مقایسه اثرات منابع کربن متانل، اتانل و سوکسینات در حذف بیولوژیکی نیترات پساب

عباس رضایی[1]، حاتم گودینی[2و3]، احمدرضا یزدانبخش[4]، غلامرضا موسوی[5]، علی خوانین[1]

1- دانشیار، گروه بهداشت محیط، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
2- دانشجوی دکتری بهداشت محیط، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
3- مربی، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
4- دانشیار، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
5- استادیار، گروه بهداشت محیط، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

یافته / دوره دهم / شماره 1 / بهار 87 / مسلسل 35

چکیده

دریافت مقاله: 86/11/10، ***پذیرش مقاله***: 87/1/21

Ø مقدمه: افزایش غلظت نیترات در منابع آب یک مشکل مطرح در بسیاری از نواحی دنیا می باشد. ورود ترکیبات حاوی نیتروژن به محیط می تواند مشکلاتی نظیر اتروفیکاسیون برای منابع آب و پتانسیل خطر برای سلامتی انسان بدلیل ایجاد بیماری متهموگلوبینما و سرطان را به همراه داشته باشد پس باید نیترات را از منابع آبی حذف کرد. در میان روش های توصیه شده برای حذف این عامل، حذف بیولوژیکی نیترات یک روش موثر برای حذف نیترات از پساب و آب می باشد.

Ø مواد و روش‌ها: در این تحقیق فرآیند حذف بیولوژیکی نیترات با استفاده از منابع مختلف کربن اتانل، متانل و سوکسینات در مقیاس آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. در این راستا، اثر تغییر نوع منبع کربن، غلظت اولیه نیترات، **pH** و میزان تلقیح اولیه باکتری ارزیابی شده است.

Ø یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داده است که از میان منابع کربن مورد آزمایش، باکتری *سودوموناس استوتزری* قادر به استفاده از متانل به عنوان منبع کربن نمی باشد. با استفاده از سوکسینات این باکتری قادر به حذف کامل نیترات با غلظت 200 میلی گرم بر لیتر بر حسب نیتروژن در دمای 28 درجه سانتیگراد، **pH**=7/2 و میزان تلقیح اولیه **CFU/ml** 3×10^8 می باشد. میزان نیتریت تولیدی در این فرآیند کمتر از 1 میلی گرم بر لیتر بر حسب نیتروژن بوده است.

Ø بحث و نتیجه‌گیری: باکتری *سودوموناس استوتزری* مورد استفاده در این مطالعه می تواند از اتانل نیز به عنوان منبع کربن در حذف بیولوژیکی نیترات استفاده نماید اما روند کاهش نیترات برای سوکسینات بهتر از اتانل بوده است.

Ø کلید واژه ها: حذف بیولوژیکی نیترات، منبع کربن، اتانل، متانل، سوکسینات

آدرس مکاتبه: ، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی
پست الکترونیک: abbasrezaee@yahoo.com

مقدمه

نیتروژن یکی از آلاینده های موجود در فاضلاب است که به اشکال نیتروژن آلی و غیر آلی در فاضلاب وجود دارد. پایدارترین حالت نیتروژن در آب و فاضلاب نیترات می باشد. بخش عمده نیتروژن در طی فرآیند تصفیه فاضلاب حذف می گردد. بخشی از نیترات ممکن است در پساب خروجی وجود داشته باشد که بر اساس مقررات موجود در این زمینه، نیاز به حذف آن می باشد. نیترات و نیتریت به عنوان شاخص های شیمیایی مهم در آب دارای اهمیت هستند. از نظر بهداشت عمومی نیترات می‌تواند باعث بروز مشکلاتی از قبیل متهموگلوبینمیا و سرطان گردد. همچنین مشکل زیست محیطی اتروفیکاسیون می تواند متعاقب ورود نیترات و فسفات با غلظت زیاد در آبهای محیطی ایجاد شود (1، 2).

