

Mobility and Dispersion Optimization of Nano Zerovalent Iron (nZVI) in Disinfection of Urban Wastewater with Pneumatic Nitrogen Gas Injection

N. Mehrdadi¹, Gh. R. Nabi Bidhendi¹, M. Baghdadi², R. Aali³, J. Yeganeh⁴

1. Prof. of Environmental Engineering, Faculty of Environment, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Assist. Prof. of Environmental Engineering, Faculty of Environment, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Assist. Prof. of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
4. PhD Student of Water and Environmental Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran
(Corresponding Author) jaber.yeganeh@ut.ac.ir

(Received July 17, 2017 Accepted Sep. 16, 2017)

To cite this article :

Mehrdadi, N., Nabi Bidhendi, Gh. R., Baghdadi, M., Aali, R. Yeganeh, J. 2018, "Mobility and dispersion optimization of nano zerovalent iron (nZVI) in disinfection of urban wastewater with pneumatic nitrogen gas injection" Journal of Water and Wastewater, 29(5), 27-40. Doi: 10.22093/wwj. 2017.92649.2452. (In Persian)

Abstract

Zero iron nanoparticle is considered as a universal enhancement agent. Its stabilization in aqueous environments with different coatings, reduces the efficiency of nanoparticles to a great extent. This study aimed to optimize the mobility and dispersion of nanoparticles to increase the inactivation efficiency of heterotrophic bacteria in urban sewage effluents. The experiment was carried out on Response Surface Methodology (RSM) and Central Composite Design (CCD) using Design Expert 10 software. Iron nanoparticles were synthesized in two types of carboxymethyl cellulose-coated and simple type. B-nZVI was introduced into the effluent with by pneumatic injection of nitrogen gas. CMC-nZVI was also mixed with a mixer in the effluent. Comparison of the results was done with two HPC and cellular molecular techniques (Genetic sequencing of 16s rRNA bacteria). The highest inactivation efficiency (90%) was observed in minute 23 for pneumonic injection of B-nZVI at a flow rate of 10 L / min. Finally, with the improvement of gas pressure and flow rate, the inactivation efficiency was recorded at 95.6% at 32 minutes. Final model obtained from this process agreed with the quadratic equation. General forecasting of the model was expressed by the correlation coefficient ($R^2=0.9447$) that made good fitness for the response data. The statistical significance was determined using Fisher's statistics ($F\text{-value}=13.29$). For optimal use of nZVI in the inactivation of urban wastewater heterotrophic bacteria, nZVI can be injected into the wastewater by pneumatic injection in two steps with an inert gas such as nitrogen. In the nZVI pneumatic injection, the efficiency of deactivating bacteria in urban wastewater treatment plants was about 17% to 39% better than that of the coated-nZVI such as CMCs.

Keywords: Nanoparticles of Zero-Valent Iron, Disinfection, Pneumatic injection, Gas N₂, PCR.



بهینه‌سازی تحرک و پراکندگی نانو ذرات آهن صفر ظرفیتی در گندزدایی پساب شهری توسط تزریق پنوماتیک گاز نیتروژن

ناصر مهرداد^۱، غلامرضا نبی‌بدهندی^۱، مجید بغدادی^۲، رحیم عالی^۳، جابر یگانه^۴

۱- استاد گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده محیط زیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران
 ۲- استادیار گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده محیط زیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران
 ۳- استادیار گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
 ۴- دانشجوی دکتری تخصصی مهندسی محیط زیست- آب و فاضلاب، پردیس بین‌الملل ارس دانشگاه تهران، تهران، ایران
 (نویسنده مسئول) jabber.yeganeh@ut.ac.ir

(دریافت ۹۶/۴/۲۶ پذیرش ۹۶/۶/۲۵)

برای ارجاع به این مقاله به صورت زیر اقدام بفرمایید:

مهرداد، ن.، نبی‌بدهندی، غ.، بغدادی، م.، عالی، ر. یگانه، ج.، ۱۳۹۷، "بهینه‌سازی تحرک و پراکندگی نانو ذرات آهن صفر ظرفیتی در گندزدایی پساب شهری توسط تزریق پنوماتیک گاز نیتروژن" مجله آب و فاضلاب، ۲۹(۵)، ۲۷-۴۰. Doi: 10.22093/wwj. 2017.92649.2452

چکیده

پایدارسازی نانوذره آهن صفر ظرفیتی در محیط‌های آبی با پوشش‌های مختلف، کارایی آن را تا حدود زیادی کاهش می‌دهد. پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی تحرک و پراکندگی نانوذره برای افزایش راندمان غیر فعال‌سازی باکتری‌های هتروتروف پساب فاضلاب‌های شهری، انجام شد. طراحی آزمایش، به روش سطح پاسخ و متد مکعب مرکزی با استفاده از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت انجام شد. نانوذره آهن در دو نوع پوشش‌دار با کربوکسی متیل سلولوز و نوع ساده سنتز شد. B-nZVI با تزریق پنوماتیک توسط گاز نیتروژن وارد پساب شد و CMC-nZVI نیز توسط میکسر در پساب مخلوط شد. مقایسه نتایج با دو روش HPC و سلولی، مولکولی (ردیابی ژنتیکی توالی ۱۶ rRNA s باکتری‌ها) صورت گرفت. بیشترین راندمان غیر فعال‌سازی در تزریق پنوماتیک B-nZVI، توسط گاز نیتروژن در فلوی جریان ۱۰ لیتر در دقیقه مشاهده شد که به میزان ۹۰ درصد در ۲۳ دقیقه بود و نهایتاً با بهبود فشار و سرعت جریان گاز، راندمان غیرفعال سازی ۹۵/۶ درصد در ۳۲ دقیقه ثبت شد. مدل نهایی به دست آمده از این فرایند از معادله درجه دوم تبعیت می‌کند. پیش‌بینی کلی مدل با ضریب تعیین ($R^2=0.9447$) برازش بسیار خوبی با داده‌های پاسخ نشان داد و اهمیت آماری آن به وسیله آزمون آماری فیشر (F-value=13.29) مشخص شد. برای به کارگیری بهینه nZVI فرایند غیر فعال‌سازی باکتری‌های هتروتروف پساب شهری می‌توان nZVI را در دو مرحله از طریق تزریق پنوماتیک مخلوط nZVI با یک گاز بی اثر مانند نیتروژن به پساب وارد نمود. راندمان غیرفعال‌سازی باکتری‌های تصفیه‌خانه‌های پساب شهری در تزریق پنوماتیک nZVI نسبت به استفاده nZVI پوشش‌دار مانند CMC، ۱۷ تا ۳۹ درصد بهبود یافت.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات آهن صفر ظرفیتی، گندزدایی، تزریق پنوماتیک، گاز نیتروژن، PCR

۱- مقدمه

nZVI ساده^۱ از یک هسته آهن صفر و مخلوط اکسید آهن (II) و آهن (III) روی پوسته آن تشکیل می‌شود (Cook, 2009, Li and Zhang, 2006, Martin et al., 2008, Nurmi et al., 2005, Barreto-Rodrigues et al., 2017)

نانوذره آهن صفر ظرفیتی (nZVI) بسیار واکنش‌پذیر است (Ponder et al., 2000, Liu et al., 2017) و عمده‌ترین روش تولید آن احیای شیمیایی بر اساس استخراج از بوروهیدرید سدیم است (Yari et al., 2016, Zhang, 2003).

