factors on hydrogen-based autotrophic denitrification in a bioreactor. *Desalination and Water Treatment*, 57 (8): 3482-3488.
37. Simranjeet, S., Amith, G., Anil, V.K. and Dhriti, K. ,2021. Nitrates in the environment: A critical review of their distribution, sensing techniques, ecological effects and remediation. *Chemosphere* 5: 131996.
38. Sun, Y.P., Li, X.Q. and Zhang, W.X., 2007. A method for the preparation of stable dispersion of zero valent iron nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 308: 60-66.