با توجه به اثرات بهداشتی و محیطی که غلظت بالای نیترات در منابع آب بر جای می گذارد استانداردها و دستورالعملهایی در سطح بین المللی و ملی برای نیترات و نیتریت در منابع آب تدوین شده است. حداکثر غلظت مجاز نیترات-نیتروژن بوسیله سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا 10 میلی گرم بر لیتر یا توسط سازمان بهداشت جهانی و جامعه اقتصادی اروپا 50 میلی گرم بر لیتر بر حسب نیترات تعیین شده است(3). استانداردهای ایران، حداکثر مجاز نیترات در آب آشامیدینی را 45 میلی گرم در لیتر بر حسب نیترات و یا 10 میلی گرم در لیتر بر حسب نیتروژن تعیین نموده است (4). استاندارد نیترات در پساب خروجی فاضلاب جهت تخلیه به آبهای سطحی و چاه جاذب به ترتیب 50 و 10 میلی گرم در لیتر بر حسب نیترات می باشد. در سال های اخیر برای حذف نیترات از منابع آب، تکنولوژی های متنوعی پیشنهاد شده است. سیستم های الکتروشیمیایی- بیولوژیکی (6، 7)، راکتورهای غشایی (8)، راکتورهای منقطع متوالی (9)، حذف هوازی نیترات، حذف نیترات لیتوتروفیک، اکسیداسیون بی هوازی آمونیوم، سیستم ترکیبی حذف اتوتروفیک نیتروژن، فرآیند آنوماکس، فرآیند کانن (10، 11) از جمله این فرآیندها می باشد. تکنولوژی های حذف ترکیبات ازته به دو دسته روشهای فیزیکو شیمیایی مانند استفاده از فلزات احیاء کننده، استفاده از آنزیم ها، مبادله کننده های یونی، اسمز معکوس، الکترودیالیز و جذب سطحی) و روش های بیولوژیکی تقسیم می شوند. استفاده از هریک از این فرآیندها دارای معایب و محاسنی می باشند. روش های فیزیکی و شیمیایی عمدتاً گران بوده و از طرف دیگر تولید نمک می کنند که حذف این پسماندها خود مشکلات بعدی را به همراه دارد. از سوی دیگر روش های بیولوژیکی هزینه پایینی دارند و تولید باقیمانده زائد خطرناک نمی کنند. حذف نیترات از طریق فرآیند بیولوژیکی به طور گسترده تری در سراسر دنیا استفاده می شود (5). روش حذف نیترات با استفاده از باکتریهای هتروتروفیک بیشتر مطرح است (10، 12). در انتخاب نوع منبع کربن یک سیستم بیولوژیکی فاکتورهایی نظیر هزینه، سرعت حذف نیترات، سنیتیک ها و میزان مصرف باید مورد توجه قرار گیرد (12، 13). حذف نیترات هتروتروفیک یک فرآیند موثر در حذف نیترات می باشد که باکتری های هتروتروفیک نیترات و نیتریت را به گاز نیتروژن تبدیل می کنند. این فرآیند نیاز به منبع کربن آلی کافی (به عنوان الکترون دهنده) برای حذف کامل نیترات دارند(13).

متانل، اتانل و اسید استیک منابع معمول کربن برای حذف نیترات می باشند. هزینه این منابع کربن قسمت اساسی از هزینه های کل تصفیه می باشد. انواع منابع کربن جامد، مایع و گاز نظیر متانل، اتانل، اسید استیک، اسیدهای چرب، روزنامه، کاه، فیبرهای کتان، شکر، پلیمرهای غیر محلول قابل تجزیه بیولوژیکی، گرانول های پلی استر مصنوعی و مواد آلی طبیعی به عنوان منبع کربن مورد ارزیابی قرار گرفته اند (3، 13، 26). برخی از محققان نسبت بهینه کربن به نیتروژن با استفاده از منابع کربن آلی برای فرآیند حذف نیترات را تعیین نموده اند (13، 14، 26). سیستم های مشابه حذف بیولوژیکی نیترات، در