¹ Bare nZVI



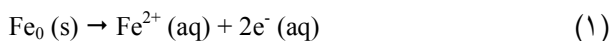
تجمع و رسوب نانوذرات بر روی سطح ریشه گیاه منجر به مسدود شدن مجاری جذب آب و مواد غذایی می‌شود (El-Temsah and Joner, 2012, Ma et al., 2013). در نهایت nZVI به Fe_2O_3 و Fe_3O_4 تبدیل می‌شود که به‌طور بالقوه برای محیط زیست خطری ندارد و به وفور بر روی زمین وجود دارد (Cook, 2009).

در برخی پژوهش‌ها نانوذرات به‌صورت میکرو و نانوپودر (نه دوغاب) استفاده شده‌اند که با این روش حجم مواد مصرفی به‌طور قابل توجهی کاهش یافته است (Muller and Nowack, 2010, Deng and Bradley, 2016). از طرفی چون نانوذرات آهن صفر به‌شدت واکنش‌پذیر هستند و در مجاورت هوا سریعاً اکسید می‌شوند، در تزریق پنوماتیک نانوپودرها در محیط‌های مختلف، استفاده از یک گاز بی اثر مانند نیتروژن الزامی است (Deng and Bradley, 2016). پژوهش‌های مربوط به آب‌های زیرزمینی یا محیط‌های آبی نیز از گاز نیتروژن تحت فشار ۱ تا ۲ بار استفاده شده است (Muller and Nowack, 2010, Cook, 2009, Su et al., 2013, Kleineidam et al., 2016, Deng and Bradley, 2016). در این پژوهش برای اولین بار، افزایش تحرک و پراکندگی نانوذره آهن صفر در پساب فاضلاب‌های شهری توسط تزریق پنوماتیک گاز نیتروژن، به‌منظور افزایش راندمان حذف باکتری در کمترین زمان ممکن بررسی شد.

ابزار مناسب بررسی راندمان غیر فعال‌سازی و گندزدایی باکتری‌ها، سنجش حضور باکتری‌های هتروتروف "کلیفرم‌های کل و کلیفرم‌های گوارشی" است (Zhang et al., 2015, Bartram et al., 2004). امروزه استفاده از روش‌های مبتنی بر ژنتیک مولکولی و توالی‌های DNA جایگزین شیوه‌های سنتی غیر مبتنی بر ژنتیک مولکولی شده است (Blake et al., 1984, Lee et al., 1996, Kaufmann et al., 1997, Chiang et al., 2015). استخراج DNA (توالی ۱۶S rRNA) و تعیین غلظت آن به‌روش دنسیتومتری و چگالی نوری (OD) از جمله روش‌های مبتنی بر ژنتیک مولکولی است که در این پژوهش برای تعیین جمعیت باکتری‌های هتروتروف در سنجش کارایی نانوذرات به‌کار رفت (Aellen et al., 2006).

در پژوهش حاضر به‌منظور تعیین توانمندی تزریق پنوماتیک B-nZVI توسط گاز نیتروژن به پساب شهری طراحی

توانمندی nZVI در از بین بردن آلاینده‌های آلی، باکتری‌ها و برخی از آلاینده معدنی در درجه اول مربوط به خاصیت اهدای الکترون دهندگی آن است (Agarwal and Patel, 2015, Mukherjee et al., 2016).



پتانسیل زتای این ترکیب نسبتاً پایین است ($-30\text{mv} \pm 3\text{mv}$) و ذرات ناپایدار آن می‌توانند در یک محلول آبی پایدار و بی حرکت شوند (Huber, 2005). پراکندگی و تحرک نانوذرات در محلول زمینه در برابر دو فرایند هم‌آوری^۱ و ته‌نشینی^۲ در پژوهش‌های مختلف تشریح شده است (Ponder et al., 2000, Fu et al., 2014).

پژوهش زیادی در زمینه مهندسی نانوذرات آهن صفر ظرفیتی فعال با نیمه عمر بالا انجام شده است و پایداری آن در حضور پوشش‌های مختلف سطحی از قبیل از تیول‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، سیلیکا، سورفکتانت‌ها، پلیمرها و غیره مورد بررسی قرار گرفته است (Nadagouda et al., 2010, Mukherjee et al., 2016, Wang et al., 2017).

مکانسیم حذف باکتری‌ها توسط نانوذرات آهن صفر ظرفیتی، آسیب فیزیکی و اختلال در یکپارچگی غشای سلولی، تراوش محتویات داخل سلولی، آسیب پروتئین‌های باکتری و DNA و تداخل با تنفس باکتری می‌باشد (Lee et al., 2008, Diao and Yao, 2009, Fajardo et al., 2016). برخی پژوهشگران این سمیت را اعمال یک سری تنش اکسیداتیو توسط رادیکال‌های آزاد شده می‌دانند (Tran et al., 2008, Auffan et al., 2010).

استفاده از این نانوذرات پوشش‌دار منجر به افزایش مدت زمان گندزدایی پساب‌ها و آبها، از چند دقیقه (۱۰ تا ۲۰ دقیقه) به چند ساعت یا چند روز می‌شود که افزایش زمان ماند هیدرولیکی و افزایش حجم تأسیسات گندزدایی و تولید لجن در این گونه تأسیسات را در پی دارد. همچنین احتمال خروج نانوذرات از تأسیسات گندزدایی از طریق پساب و یا لجن و حضورشان در محیط زیست و تأثیرات منفی آنها نیز افزایش می‌یابد (Wyatt and Ferry, 2007, Wiesner et al., 2006, Vance et al., 2015).

¹ Aggregation

² Settling



آزمایش‌ها مبتنی بر آزمایش‌های مقدماتی در دو دسته جداگانه برای B-nZVI با تزریق پنوماتیک توسط گاز نیتروژن و اختلاط CMC-nZVI توسط میکسر در پساب انجام شد. به منظور تعیین راندمان عملکرد هر دو روش، مقایسه نتایج نیز با دو روش HPC و سلولی، مولکولی (ردیابی ژنتیکی توالی 16S rRNA باکتری‌ها) صورت گرفت. طراحی آزمایش، به روش سطح پاسخ^۱ و متد مکعب مرکزی^۲ با استفاده از نرم‌افزار Design Expert 10 انجام شد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد مصرفی

NaBH₄ و FeCl₃.6H₂O محصول شرکت مرک^۳ آلمان و CMC Na-محصول شرکت نیپون^۴ ژاپن به فرمول [C₆H₇O₂(OH)_x(OCH₂COONa)_y] با جرم مولکولی ۱۷۵/۱۴ و درجه جایگزینی ۰/۲ تهیه شد. محیط کشت به کار گرفته شده از نوع R2A محصول شرکت مرک آلمان بود. گاز نیتروژن مورد استفاده با خلوص ۹۹/۹۹ (شرکت گازهای طبی اکسیژن ارومیه) تهیه شد. برای انجام آزمون‌های میکروبی از باکتری‌های هتروتروف پساب خروجی سیستم تصفیه فاضلاب SBR استفاده شد. کیت‌های استخراج DNA باکتری‌ها و پلاسمیدهای آنها از طریق کیت‌های استخراج شرکت یکتا تجهیز آزما^۵ ساخت ایران تهیه شد.

۲-۲- تهیه محیط کشت

برای تهیه محیط کشت باکتری‌های هتروتروف از روش HPC استفاده شد. در این روش ۱۵ گرم در لیتر از محیط کشت R2A در آب مقطر تهیه شد و بعد از استریلیزاسیون در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ بار و زمان ۱۵ دقیقه، ماده ضد قارچ نیستاتین^۶ در پلیت‌های استریل اضافه شد تا آماده کشت شوند (Nikolaou et al., 2007, Martinez et al., 2008).

