

Comparative Study of Heterotrophic and Hydrogenotrophic Denitrification Performance in Nitrate Removal from Well Water

Fariba Rezvani^{1*}

^{1*} Assistant Professor, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, Biotechnology Research Center, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

Email: f.rezvani@irost.ir ; Tel.: +98-21-57416806

Received: 10/02/2026

Revised: 31/07/2026

Accepted: 16/09/2026

This study compared the performance of heterotrophic and hydrogenotrophic denitrification for nitrate removal from well water using two 1-L batch reactors operated under anoxic conditions for 48 h. After a one-month sludge enrichment period, dextrose was used as the carbon source for heterotrophic denitrification, while hydrogen and carbon dioxide gases supported hydrogenotrophic denitrification. Both systems were evaluated for removing 50 mg/L nitrate-nitrogen. The heterotrophic process reduced nitrate-nitrogen to below 10 mg/L within 12 h, whereas the hydrogenotrophic system required approximately 24 h to achieve the same concentration. However, nitrite accumulated to 20 mg/L in the heterotrophic reactor before declining to an average of 4 mg/L, which remained above the recommended standard. The heterotrophic system also produced a residual chemical oxygen demand (COD) of 95 mg/L and a biomass concentration of 0.09 g/L. In contrast, the hydrogenotrophic reactor maintained nitrite below 3 mg/L, residual COD below 15 mg/L, and biomass at 0.05 g/L at pH 7–8. Although heterotrophic denitrification achieved faster nitrate removal, hydrogenotrophic denitrification produced higher-quality effluent because of its lower biomass production, lower residual COD, and minimal nitrite accumulation. Nevertheless, optimization of hydrogen supply and phosphorus supplementation is required to improve process efficiency and support practical groundwater treatment.

Keywords: Heterotrophic denitrification, Hydrogenotrophic denitrification, Well water nitrate, Effluent water quality, COD and biomass

مقدمه

آلودگی نیترات در منابع آب زیرزمینی و آشامیدنی به عنوان یکی از مهم ترین چالش های زیست محیطی و بهداشتی در دهه های اخیر شناخته می شود. گسترش فعالیت های کشاورزی، مصرف گسترده کودهای نیتروژنه، نفوذ فاضلاب های شهری و صنعتی، و مدیریت نامناسب پسماندهای انسانی و دامی از عوامل اصلی افزایش غلظت نیترات در آب های زیرزمینی به شمار می روند (Abascal et al., 2019; Rezvani et al., 2022). از آنجا که نیترات حلالیت بالایی در آب دارد و به راحتی در محیط های زیرسطحی منتقل می شود، حذف آن از منابع آب آشامیدنی، به ویژه آب های زیرزمینی، همواره با چالش های فنی و مدیریتی قابل توجهی همراه بوده است. حضور نیترات در غلظت های بالا در آب آشامیدنی می تواند اثرات نامطلوبی بر سلامت انسان داشته باشد. بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (WHO)، حداکثر غلظت مجاز نیتروژن نیتراتی در آب آشامیدنی ۱۰ میلی گرم بر لیتر (معادل ۵۰ میلی گرم بر لیتر نیترات) تعیین شده است (WHO, 2022). مصرف طولانی مدت آب آلوده به نیترات می تواند منجر به بروز متهموگلوبینمی در نوزادان،

اختلالات عملکرد تیروئید و افزایش ریسک برخی بیماری‌های مزمن و سرطان‌ها شود (Abascal et al., 2022; Ye et al., 2025). از این رو، توسعه روش‌های کارآمد، ایمن و پایدار برای حذف نیترات از منابع آب آشامیدنی و زیرزمینی به‌عنوان یک ضرورت اساسی در مدیریت منابع آب مطرح است.