شرایط محیطی متفاوت و نوع میکروارگانیسم مختلف، نسبت های بهینه متفاوتی را برای کربن به نیتروژن دارند (12). برای نسبت کربن به نیتروژن مقادیر متفاوتی در منابع مختلف ذکر شده است اما بیشتر مطالعات مقدار بهینه نسبت کربن به نیتروژن را بین 3/5 تا 4/5 گزارش نموده اند (5). در مطالعات انجام شده عمدتاً از یک کنسرسیوم میکروبی و غلظت پایین نیترات و در آب آشامیدنی برای حذف نیترات استفاده شده است. بر اساس مطالعات انجام شده نوع و میزان حذف نیترات بستگی به نوع میکروارگانیسم، غلظت اولیه نیترات، نوع و مقدار منبع کربن و فاکتوهای دیگری دارد (10). در این تحقیق عملکرد باکتری هتروترفیک سودوموناس استوتزری جداسازی شده از تصفیه خانه شهری اکباتان تهران در استفاده منابع مختلف کربن متانل، اتانل و سوکسینات به منظور حذف غلظت های زیاد نیترات از پساب مصنوعی در شرایط محیطی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روشها

جداسازی باکتری های حذف کننده نیترات:

نمونه گیری از پسابهای تصفیه خانه های فاضلاب اکباتان، شوش و پتروشیمی رازی به منظور جداسازی باکتریهای حذف کننده نیترات صورت گرفت. نمونه ها به میزان 2 میلی لیتر در محیط کشت اختصاصی حذف کننده نیترات تلقیح شده و گرماگذاری گردیدند. باکتریهای رشد کرده در روی محیط براث به محیطهای کشت اختصاص آگار دار تلقیح گردیدند. کلنی های رشد کرده در محیط کشت جامد از نظر میزان حذف نیترات ارزیابی شدند و باکتریهایی با توان حذف نیترات انتخاب گردیدند. شناسایی اولیه باکتریهای حذف کننده نیترات جدا شده بر مبنای ارزیابی صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی صورت گرفت. شناسایی تکمیلی باکتریهای جدا شده بر اساس بررسی توالی 16S rRNA با استفاده از روش PCR انجام شد (15، 16، 25). باکتری سودوموناس استوتزری جدا سازی شده که توان حذف بیولوژیکی نیترات مطلوبی را داشت در مراحل مختلف این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

پساب مورد آزمایش:

پساب مصنوعی مورد استفاده در این تحقیق از آب شهری تهیه میگردید. مقادیر 93 و 18 میلی گرم در لیتر از K_2HPO_4 و K_2HPO_4 به عنوان بافر به منظور تامین pH مورد نظر به آب اولیه اضافه می شد (27). نیترات پتاسیم به منظور تامین غلظت های مختلف نیترات و متانل، اتانل و سوکسینات بعنوان منابع کربن استفاده می گردید. در این تحقیق نسبت COD به نیتروژن 4 به 1 در نظر گرفته می شد. تنظیم pH در مقادیر مختلف با استفاده از اسید کلریدریک و سود صورت گرفت.

بررسیهای آزمایشگاهی:

برای انجام این مطالعات از ویال های 120 میلی لیتری درپوش دار استفاده شده است. مقدار 50 میلی لیتر از پساب تهیه شده را در ویالهای مورد آزمایش ریخته و بیومس خالص تهیه شده از باکتری سودوموناس استوتزری جهت تلقیح باکتریائی استفاده گردید (15). تخلیه گاز اکسیژن ویالها و ایجاد شرایط انوکسیک با استفاده از گاز نیتروژن صورت گرفت (16). ویال های حاوی پساب در دمای 28 درجه سانتیگراد با سرعت 120 دور شیک می شدند (28). در زمانهای مختلف، تا 192 ساعت میزان کاهش نیترات و نیتریت اندازه گیری گردید. نمونه گیری از ویال ها با استفاده از سرنگ استریل صورت گرفت. شرایط کاملاً آنوکسیک حفظ شده و از باز کردن در ویال ها تا پایان عملیات اجتناب گردید. کلیه آزمایشات به صورت سه تایی انجام شده و نتایج به صورت میانگین گزارش شده اند.