۲-۳- سنتز nZVI

برای سنتز CMC-nZVI، آب دوبار تقطیر، اتانول و CMC با غلظت ۰.۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار با کلرید آهن هیدراته

۲-۴- آزمایش‌های غیرفعال سازی

طراحی آزمایش‌ها برای هر دو روش توسط نرم‌افزار Design Expert 10 و به روش RSM و متد CCD انجام شد (Ravikumar et al., 2016)

این روش برای مدل‌بندی و تحلیل مسائلی مفید است که پاسخ مورد نظر از چندین متغیر تأثیر می‌پذیرد. تعداد آزمایش‌ها برای یافتن نواحی بهینه پاسخ ۲۰ آزمایش برای هر طراحی به دست آمد. نقاط مرکزی آزمایش‌ها، سه عامل غلظت CMC، زمان، فلوی جریان که متغیرهای مستقل و تأثیرگذار بودند و نقاط محوری (nZVI) نیز با چند آزمایش ابتدایی قبل از طراحی آزمایش مشخص شدند، به طوری که عملکرد راکتور بازده معنی‌داری داشته باشد. جدول ۱ متغیرهای مستقل و محوری طراحی آزمایش‌ها به روش مرکب مرکزی را نشان می‌دهد. کلیه آزمایش‌های غیرفعال‌سازی در دمای اتاق و در سه مرحله انجام شد. در آزمایش‌ها مربوط به CMC-nZVI، نانوذره سنتز شده با CMC در غلظت‌های ۰.۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار به میزان ۲۰ میلی‌گرم در لیتر به پساب تزریق و اختلاط با شدت ۲۴۰ rpm صورت گرفت. در زمان‌های ۵ و ۱۰ و ۲۰ و ۶۰ دقیقه، به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از پساب حاصل نمونه‌برداری شد.

در آزمایش‌های مربوط به B-nZVI، پایلوت تزریق پنوماتیک نانوذره طراحی شد که شامل کپسول ۱۵ لیتری گاز نیتروژن، دستگاه فشار شکن، دستگاه مانومتر و تنظیم‌کننده فلوی جریان گاز و یک قطعه انژکتور با قابلیت تزریق مواد پودری در جریان گاز بود. شکل ۱ تصویر و مشخصات پایلوت تزریق پنوماتیک نانوذره توسط گاز ازت را نشان می‌دهد. برای انجام آزمایش در هر

¹ Response Surface Methodology (RSM)

² Central Composite Design (CCD)

³ Merck

⁴ Nipon

⁵ Yektatajhezma (YTA)

⁶ Nystatin



جدول ۱- متغیرهای مستقل آزمایش‌ها به روش سطح پاسخ

Table 1. Independent variables of tests by response surface methodology

Independent variables	Unit	Code	Low surface	Average surface	High surface
Experiment design for CMC-nZVI					
NZVI	mg/L	A	19.5	20	20.5
CMC	mmol	B	25	50	100
time	min	C	0	30	60
Experiment design for pneumatic injection of B-nZVI with N₂ gas					
NZVI	mg/L	A	19.5	20	20.5
N ₂ Gas flow rate	L/min	B	2	6	10
time	min	C	0	30	60

انجام شد و سوپرناتانت آن به منظور انجام سایر مراحل به لوله فالکون منتقل شد.

فلوی جریان پیشنهادی توسط دیزاین اکسپرت به مقدار ۲۰ میلی‌گرم در لیتر B-nZVI در محفظه انژکتور و توربلانت وارد شد و با استفاده از ترمینال تنظیم کننده شدت جریان گاز، سرعت جریان گاز در سه فلوی جریان ۲، ۶ و ۱۰ لیتر در دقیقه و فشار ۲ بار تنظیم شد. تزریق نانوذره تحت فشار پنوماتیک گاز نیتروژن به داخل پساب انجام و در زمان‌های ۵ و ۱۰ و ۲۰ و ۶۰ دقیقه، به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از پساب برداشت شد. به منظور جداسازی نانوذره از باکتری‌ها بر اساس تفاوت جرم حجمی باکتری و نانوذره، بلافاصله سانتریفوژ با شدت ۳۰۰۰ rpm

۲-۵- استخراج DNA و دنیسیتومتری نوری (OD)

استخراج DNA باکتری‌ها مستقیماً از نمونه‌های فاضلاب خام، پساب تصفیه شده و نمونه‌های برداشت شده بعد از عملیات تزریق nZVI انجام گرفت. به این منظور مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌ها در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ، سوپرناتانت تخلیه و جرم باقیمانده به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد و عملیات

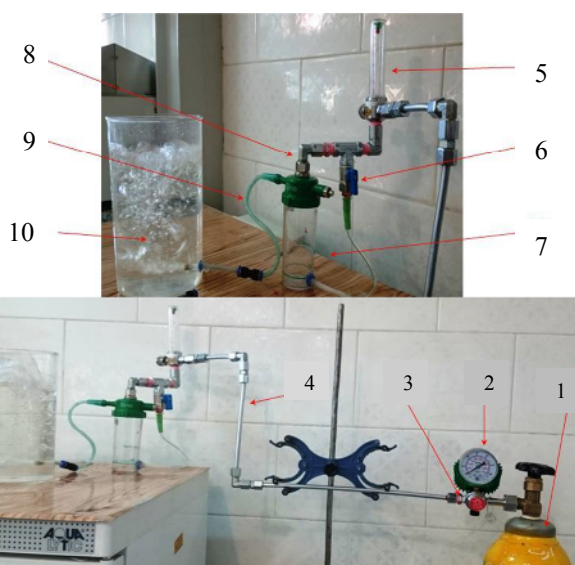


Fig. 1. nZVI pneumatic injection system by N₂ gas

1. Gas cylinder N₂ 2. Nanometer 3. Regulator 4. Pneumatic tubes 5. Flow meter for gas flow 6. Duct for turbulence of nanoparticles 7. Nanoparticle tank 8. Gas entering the reservoir 9. Mixing of nanoparticles and gas for injection into a tank 10. Wastewater Tank

شکل ۱- پابلوت تزریق پنوماتیک nZVI به توسط گاز N₂

۱- سیلندر گاز N₂، ۲- مانومتر، ۳- رگولاتور، ۴- لوله‌کشی پنوماتیک، ۵- فلومتر جریان گاز، ۶- شیر و گاز تقویت توربلانت نانوذره، ۷- مخزن نانوذره، ۸- گاز ورودی به مخزن، ۹- مخلوط N₂ و نانوذره در حال تزریق به تانک، ۱۰- تانک پساب



برای محاسبه تعداد مولکول‌های DNA در غلظت به دست آمده نیز بر اساس میانگین وزنی یک جفت باز DNA که در حدود ۶۵۰ دالتون می‌باشد از معادله زیر استفاده شد

$$N_{DNA} = \frac{C_{DNA} \times (6.022 \times 10^{23})}{L_{DNA} \times 650 \times (1 \times 10^9)} \quad (۴)$$

که در این معادلات

CDNA غلظت DNA اندازه‌گیری شده بر حسب نانوگرم، LDNA طول DNA الگو بر حسب کیلوباز^۱ و NDNA تعداد مولکول‌های DNA موجود در غلظت مشخص است.