روش‌های متعددی برای حذف نیترات از آب آشامیدنی توسعه یافته‌اند که می‌توان آن‌ها را به سه دسته اصلی فیزیکی، شیمیایی و زیستی تقسیم کرد. روش‌های فیزیکی شامل اسمز معکوس (RO)، تبادل یونی (IX) و الکترودیالیز (ED) هستند که اگرچه راندمان حذف بالایی (۹۰ تا ۹۵ درصد) دارند، اما با محدودیت‌هایی نظیر هزینه سرمایه‌گذاری و بهره‌برداری بالا، مصرف انرژی زیاد (به‌ویژه در اسمز معکوس که حدود ۱ تا ۳ کیلووات‌ساعت بر مترمکعب انرژی نیاز دارد) و تولید جریان‌های کنسانتره غنی از نیترات مواجه هستند که دفع آن‌ها چالش‌برانگیز است (Abascal et al., 2022; Rezvani et al., 2019). مطالعه (Aghabalaei et al., 2024) نشان داد که روش تبادل یونی اگرچه در مقیاس کوچک مقرون‌به‌صرفه است، اما در مقیاس بزرگ به دلیل نیاز به احیای مکرر رزین‌ها و تولید پساب شور، هزینه‌های عملیاتی بالایی دارد.

روش‌های شیمیایی نیز، از جمله احیای شیمیایی با استفاده از عوامل کاهنده مانند آهن صفر ظرفیتی (ZVI)، رسوب‌دهی و اکسیداسیون پیشرفته، اگرچه سریع عمل می‌کنند، اما اغلب منجر به تولید محصولات جانبی ناخواسته (مانند آمونیوم در احیای شیمیایی)، لجن شیمیایی و نیاز به مواد شیمیایی گران‌قیمت می‌شوند (Abascal et al., 2022; WHO, 2022). به‌عنوان مثال، استفاده از ZVI اگرچه مؤثر است، اما هزینه بالای مواد و نیاز به کنترل pH از محدودیت‌های آن محسوب می‌شود (Abascal et al., 2022).

در مقابل، فرآیندهای زیستی مبتنی بر دنیتریفیکاسیون میکروبی، به‌عنوان گزینه‌ای پایدار، مقرون‌به‌صرفه و سازگار با محیط‌زیست برای حذف نیترات مورد توجه گسترده قرار گرفته‌اند. در این فرآیند، نیترات به‌وسیله میکروارگانیسم‌های دنیتریفایر به نیتروژن گازی بی‌خطر احیا می‌شود، بدون آنکه جریان پسماند شور یا رسوبات شیمیایی تولید شود (Karanasios et al., 2010; Ye et al., 2025). مزیت اصلی این روش، هزینه عملیاتی پایین‌تر (حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد کمتر از روش‌های فیزیکی)، عدم تولید پساب ثانویه خطرناک و امکان استفاده از منابع کربنی ارزان‌قیمت یا حتی ضایعات آلی است (Ghafari et al., 2009). انعطاف‌پذیری بالای سیستم‌های زیستی در انتخاب منبع کربن و دهنده الکترون، امکان طراحی و بهره‌برداری از این فرآیندها را متناسب با ویژگی‌های آب ورودی فراهم می‌کند (Zhang et al., 2023).

با وجود مزایای فراوان، روش‌های بیولوژیکی دنیتریفیکاسیون در مقایسه با روش‌های فیزیکی (مانند اسمز معکوس) دارای محدودیت‌هایی نیز هستند. از مهم‌ترین این محدودیت‌ها می‌توان به حساسیت بالای میکروارگانیسم‌ها به تغییرات دمایی و pH، نیاز به زمان ماند هیدرولیکی بالاتر، احتمال تجمع واسطه‌های سمی مانند نیتريت، و نیاز به مراحل پس‌تصفیه (مانند فیلتراسیون یا گندزدایی) جهت حذف زیست‌توده و مواد آلی باقی‌مانده اشاره کرد (Rezvani et al., 2019). با این حال، با بهینه‌سازی شرایط عملیاتی و انتخاب صحیح نوع دنیتریفیکاسیون، بسیاری از این محدودیت‌ها در مقیاس تصفیه آب آشامیدنی قابل مدیریت هستند.