اثر نوع منبع کربن:

اثر منابع کربن خالص متانل، اتانل و سوکسینات (شرکت مرک) در حذف غلظت ثابت 200 میلی گرم بر لیتر نیترات-نیتروژن مورد ارزیابی قرار گرفت. کربن اضافه شده از هر منبع به میزانی بود که نسبت COD به نیتروژن 4 به 1 تامین گردد (5).

تلقیح باکتری در داخل ویالها به میزان 3×10^8 CFU/ml بر مبنای استاندارد لوله های مک فارلند انجام شد. دمای 28 درجه سانتیگراد و pH=7/2 در طول آزمایشات تامین گردید.

اثر غلظت اولیه نیترات:

اثر غلظت اولیه نیترات در غلظت های 200، 400، 600 و 800 نیترات- نیتروژن و با استفاده از سوکسینات به عنوان منبع کربن بررسی گردید. پارامترهای دیگر (دمای 28 درجه سانتیگراد، pH =7/2 و میزان تلقیح 3×10^8 و زمان ماند 6 ساعت) ثابت در نظر گرفته شدند.

اثر pH:

به منظور بررسی اثر pH از غلظت 200 میلی گرم بر لیتر نیترات-نیتروژن، منبع کربن سوکسینات، دمای 28 درجه سانتیگراد و تغییرات pH معادل 5، 7/2 و 9 استفاده شد. در شروع فرآیند حذف نیترات، pH اولیه پساب موجود در هر ویال با استفاده از سود و اسید کلریدریک در مقادیر مورد نظر تنظیم می گردید.

اثر میزان تلقیح باکتری حذف کننده نیترات:

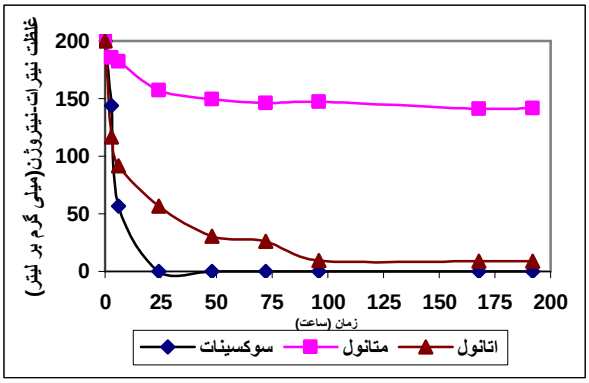
برای بررسی غلظت اولیه باکتری های حذف کننده نیترات، از منبع کربن سوکسینات، pH=7/2، دمای 28 درجه سانتیگراد و غلظت اولیه نیترات 200 میلی گرم بر لیتر استفاده و با تغییر غلظت اولیه باکتری ($1/5\times10^8$، 3×10^8، $4/5\times10^8$، 6×10^8 CFU/ml) اثر تلقیح اولیه مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش های اندازه گیری:

اندازه گیری غلظت های نیترات و نیتریت بر مبنای روش اسپکتروفتومتری با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل Unico UV-2100 مطابق کتاب استاندارد متد صورت گرفت (17). تمام نمونه ها قبل از اندازه گیری از صافی 0/22 میکرونی عبور داده شدند(15). اندازه گیری غلظت باکتریایی تلقیح شده بر مبنای روش کدورت سنجی با لوله های استاندارد مک فارلند انجام شد. میزان pH با استفاده از دستگاه pHمتر HANNA مدل HI8521 اندازه گیری گردید. همه مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت مرک تهیه شده بود.

یافته ها

در مطالعه انتخاب منبع کربن مناسب برای حذف بیولوژیکی نیترات پساب با غلظت بالای نیترات، متانل، اتانل و سوکسینات به عنوان سوبسترا مورد آزمایش قرار گرفتند. در این آزمایشات غلظت اولیه محلول حاوی 3×10^8 CFU/ml باکتری سودوموناس استوتزری, دما 28 درجه سانتیگراد و pH =7/2 تنظیم شده بودند. روند حذف نیترات از پساب با غلظت 200 میلی گرم بر لیتر نیترات-نیتروژن برای منابع مختلف کربن در شکل 1 نشان داده شده است (شکل 1).