به منظور انجام آزمون‌های کنترلی و اطمینان از نتایج روش‌های استخراج DNA مبتنی بر روش‌های سلولی مولکولی و ژنتیکی، کشت باکتری‌های هتروتروف و تعیین غلظت باکتری‌ها در پساب حاصل بر اساس cfu/ml نیز انجام شد. کلیه کشت‌ها به صورت دوبار تکرار و به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه سانتریفوژ شده بر روی پلیت‌های حاوی R₂A منتقل شد. انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انجام و به کمک کلنی‌کنتر کلنی‌های رشد یافته شمارش و ثبت شد. تلقیح نمونه‌های شاهد نیز با رقت ۱۰^{-۱} و ۱۰^{-۲} در شرایط مساوی و بدون افزودن نانوذرات صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

مشخصه‌یابی CMC-nZVI و B-nZVI توسط تحلیل پراش پرتو ایکس و مورفولوژی سطح بستر خام نیز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM بررسی شد. شکل‌های ۲ و ۳ تصویر SEM و XRD نانوذره آهن صفر به کار رفته در این پژوهش را نشان می‌دهد. خواص ضد میکروبی نانوذره آهن صفر ظرفیتی ساپورت شده با کربوکسی میتل سلولز در درصدهای وزنی مختلف، با خاصیت ضد میکروبی نانوذره آهن صفر پوشش نیافته در فلوی جریان و فشار مختلف گاز نیتروژن به منظور تعیین اثر پایدارسازی بررسی شد.

استخراج DNA طبق پروتکل کیت استخراج YTA انجام شد. به منظور اطمینان از استخراج مناسب DNA و تعیین وضعیت آلودگی نمونه‌ها از سکانس 16s rRNA (دارای یک منطقه مشترک ثابت در بین تمام گونه‌های باکتریایی) استفاده شد. تکثیر این قطعه ژنی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی-GTTTGATCCTGGCTCAG-3' (F:5'-TACCTGTTACGTTCA-3') و (R: 5'-) با استفاده از روش آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) کیفی انجام شد (Ehrmann et al., 2003). برنامه مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر (XP Thermal Cycler England) مطابق برنامه واسرشت اولیه (دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه)، واسرشت (دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه)، اتصال (دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱/۳ دقیقه)، طویل شدگی (دمای ۷۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه) انجام شد. نتایج به دست آمده از PCR روی ژل آگار ۱/۵ درصد حاوی DNA Safe Stain منتقل و در دستگاه الکتروفورز با جریان ۱۰۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه الکتروفورز شد. ژل الکتروفورز شده در دستگاه الکترو لومیناتور Syngene gel doc G:BOX LF عکس برداری و آنالیز شد.

بعد از تخلیص DNA، غلظت DNA به دست آمده به روش اسپکتروفتومتری و مقدار DNA با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (Ependorf) در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر محاسبه و ثبت شد (Le et al., 2014). تعیین غلظت DNA تخلیص شده با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر از معادله زیر محاسبه شد

$$C_{DNA} (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} \times 50 \times 100 \quad (۲)$$

برای تعیین وجود ناخالصی ناشی از حضور پروتین، میزان جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر نیز اندازه‌گیری شد و با استفاده از معادله زیر نسبت جذب بین دو طول موج مقایسه و حضور و عدم حضور پروتین همراه با DNA تفسیر شد

$$\frac{OD_{260}}{OD_{280}} = 1.8 \pm 1 \quad (۳)$$

^۱ Kilobase pair



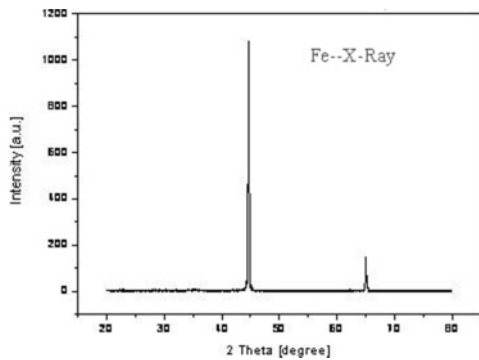


Fig. 3. The XRD image of nZVI used in this study
 شکل ۳- تصویر XRD نانوذرات آهن صفر ظرفیتی به کار گرفته شده در این پژوهش

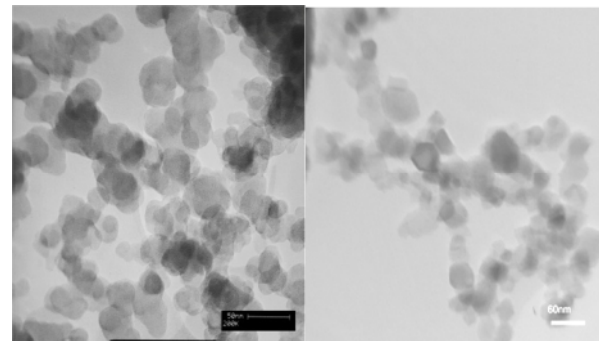


Fig. 2. The SEM image of nZVI used in this study
 شکل ۲- تصویر SEM نانوذرات آهن صفر ظرفیتی به کار گرفته شده در این پژوهش

کارایی آن در غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها می‌شود. برای پیش‌بینی رفتار CMC- nZVI و یا B-nZVI و اخذ پاسخ (راندمان غیر فعال سازی) مناسب، یک معادله چند جمله‌ای درجه دوم تعریف می‌شود

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^k a_i x_i + \sum_{i=1}^k a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k a_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (5)$$

که در این معادله

a_0 و a_i مقدار ثابت، a_i ضریب خطی، a_{ii} ضریب درجه دوم، a_{ij} ضریب اثر متقابل، x_i متغیر مستقل، k تعداد متغیرها و ε خطای همراه می‌باشد.

۳-۱- اثر زمان و غلظت CMC-nZVI

دنسی‌متری نوری DNA نمونه‌های پساب بعد از تزریق CMC-nZVI در سه غلظت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار در زمان‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۶۰ دقیقه بر حسب OD $\mu\text{l}/\text{ng}$ نرم‌افزار Expert آنالیز شد. شکل ۵ مربوط به نمودارهای سطح پاسخ اثرات افت وزنی CMC در مقادیر مرکزی متغیر زمان است. آنالیز واریانس ANOVA نشان می‌دهد که همبستگی مستقیم بین میزان کاهش CMC و راندمان غیر فعال‌سازی باکتری‌ها توسط nZVI طول زمان وجود دارد. با افزایش غلظت CMC درصد حذف کاهش می‌یابد. بالاترین میزان حذف باکتری‌ها از پساب با راندمان ۵۷ تا ۷۹ درصد از دقیقه ۴۰ به بعد اتفاق افتاد. مقدار ضریب تعیین

نتایج حاصل از کشت‌های میکربی به روش HPC و نتایج حاصل از تخلیص DNA باکتری و آزمایش PCR نشان داد که DNA باکتری با کیفیت بالایی استخراج و خالص‌سازی شده است. شکل ۴ تصویر نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز که به منظور اطمینان از صحت تخلیص DNA ژل، الکتروفورز شده‌اند را نشان می‌دهد. تصویر باندهای تشکیل شده در ژل الکتروفورز در موقعیت ۱۴۲۰ جفت باز در شکل نشان داده شده است.