دنیتریفیکاسیون زیستی به‌طور کلی به دو دسته اصلی دنیتریفیکاسیون هتروتروف و دنیتریفیکاسیون اتوتروف (هیدروژنوتروف) تقسیم می‌شود. در مقایسه با روش‌های فوق، روش پیشنهادی این تحقیق (دنیتریفیکاسیون زیستی) با تمرکز بر مقایسه دو مسیر هتروتروف و هیدروژنوتروف، به‌دنبال ارائه راهکاری پایدار با حداقل تولید آلاینده‌های ثانویه و کیفیت آب خروجی مناسب برای کاربرد در تصفیه آب آشامیدنی است. در دنیتریفیکاسیون هتروتروف، میکروارگانیسم‌ها از منابع کربن آلی مانند متانول، استات، گلوکز یا دکستروز به‌عنوان منبع کربن و دهنده الکترون استفاده می‌کنند. این فرآیند معمولاً دارای سینتیک سریع‌تری بوده و قادر است نیترات را در مدت‌زمان کوتاهی حذف کند (Rossi et al., 2015; Smail et al., 2025; Tang et al., 2012). با این حال، استفاده از منابع کربن آلی خارجی می‌تواند منجر به باقی‌ماندن COD محلول، افزایش تولید زیست‌توده، افزایش کدورت و احتمال تجمع نیتريت در شرایط عدم

تبادل نسبت کربن به نیتروژن شود که همگی از منظر کیفیت آب آشامیدنی چالش برانگیز هستند (Abascal et al., 2022; Roshanravan et al., 2021). در مقابل، دنیتریفیکاسیون هیدروژنوتروف یا اتوتروف مبتنی بر هیدروژن، از هیدروژن به عنوان دهنده الکترون و از دی اکسید کربن یا بی کربنات به عنوان منبع کربن استفاده می کند. این فرآیند به دلیل عدم نیاز به افزودن کربن آلی خارجی، تولید COD باقی مانده و زیست توده بسیار کمتری دارد و تجمع نیتريت در آن معمولاً ناچیز است (Chen et al., 2022; Karanasios et al., 2010; Tang et al., 2012). مطالعات متعددی نشان داده اند که دنیتریفیکاسیون هیدروژنوتروف به ویژه برای تصفیه آب های زیرزمینی و آشامیدنی با غلظت پایین مواد آلی، گزینه ای ایمن و پایدار محسوب می شود (Taşkın and Cuci, 2019; Zhao et al., 2025). با این حال، محدودیت انتقال جرم هیدروژن، حلالیت پایین آن در آب و رشد آهسته تر میکروارگانیسم های اتوتروف می تواند منجر به سینتیک کندتر فرآیند در مراحل اولیه بهره برداری شود. منابع کربن و انرژی مورد نیاز برای دو فرایند دنیتریفیکاسیون هتروتروف و هیدروژنوتروف به صورت خلاصه در جدول ۱ بیان شده است.

جدول ۱. مقایسه منابع دهنده و پذیرنده الکترون و منبع کربن در فرآیندهای دنیتریفیکاسیون (Rezvani et al., 2019)

نوع دنیتریفیکاسیون	منبع کربن (برای سنتز سلولی)	منبع انرژی (الکترون دهنده)	گیرنده الکترون
هتروتروف	مواد آلی نظیر گلوکز و دکستروز، استات، متانول	همان منبع کربن آلی	نیترات (NO_3^-)
هیدروژنوتروف	دی اکسید کربن، بی کربنات و کربنات	هیدروژن، سولفور، آهن	نیترات