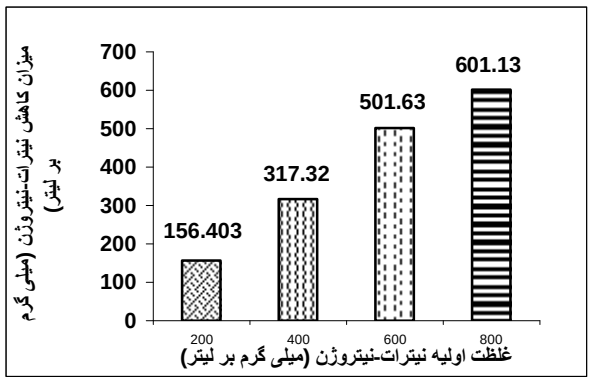


شکل شماره 1- اثر منابع کربن اتانل، متانل و سوکسینات در حذف بیولوژیکی نیترات

میزان حذف نیترات به ترتیب برای متانل، اتانل و سوکسینات 58/13، 191/35 و 200 میلی گرم بر لیتر برحسب نیتروژن یعنی معادل 29، 96 و 100 درصد حذف بوده است. روند کاهش نیترات در استفاده از متانل بسیار کند بوده که این امر نشان دهنده این است که متانل نمی تواند به عنوان منبع کربن برای سودوموناس استوتزری مورد استفاده قرار گیرد. میزان حذف نیترات توسط سودوموناس استوتزری با منبع کربن اتانل در مقایسه با سوکسینات کندتر است اما اتانل در مقایسه با متانل می تواند عمل حذف نیترات را بهتر انجام دهد. استفاده از سوکسینات و اتانل به عنوان منبع کربن نشان داد که میزان نیتریت تولیدی کمتر از 1 میلی گرم بر

لیتر بر حسب نیتروژن بوده است. این مقدار با استانداردهای تدوین شده در این زمینه مطابقت می نماید (3و4).

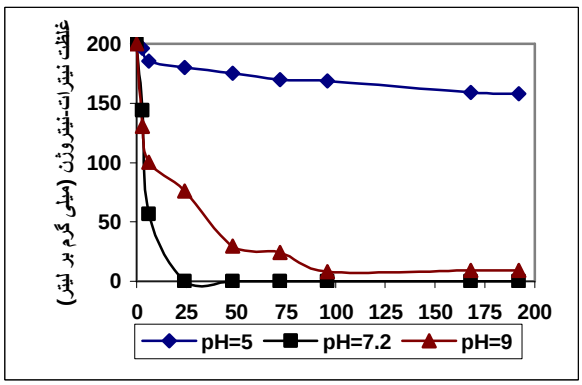
میزان کاهش نیترات- نیتروژن در طی فرآیند حذف نیترات با استفاده از باکتری سودوموناس استوتزری در غلظت 3×10^8 CFU/ml، زمان ماند 6 ساعت، pH= 7/2، درجه حرارت 28 درجه سانتیگراد، منبع کربن سوکسینات و در غلظت های اولیه مختلف 200، 400، 600 و 800 میلی گرم بر لیتر در شکل 2 نشان داده شده است. با افزایش غلظت اولیه میزان حذف نیترات افزایش یافته است. نتایج تحقیق نشان می دهد که این باکتری با منبع کربن سوکسینات می تواند غلظت های خیلی بالا از نیترات را به میزان مطلوبی کاهش دهد (شکل 2).