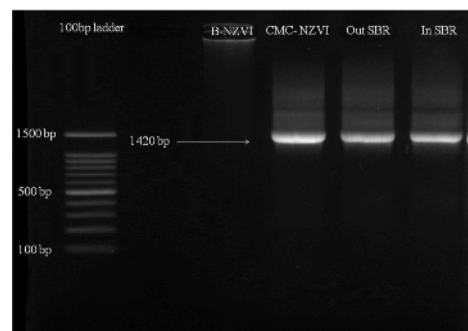


Fig. 4. Results of gel electrophoresis of PCR product for identification of sewage bacteria (columns for sewage bacteria entering the treatment plant, effluent from the treatment plant, CMC-nZVI and B-nZVI injection and Ladder)

شکل ۴- تصویر ژل نتایج الکتروفورز محصول PCR برای شناسایی باکتری‌های فاضلاب (ستون‌ها مربوط به باکتری‌های فاضلاب ورودی به تصفیه‌خانه، پساب خروجی از تصفیه‌خانه، تزریق CMC-NZVI و B-NZVI و لدر)

حضور مواد ساپورت کننده باعث کاهش راندمان غیر فعال‌سازی باکتری‌ها توسط NZVI می‌شود. از طرفی خاصیت تجمع‌پذیری nZVI نیز باعث افزایش اندازه ذرات و کاهش



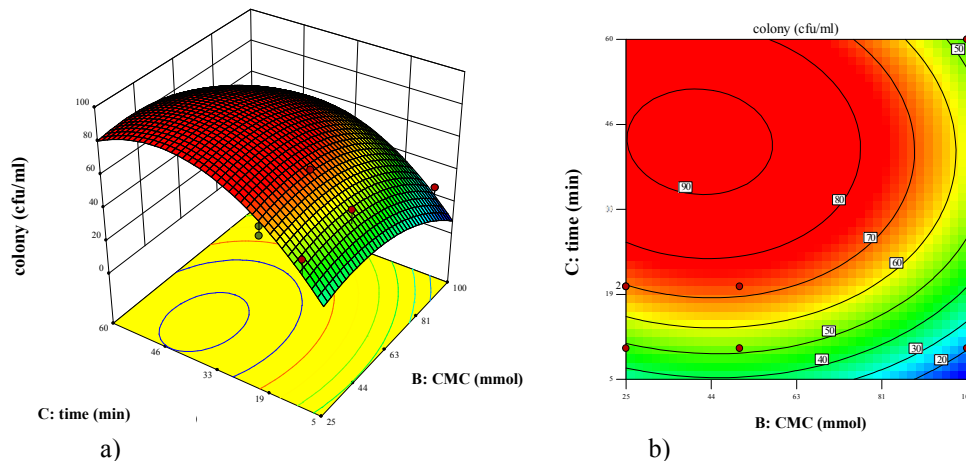


Fig. 5. Response surface methodology Chart - nZVI performance in various CMC moles for the removal of heterotrophic bacteria depending on the percentage of removal of OD

شکل ۵- نمودار سطح پاسخ کارایی nZVI در حضور CMC با غلظت‌های مختلف برای حذف باکتری‌های هتروتروف برحسب درصد حذف OD (a) نمودار سه بعدی (b) نمودار کنترولی

به‌دست آمدند. در شکل ۶- a میزان احتمال نرمال برحسب باقیمانده نشان داده شده است. این نمودار نشانگر تبعیت داشتن مقدار باقیمانده از توزیع نرمال است و نتایج مدل ارائه شده را قابل اعتماد ارزیابی می‌کند. شکل ۶- b نیز نمودار مقدار پیش‌بینی شده بر حسب مقادیر واقعی را برای پاسخ نشان می‌دهد. در این نمودار داده حول خط ۴۵ درجه بوده و پراکندگی منظم داده‌های حاصل از آزمایش معتبر بودن مدل انتخابی و قابلیت آن در پیش‌بینی نقاط آزمایش را نشان می‌دهد.

معادله رگرسیونی درجه دوم مدل نهایی به‌دست آمده از میزان حذف DNA باکتری‌های هتروتروف در حضور CMC با غلظت‌های مختلف به‌صورت زیر است A, B, C همان متغیرهای عملیاتی را نشان می‌دهند (جدول ۲)

(۶)

$$Y = +84.43 + 3.72A - 11.11B + 14.59C + 6.10AB + 3.21AC - 1.17BC - 4.44A^2 - 7.33B^2 - 13.79C^2$$

۳-۲- اثر زمان و فلوی جریان گاز

متغیرها و سطوح طبق اصول طرح مرکب مرکزی از داده‌های آزمایشگاهی اخذ و وارد نرم افزار شد. جدول ۳ نتایج آنالیز واریانس ANOVA برای درصد حذف DNA باکتری‌های هتروتروف از طریق تزریق پنوماتیک B-nZVI توسط گاز نیتروژن

($R^2=0.9320$) بیشتر از ۸/۰ بود که تطابق خوب بین نتایج محاسبه شده و پیش‌بینی شده را در محدوده آزمایش بیان می‌کند. در این مدل $F\text{-Value}=10.65$ و $p\text{-value}=0.0025$ می‌باشد و ۲۵/۰ درصد احتمال دارد که این مقدار F به دلیل اختلاف یا نویز باشد که حاکی از معنی‌دار بودن مدل است و ترم‌های CMC و زمان قابل توجه می‌باشند. $Pred\ R\text{-Squared}=0.6034$ نسبت به $Adj\ R\text{-Squared}=0.8445$ در شرایط مناسبی قرار دارد و تفاوت آن کمتر از ۲/۰ است. ضریب واریانس مدل ($C.V\%=16.42$) بود که مدل‌های با ضریب واریانس بزرگ‌تر از ۱۰ درصد تجدیدپذیر در نظر گرفته می‌شوند. دقت کافی مدل $AP=10.055$ که بزرگ‌تر از ۴ بوده و محدوده مقادیر پیش‌بینی شده را در نقاط طراحی نسبت به متوسط خطای پیش‌بینی شده مطلوب توصیف می‌کند. وجود رابطه معکوس بین میزان امولسیفایر به‌کار رفته با راندمان غیرفعال‌سازی باکتری را نشان می‌دهد. به‌طوری‌که افزایش درصد وزنی CMC منجر به کاهش سمیت نانوذرات نسبت به باکتری‌های هتروتروف شده است. این نتایج مطابق با یافته‌های سایر پژوهشگران است (Zarei et al., 2014). والدکار و همکاران نیز به نتایج مشابهی دست یافته‌اند که علت آنرا کاهش سرعت انتشار یون‌های آزاد شده از سطح نانوذرات پوشش یافته بیان کرده‌اند (Valodkar et al., 2012). به‌منظور اطمینان از تقریب کافی مدل از مجموعه واقعی، نمودارهای خطایاب مدل انتخابی به شرح شکل ۶



جدول ۲- نتایج آنالیز واریانس (آنوا) برای میزان DNA باکتری‌های هتروتروف (درصد) از طریق CMC-nZVI
Table 2. Analysis of variance (ANOVA) For DNA levels of heterotrophic bacteria (percentage) via CMC-nZVI