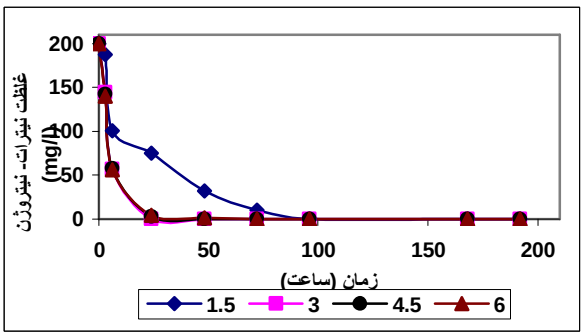
شکل شماره 2- کاهش نیترات در غلظت های اولیه مختلف

pH نقش مهمی در فرآیند حذف بیولوژیکی نیترات دارد. حذف نیترات می تواند در دامنه pH از 4 تا 11 انجام شود. اما بیشتر باکتری های حذف کننده نیترات اندکی بازوفیل بوده و pH بهینه برای رشد آنها 7/5 تا 8/5 می باشد (22) (شکل 3). مقادیر محتلف pH (5، 7/2 و 9) در ویالهای 120 میلی لیتری با نسبت COD به نیتروژن ثابت 4 به 1 و با استفاده از سوکسینات به عنوان منبع کربن و غلظت اولیه 200 میلی گرم بر لیتر نیترات-نیتروژن در دمای 28 درجه سانتیگراد مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر pH با استفاده از اسید کلریدریک و سود 1 مول بر لیتر تنظیم شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده که در pH=9 روند حذف نیترات به کندی انجام گرفته و غلظت نیترات از 200 میلی گرم بر لیتر بعد از 192 ساعت به میزان 9/23 میلی گرم بر لیتر می رسد که حداکثر راندمان در این مرحله 95 درصد می باشد. در حالی که راندمان حذف در pH =7/2 حدود 100 درصد می باشد و در pH=5 نیز روند کاهش نیترات به میزان اساسی کاهش می یابد.

اثر میزان تلقیح اولیه در استفاده از سوکسینات به عنوان منبع کربن توسط باکتری سودوموناس استوتزری در pH= 7/2 و درجه حرارت 28 درجه سانتیگراد مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایشات با میزان های تلقیح اولیه $1/5\times10^8$CFU/ml، 3×10^8، $4/5\times10^8$ و 6×10^8 انجام شد. عدم تلقیح اولیه باکتری هیچگونه کاهش نیترات را با گذشت زمان نشان نداد. نتایج نشان داد که روند کاهش نیترات با اضافه کردن میزان تلقیح $1/5\times10^8$ کندتر از مقادیر دیگر می باشد(شکل 4). اما در سه گروه دیگر روند کاهش نیترات یکسان بود. با گذشت زمان کمترین تلقیح نیز کاهش روند را جبران می نماید و مشابه سه گروه دیگر می گردید.



شکل شماره 3- اثر pH در میزان حذف بیولوژیکی نیترات



شکل شماره 4- اثر میزان تلقیح باکتری در حذف بیولوژیکی نیترات (در چهار غلظت تلقیحی $1/5\times10^8$، 3×10^8، $4/5\times10^8$ و 6×10^8 CFU/ml)

بحث و نتیجه گیری

نتایج این تحقیق حذف سریع نیترات با استفاده از سوکسینات به عنوان منبع کربن را نشان می داد. باکتری سودوموناس استوتزری با منبع کربن سوکسینات می تواند راندمان 100 درصد را در حذف 200 میلی گرم بر لیتر نیترات-نیتروژن از پساب فراهم نماید. هر چند که بسیاری از مطالعات انجام شده توسط محققان مختلف متانل را بعنوان منبع کربن موثر جهت حذف بیولوژیکی نیترات معرفی می نماید (2، 11، 18) ولی نتایج این تحقیق متانل را توصیه نمی نماید. مطالعات صورت گرفته، عمدتاً توسط کنسرسیوم های میکروبی و یا باکتری غیر از باکتری مورد استفاده در این مطالعه بوده است. مطالعات انجام شده توسط همدانی و همکارانش نشان داده است که سودوموناس استوتزری قادر به استفاده از متانل به عنوان منبع کربن نمی باشد (15).

مطالعات انجام شده توسط این محققین، نتایج حاصل از مطالعه حاضر را تائید می نماید. مطالعات انجام شده توسط کریستین و همکارانش(19) و بورچردینگ (20) بر روی سودوموناس استوتزری نشان داده است که این باکتری دارای فعالیت آنزیمی بالایی برای احیای نیترات می باشد و این باکتری می تواند در تکنولوژی سنسورهای بیولوژیکی یا میکروتیتر مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات انجام شده توسط کسرو و همکارانش (21) نشان داده است که اتانل می تواند منبع کربن مناسبی برای حذف بیولوژیکی نیترات با استفاده از باکتری های سودوموناس بوتانووریا باشد و نتایج حاصل از مطالعات آنها نسبت کربن به نیتروژن بیش از 3 را برای اتانل توصیه کرده است. با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق و مطالعات انجام شده توسط سایر محققان به نظر می رسد سوکسینات منبع کربن مناسبی برای حذف بیولوژیکی نیترات پساب هایی با غلظت بالا از نیترات باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده که فرآیند حذف بیولوژیکی نیترات با به کار گیری سودوموناس استوتزری با استفاده از منبع کربن سوکسینات قادر به کاهش غلظت های خیلی بالا (تا حد 800 میلی گرم بر لیتر نیترات-نیتروژن) به میزان اساسی می باشد. اما قادر به رساندن مقادیر فوق به حد استانداردهای پساب خروجی نمی باشد و از طرف دیگر میزان نیتریت تولیدی در این غلظت ها بیش از مقادیر استاندارد توصیه شده می باشد (3، 4). مطالعات انجام شده توسط فوگلار و همکارانش در غلظت های بالا از نیترات و با استفاده از کنسرسیوم باکتریایی نیز نتایج مشابهی را نشان داده است (23).

در مطالعات فوگلار نشان داده شده است که غلظت اولیه نیترات حداکثر رشد ماکزیمم میکروارگانیسم های مسئول برای حذف نیترات را تحت تاثیر قرار می دهد و اثر غلظت اولیه نیترات می تواند با استفاده از رابطه مونود مدل سازی شود. مناسب ترین pH برای انجام حذف بیولوژیکی نیترات توسط سودوموناس استوتزری 7/2 بوده است. در این pH، فرآیند بیشترین راندمان را داشته است. مطالعات انجام شده توسط اووز نیز نشان داده است که pH در محدوده 6/5 تا 8 نمی تواند تاثیر منفی بر روند فرآیند حذف نیترات داشته باشد. در این محدوده، حذف نیترات به خوبی انجام می شود(3). برای انجام یک فرآیند حذف نیترات مطلوب با منبع کربن سوکسینات و با میزان غلظت اولیه نیترات-نیتروژن 200 میلی گرم بر لیتر، حداقل 3×10^8 CFU/ml باکتری سودوموناس استوتزری مورد نیاز است. هر چند در غلظت های کمتر باکتری نیز فعالیت حذف نیترات انجام شده اما زمان راه اندازی راکتور برای حذف نیترات طولانی تر می گردد. در حالت میدانی، غلظت کم باکتری باعث افزایش حجم راکتور شده و هزینه های حذف نیترات را افزایش می دهد.