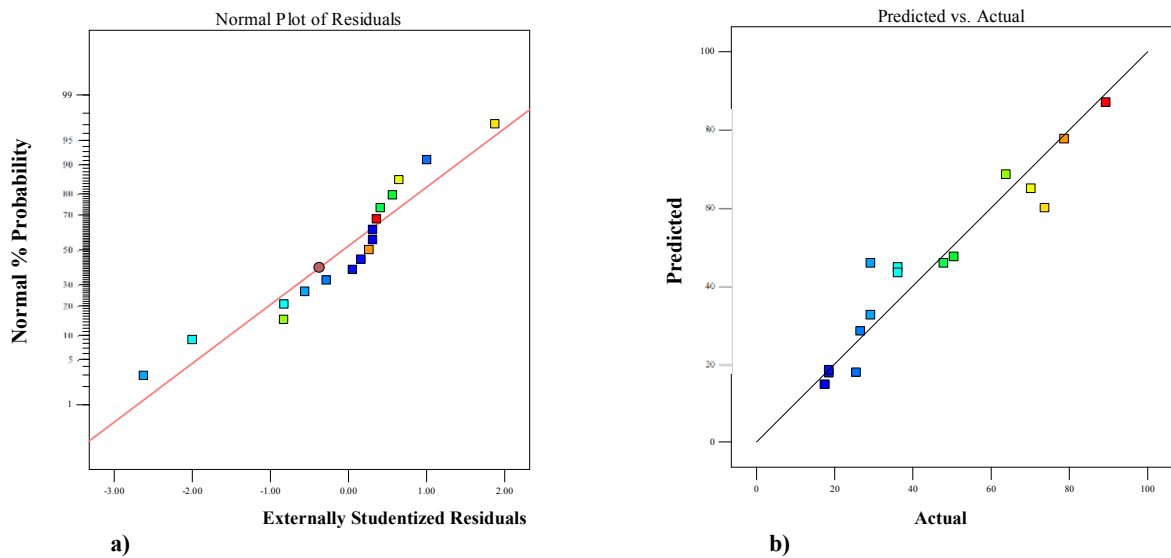
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	6866.83	9	762.98	10.65	0.0025	significant
A-nZVI	68.04	1	68.04	0.95	0.0622	
B-CMC	1154.19	1	1154.19	16.12	0.0051	
C-time	4134.68	1	4134.68	57.74	0.0001	
AB	166.88	1	166.88	2.33	0.1707	
AC	164.80	1	164.80	2.30	0.1730	
BC	36.43	1	36.43	0.51	0.4988	
A2	90.64	1	90.64	1.27	0.2977	
B2	435.54	1	435.54	6.08	0.0431	
C2	880.58	1	880.58	12.30	0.0099	
Residual	501.26	7	71.61			
Lack of Fit	487.11	6	81.19	5.74	0.3091	not significant
Pure Error	14.15	1	14.15			
Cor Total	7368.09	16				

جدول ۳- نتایج آنالیز واریانس (آنوا) برای میزان حذف DNA باکتری‌های هتروتروف (درصد) از طریق تزریق پنومونیک B-nZVI توسط گاز نیتروژن

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for DNA levels of heterotrophic bacteria (percentage) via pneumonic B-nZVI injection with nitrogen gas

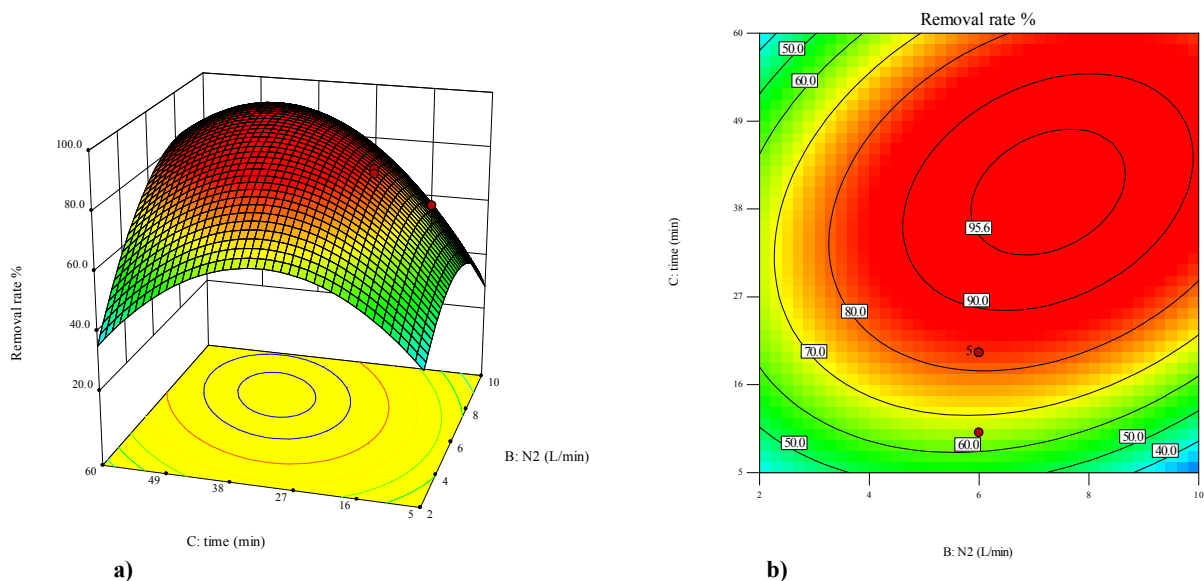
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	7385.45	9	820.61	13.29	0.0013	significant
A-nZVI	47.99	1	47.99	0.78	0.0473	
B-N ₂	576.08	1	576.08	9.33	0.0185	
C-time	1179.26	1	1179.26	19.10	0.0033	
AB	1.31	1	1.31	0.021	0.8882	
AC	1.07	1	1.07	0.017	0.8991	
BC	1560.17	1	1560.17	25.27	0.0015	
A2	52.30	1	52.30	0.85	0.3880	
B2	2396.49	1	2396.49	38.81	0.0004	
C2	1189.33	1	1189.33	19.26	0.0032	
Residual	432.24	7	61.75			
Lack of Fit	360.35	3	120.12	6.68	0.489	not significant
Pure Error	71.89	4	17.97			
Cor Total	7817.69	16				





شکل ۶- a) نمودار احتمال نرمال بر حسب غیر فعال سازی nZVI در حضور CMC (درصد) b) نمودار مقادیر پیش بینی شده بر حسب مقادیر واقعی

Fig. 6. a) Normal probability diagram in terms of nZVI inactivation in the presence of percent and b) Characteristics of the predicted values in terms of actual values



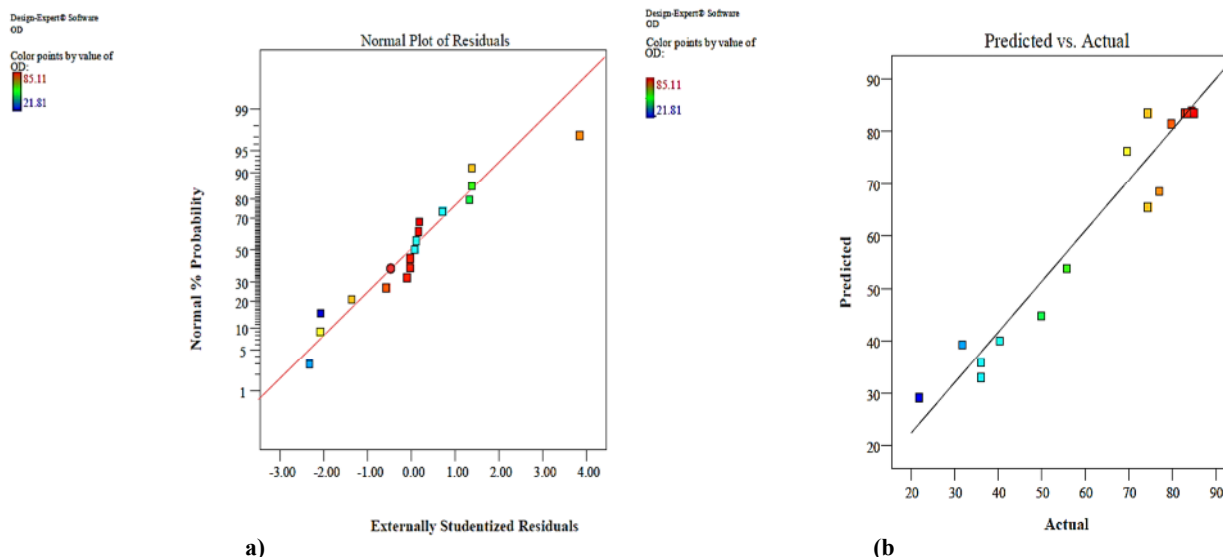
شکل ۷- نمودار طراحی آزمایش - نمودار سه بعدی : اثر متقابل متغیرهای سرعت جریان گاز نیتروژن و زمان بر کارایی nZVI در حذف باکتری های هتروتروف بر حسب درصد حذف OD (ng/μl) نمودار سه بعدی (a) نمودار کنتوری