References

1. Dhamole PB, Nair RR, Dsouza SF, Denitrification of strength nitrate waste. Bioreso Technol, 2007; 98: 247-252
2. Wang JH, Baltzis BC, Fundamental denitrification kinetic studies with pseudomonas denitrificans. Biotechnil Bioeng, 1995; 47: 26-41
3. Ovez B, Batch biological denitrification using Arundo donax, Glycyrrhiza glabra, and Gracilaria verrucosa as carbon sources. Process Biochem, 2006; 41: 1289-1295
4. Iran Environmental protection Agency, Environmental Criteria and standards, Sabz publication, 2003: 45-50
5. Gabaldon G, Biological nitrate removal from waste water of a metal-finishing industry, J Hazard Mater, 2007; 47: 37-41
6. Sakakibara Y, Kuroda M, Electric prompting and control of denitrification. Biotechnol. Bioeng, 1993; 42: 535–537
7. Kiss I, Szekeres T, Hydrogen-dependent denitrification: preliminary assessment of two bio-electrochemical systems. Water Sci Technol, 2000; 42: 373–379
8. Mansell MO, Schroeder DE, Biological denitrification in a continuous flow membrane reactor. Water Res, 1999; 33:1845–1850
9. Obaja D, Mace S, Mata-Alvarzi J. Biological nutrient removal by a sequencing batch reactor (SBR) using an internal organic carbon source in digested piggery wastewater. Bioreso Technol. 2000; 96: 7-14
10. Paredes D, Kuschk P. New aspect of microbial nitrogen transformation in the context of wastewater treatment –A review. Eng Life Sci. 2007; 7: 13-25
11. Ahn Y. H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. Process Biochem. 2006; 41: 1709-1721
12. Park JBK, Craggs RJ, Sukias JPS, treatment of hydroponic waste water by denitrification filters using plant prunings as the organic carbon sources, Biores Technol, 2007; 18: 38-45
13. Her K and Huang J, Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough, Bioresour. Technol, 1995; 54: 45–51
14. Metcalf and Eddy, Wastewater Engineering: Treatment Disposal and Reuse (fourth ed.), Springer, New York, USA, 2005
15. Hamedani HRK, Kanda K, Kanda K, Kato F. Denitrification activity of the bacterium pseudomonas sp. ASM-2-3 isolated from the Ariak Sea tideland. J Bioscience Bioengin, 2004; 97: 39-44
16. Oyaizu H. Identification of bacteria and analysis of microflora by analysis by 16S rRNA sequences. In: Japanese Society of Microbial Ecology, Editor, Microbial ecology, Business Center for Academic Society of japan, Tokyo, 1992: 51-60
17. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater,21th ed, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA. 2005
18. Ritmann BE, Mccarty PL, Environmental biotechnology: principles and applications. 10020. New York NY: MacGraw-Hill; 2001
19. Kirstein D, Kiristein L, Scheller H, Borcherding H, Ronnenberg J, Diekmann

S, et al. Amperometric nitrate biosensors on the basis of the pseudomonas stutzeri nitrate reductase. J. Electronal. Chem, 1999; 474: 43-51

20. Borcherding H, Leikefeld S, Frey C, Diekman S, Enzymatic microtiter plate-based nitrate detection in environmental and medical analysis. Anal Biochem, 2000; 282: 1-9
21. Kessru P, Kiss I, Bihari Z, Polyak B, biological denitrification in a continuous-flow pilot bioreactor containing immobilized pseudomonas butanovora cells. Bioreso Technol, 2006; 87: 78-80
22. Cheveron F, Defines C, Dubourguier HC, Denitrification of high nitrate and ammonia water using fixed biofilm reactors on natural supports. Environ Technol, 1997; 18:171-178
23. Foglar H, Briski F, Sipos L, Vukovic M, High nitrate removal from synthetic wastewater with the mixed bacterial culture. Bio reso Technol, 2005; 96: 879-889
24. Aslan S, Combined removal of pesticides and nitrates in drinking water using biodenitrification and sand filter system, process Biochem, 2005; 40: 417-424
25. Etchebehere C, Errazquin I, Barrandeguy E, Dabert P, Molleta R, Muxi L, Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. FEMS Microbio Ecology, 2001; 35: 259-265
26. Saliling W J B, Westerman PW, Losordo TM, Wood chips and wheat straw as alternative biofilter media for denitrification reactors treating aquaculture and other wastewaters with high nitrate concentrations. Aquaculture Engin, 2007; 16: 63-69
27. Teixeira P, Oliveira R. Denitrification in a closed rotating biological contactor: effect of disk submergence. Process Biochem, 2001; 37:345–349
28. Rajakumar S, Ayyasamy PM, Shanthi K, Thavamani P, Velmurugan p, Song YC. Nitrate removal efficiency of bacterial consortium (pseudomonas sp. KW1 and bacillus sp. YW4) in synthetic nitrate-rich water. J Hazard Mater, 2008; 157: 553-563