Fig. 7. Response surface methodology Chart - nZVI performance for interaction of the variables nitrogen gas flow rate and time of operation in removal of heterotrophic bacteria as percentage of removal of OD (ng / μl) a) 3D chart b) chart

فیشسر (F-value=13.29) مشخص شد. این مدل دارای p-value=0.0013 است که کمتر از 0/05 بوده و حاکی از معنی دار بودن مدل است همچنین شانس اینکه این مقدار F به دلیل اختلال

را نشان می دهد. قابلیت پیش بینی کلی مدل توسط ضریب همبستگی ($R^2=0.9447$) بیان شد که برازش بسیار خوبی برای داده های پاسخ ایجاد کرد و اهمیت آماری آن به وسیله آزمون آماری





شکل ۸- (a) نمودار احتمال نرمال بر حسب غیر فعال‌سازی nZVI در حضور N_2 (درصد) (b) نمودار مقادیر پیش‌بینی شده بر حسب مقادیر واقعی

Fig. 8. a) Normal probability diagram in terms of nZVI inactivation in the presence of N_2 (percent) and b) Characteristics of the predicted values in terms of actual values

مستقیم با غیر فعال‌سازی نانوذره دارد. شکل ۸ به تشخیص مقدار یا گروهی از مقادیر که توسط مدل پیش‌بینی نشده است کمک می‌کند.

مدل نهایی به‌دست آمده این نمودار به شکل زیر است

$$Y = +97.84 - 2.01A + 8.42B + 11.90C + 0.40AB + 0.32AC + 13.96BC + 2.45A^2 - 19.55B^2 - 29.42C^2 \quad (7)$$

درجه اهمیت و تأثیرگذاری ترم‌های مهم مدل B^2 , BC , C , B و C^2 هستند که در این مدل B سرعت جریان گاز نیتروژن و C زمان است. این مقایسه نشان می‌دهد استفاده از گازهای خنثی می‌تواند فرایند تزریق نانوذرات را به پساب‌های فاضلاب بهبود بخشد. در این پژوهش بیشترین راندمان حذف و غیر فعال‌سازی باکتری‌های هتروتروف در پساب تصفیه‌خانه‌های فاضلاب ۹۵/۶ درصد بود که در فلوی جریان ۱۰ لیتر بر دقیقه و در مدت زمان ۳۲ دقیقه دیده شد.

۴- نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که شرایط مناسب برای ایجاد تحرک و پراکندگی نانوذرات آهن صفر ظرفیتی برای تزریق بهینه به پساب به‌منظور غیر فعال‌سازی باکتری‌ها، استفاده از گازهای بی اثر

یا نوبز باشد فقط ۱۳/۰ درصد است. اهمیت هر یک از ضرایب رگرسیون (مدل) نیز بر اساس آزمون t به‌دست آمد. دقت کافی^۱، محدوده مقادیر پیش‌بینی شده را در نقاط طراحی نسبت به متوسط خطای پیش‌بینی شده مقایسه می‌کند. اگر این نسبت از ۴ بزرگ‌تر باشد، مطلوب توصیف می‌شود. در این پژوهش، تناسب دقت $AP=9.119$ بود که بالاتر از ۴ است و تأیید می‌کند که مدل برای توصیف فضای طراحی قابل استفاده است. بنابراین معادله رگرسیون به‌خوبی داده‌های آزمایشگاهی را پوشش می‌دهد. این موضوع در شکل ۷-a به‌وضوح نشان داده شده است. ضریب وایانس این مدل نیز $(C.V=12.51)$ بزرگ‌تر از ۱۰ و تجدیدپذیر است که خود حاکی از پیری زود رس نانوذرات در مجاورت آب و سایر عوامل می‌باشد.

همانطور که شکل ۷ نشان می‌دهد فرایند غیر فعال‌سازی nZVI در اثر تزریق با N_2 در فلوی جریان ۲، ۶ و ۱۰ لیتر بر دقیقه ۹۰ درصد در دقیقه ۲۳ و ۹۵/۶ درصد در دقیقه ۳۲ بود. نرخ منفی نمودار بعد از دقیقه ۱۰ در فلوی جریان ۲ لیتر بر دقیقه آغاز فرایند پیری زودرس و کاهش خاصیت نانویی nZVI را نشان می‌دهد که می‌توان آن را به عدم توانایی سرعت جریان گاز نیتروژن به ایجاد اختلاط لازم نسبت داد. افزایش فلوی جریان و فشار گاز نسبت

¹ Adequate Precision (AP)



nZVI برای تصفیه آلودگی‌های هدف، و هزینه‌های کلی پروژه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برای حصول نتایج بهتر می‌توان تزریق دو یا چند مرحله‌ای انجام داد. البته برای حصول اطمینان بیشتر از تأثیر تزریق پنوماتیک B-nZVI توسط گاز نیتروژن در خواص ضد میکروبی آن، نیاز به پژوهش‌های بیشتر است.

۵- قدردانی

این پژوهش بخشی از رساله دکترا با عنوان "بهبودسازی حذف باکتری‌های مقاوم از طریق راکتورهای ناپیوسته متوالی (SBR) با استفاده از نانوذرات"، مصوب پردیس بین‌الملل دانشگاه تهران است. به این وسیله از شرکت آب و فاضلاب استان آذربایجان غربی، آزمایشگاه نانو دانشگاه پیام نور، آزمایشگاه‌های دانشکده علوم پزشکی خوی و ارومیه تقدیر و تشکر بعمل می‌آید.

با فلوی جریان و فشار بالا به شیوه تزریق پنوماتیک است. بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان بیان نمود که نانوذرات آهن صفر ظرفیتی خاصیت ضد میکروبی خود را در امولسیفایر CMC از دست می‌دهند، در حالی که می‌توان با تزریق پنوماتیک توسط گازهای بی اثر این خاصیت را تقویت نمود. خاصیت غیر فعال سازی نانوذرات آهن در حالت ساده و پوشش نیافته قوی تر از نانوذرات پوشش دار و ساپورت شده توسط کربوکسی متیل سلولز است. پوشش دادن نانوذرات با امولسیفایرهای مختلف از خاصیت ضد میکروبی آن می‌کاهد. در تزریق پنوماتیک توسط گازهای بی اثر، B-nZVI به دلیل واکنش پذیری بالا، دچار پیری زودرس می‌شود و در نتیجه تغییر اندازه به مقیاس میکرو و ماکرو، تا حد زیادی از میزان واکنش پذیری ذرات کاسته شده و یا به دلیل ته نشینی، از سیستم‌های آبی حذف می‌شوند که در نتیجه کاهش جرم

References

- Aellen, S., Que, Y.-A., Guignard, B., Haenni, M. & Moreillon, P. 2006. Detection of live and antibiotic-killed bacteria by quantitative real-time PCR of specific fragments of rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 1913-1920.
- Agarwal, M. & Patel, D. 2015. Modified zero valent iron (ZVI) nanoparticles for removal of manganese from water. *International Journal of Environmental Research*, 9, 1055-1068.
- Auffan, M., Achouak, W., Rose, J., Roncato, M.-A., Chanéac, C. & Waite, D. T. 2008. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*. *Environmental Science & Technology*, 42, 6730-6735.
- Barreto-Rodrigues, M., Silveira, J., Zazo, J. A. & 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.
- Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Fricker, C. & Glasmacher, A. 2004. Heterotrophic plate count measurement in drinking water safety management: Report of an expert meeting Geneva. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 241-247.
- Bhatia, S. 2016. Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. *Natural Polymer Drug Delivery Systems*, Springer.
- Blake, M., Johnston, K., Russell-Jones, G. & Gotschlich, E. 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Analytical Biochemistry*, 136, 175-179.
- Chiang, S., Martelotto, L. G. & Weigelt, B. 2015. Genomic applications in gynecologic malignancies. *Genomic Applications in Pathology*, 2015, 465-487.
- Cook, S. M. 2009. *Assessing the use and application of zero-valent iron nanoparticle technology for remediation at contaminated sites*, USEPA, Washington, DC, USA.
- Deng, T. & Bradley, M. S. 2016. Determination of a particle size distribution criterion for predicting dense phase pneumatic conveying behaviour of granular and powder materials. *Powder Technology*, 304, 32-40.



- Diao, M. & Yao, M. 2009. Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes. *Water Research*, 43, 5243-5251.
- Ehrmann, M. A., Müller, M. R. & Vogel, R. F. 2003. Molecular analysis of sourdough reveals *Lactobacillus mindensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 7-13.
- EL-Temsah, Y. S. & Joner, E. J. 2012. Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil. *Environmental Toxicology*, 27, 42-49.
- Fajardo, C., Costa, G., Nande, M. & Martin, M. 2016. Three functional biomarkers for monitoring the nanoscale zero-valent iron (nZVI)-induced molecular signature on soil organisms. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227, 201.
- Fu, F., Dionysiou, D. D. & Liu, H. 2014. The use of zero-valent iron for groundwater remediation and wastewater treatment: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 267, 194-205.
- Huber, D. L. 2005. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small*, 1, 482-501.
- Kaufmann, P., Pfefferkorn, A., Teuber, M. & Meile, L. 1997. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1268-1273.
- Kleineidam, A., Phillips, M., De veer, A. P. M. & Kollosche, J. 2016. Powder supply system and method for colour change in a powder supply system. Google Patents, Pub. Number: US20130019970A1.
- Le, S., Yao, X., Lu, S., Tan, Y., Rao, X., Li, M., et al. 2014. Chromosomal DNA deletion confers phage resistance to *Pseudomonas aeruginosa*, Scientific Reports, 4, Article number: 4738, doi: 10.1038/srep 047 38.
- Lee, C., Kim, J. Y., Lee, W. I., Nelson, K. L., Yoon, J. & Sedlak, D. L. 2008. Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environmental Science and Technology*, 42, 4927-4933.
- Lee, D.-H., Zo, Y.-G. & Kim, S.-J. 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3112-3120.
- Li, X.-Q. & Zhang, W.-X. 2006. Iron nanoparticles: The core-shell structure and unique properties for Ni (II) sequestration. *Langmuir*, 22, 4638-4642.
- Liu, A., Liu, J., Han, J. & Zhang, W.-X. 2017. Evolution of nanoscale zero-valent iron (nZVI) in Water: Microscopic and spectroscopic evidence on the formation of nano-and micro-structured iron oxides. *Journal of Hazardous Materials*, 322, 129-135.
- Ma, X., Gurung, A. & Deng, Y. 2013. Phytotoxicity and uptake of nanoscale zero-valent iron (nZVI) by two plant species. *Science of the Total Environment*, 443, 844-849.
- Martin, J. E., Herzing, A. A., Yan, W., Li, X.-Q., Koel, B. E. & Kiely, C. J. 2008. Determination of the oxide layer thickness in core-shell zerovalent iron nanoparticles. *Langmuir*, 24, 4329-4334.
- Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martínez-Solano, L. et al. 2008. A global view of antibiotic resistance. *Fems Microbiology Reviews*, 33, 44-65.
- Mukherjee, R., Kumar, R., Sinha, A., Lama, Y. & Saha, A. K. 2016. A review on synthesis, characterization, and applications of nano zero valent iron (nZVI) for environmental remediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46, 443-466.
- Müller, N. C. & Nowack, B. 2010. *Nano zero valent iron the solution for water and soil remediation*, Report of the ObservatoryNano, EMPA, Swiss.



- Nadagouda, M. N., Castle, A. B., Murdock, R. C., Hussain, S. M. & Varma, R. S. 2010. In vitro biocompatibility of nanoscale zerovalent iron particles (NZVI) synthesized using tea polyphenols. *Green Chemistry*, 12, 114-122.
- Nikolaou, A., Meric, S. & Fatta, D. 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1225-1234.
- Nurmi, J. T., Tratnyek, P. G., Sarathy, V., Baer, D. R., Amonette, J. E. & Pecher, K. 2005. Characterization and properties of metallic iron nanoparticles: Spectroscopy, electrochemistry, and kinetics. *Environmental Science and Technology*, 39, 1221-1230.
- Ponder, S. M., Darab, J. G. & Mallouk T. E. 2000. Remediation of Cr (VI) and Pb (II) aqueous solutions using supported, nanoscale zero-valent iron. *Environmental Science and Technology*, 34, 2564-2569.
- Ravikumar, K., Dubey, S., Chandrasekaran, N. & Mukherjee, A. 2016. Scale-up synthesis of zero-valent iron nanoparticles and their applications for synergistic degradation of pollutants with sodium borohydride. *Journal of Molecular Liquids*, 224, 589-598.
- Su, C., Puls, R. W., Krug, T. A., Watling, M. T., O'hara, S. K., Quinn, J. W. & Ruiz, N. E. 2013. Travel distance and transformation of injected emulsified zerovalent iron nanoparticles in the subsurface during two and half years. *Water Research*, 47, 4095-4106.
- Tran, N., Mir, A., Mallik, D., Sinha, A., Nayar, S. & Webster, T. J. 2010. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 277-283.
- Valodkar, M., Rathore, P. S., Jadeja, R. N., Thounaojam, M., Devkar, R. V. & Thakore, S. 2012. Cytotoxicity evaluation and antimicrobial studies of starch capped water soluble copper nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 201, 244-249.
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella JR, M. F., Rejeski, D. et al. 2015. "Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 21 (6), 1769-1780.
- Wang, Z., Choi, F. & Acosta, E. 2017. Effect of surfactants on zero-valent iron nanoparticles (NZVI) reactivity. *Journal of Surfactants and Detergents*, 20, 577-588.
- Wiesner, M. R. Lowry, G. V., Alvarez, P., Dionysiou, D. & Biswas, P. 2006. *Assessing the risks of manufactured nanomaterials*, ACS Publications, American Chemical Society, USA.
- Wyatt, M. D. & Ferry, J., 2007, *Nanomaterials—toxicity, health and environmental issues*, Edited by Challa SSR Kumar. Wiley Online Library.
- Zarei, R., Mosaferi, M., Soroush Barhagi, M., Khataee, A. & Asghari Jafarabadi, M. 2014. *E. coli* inactivation efficiency of zero-valent iron nanoparticles stabilized by carboxymethyl cellulose. *Journal of Health*, 5, 214-223.
- Zhang, S., Han, B., Gu, J., Wang, C., Wang, P., MA, Y., CAO, J. et al. 2015. Fate of antibiotic resistant cultivable heterotrophic bacteria and antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes. *Chemosphere*, 135, 138-145.