علاوه بر تفاوت های سینتیکی و کیفی، نیازهای تغذیه ای میکروارگانیسم ها در دو فرآیند نیز متفاوت است. به ویژه مصرف فسفر در سیستم های هتروتروف به دلیل تولید زیست توده بیشتر معمولاً بالاتر از سیستم های اتوتروف است. (Wang et al., 2018) نشان دادند که محدودیت فسفر تأثیر منفی بیشتری بر عملکرد دنیتریفیکاسیون هتروتروف نسبت به فرآیندهای اتوتروف دارد. همچنین مطالعات اخیر نشان می دهد که در سیستم های هیدروژنوتروف و مختلط با هتروتروف، مدیریت دقیق نسبت های تغذیه ای، به ویژه نسبت N:P، نقش تعیین کننده ای در پایداری بلندمدت فرآیند دارد (Peng et al., 2024; Zhang et al., 2023). با وجود انجام مطالعات متعدد بر روی هر یک از فرآیندهای دنیتریفیکاسیون هتروتروف و هیدروژنوتروف، مقایسه مستقیم و جامع عملکرد این دو سیستم تحت شرایط عملیاتی یکسان، به ویژه در راکتورهای ناپیوسته و در شرایط سوسپانسیونی، همچنان محدود است. بیشتر مطالعات موجود بر یک فرآیند خاص تمرکز داشته و یا در شرایط پیوسته و با ویژگی های آب متفاوت انجام شده اند. از این رو، انجام یک مقایسه سیستماتیک می تواند درک دقیق تری از تفاوت های سینتیکی، کیفی و بهره برداری این دو فرآیند فراهم کرده و مبنای مناسبی برای انتخاب فناوری بهینه در تصفیه آب های زیرزمینی و آشامیدنی ارائه دهد.

بر این اساس، هدف پژوهش حاضر، ارزیابی و مقایسه عملکرد دنیتریفیکاسیون هتروتروف و هیدروژنوتروف در حذف نیتروژن نیتراتی از آب چاه تحت شرایط انوکسیک و ناپیوسته است. تمرکز این مطالعه بر مقایسه راندمان حذف نیتروژن نیتراتی، رفتار نیتروژن نیتريتی، تغییرات COD محلول باقی مانده، تولید زیست توده، مصرف فسفر و تغییرات pH در دو سامانه است. نتایج این پژوهش می تواند اطلاعات کاربردی ارزشمندی برای طراحی و بهره برداری از سامانه های زیستی حذف نیترات در تصفیه آب آشامیدنی فراهم کند. در این پژوهش، پایداری زیستی آب خروجی به صورت عملیاتی بر اساس سه شاخص ارزیابی شد: (۱) تولید حداقل زیست توده که موجب کاهش کدورت و نیاز کمتر به فرآیندهای جداسازی و فیلتراسیون می شود؛ (۲) غلظت پایین COD محلول باقی مانده که

احتمال رشد مجدد میکروارگانیسم‌ها در شبکه توزیع آب را کاهش می‌دهد؛ و (۳) عدم تجمع نیتروژن نیتروژن نیتروژن (NO₂⁻-N) که نشان‌دهنده تکمیل مسیر دنیتریفیکاسیون و حفظ کیفیت شیمیایی آب خروجی است. نوآوری این پژوهش در مقایسه مستقیم و هم‌زمان دو مسیر متابولیکی دنیتریفیکاسیون هتروتروف و هیدروژنوتروف تحت شرایط عملیاتی یکسان و با استفاده از آب چاه واقعی به‌عنوان ماتریس آزمایش است. استفاده از آب واقعی، به دلیل حضور یون‌ها و ترکیبات زمینه‌ای، امکان ارزیابی عملکرد فرآیندها را در شرایطی نزدیک‌تر به بهره‌برداری عملی فراهم می‌کند. این رویکرد امکان بررسی هم‌زمان موازنه میان سرعت حذف نیتروژن نیتروژن، پایداری زیستی و کیفیت نهایی آب خروجی را برای کاربردهای مرتبط با تصفیه آب آشامیدنی فراهم می‌سازد؛ موضوعی که در مطالعات پیشین کمتر به‌صورت یکپارچه مورد بررسی قرار گرفته است.

۲. مواد و روش‌ها :

۲.۱. تهیه لجن و غنی‌سازی دنیتریفایرها

در این پژوهش، لجن فعال مورد استفاده برای جداسازی دنیتریفایرهای هتروتروف و هیدروژنوتروف از واحد تصفیه‌خانه فاضلاب جمع‌آوری شد. لجن اولیه پس از عبور از صافی و حذف ذرات درشت و لخته‌ها، به‌منظور کاهش مواد آلی و ترکیبات مزاحم، به مدت دو هفته در شرایط ناپیوسته و بدون افزودن هیچ‌گونه منبع کربن خارجی (فقط با آب شهری و در شرایط هوادهی ملایم) شستشو داده شد. هدف از این فرآیند، وادار کردن میکروارگانیسم‌ها به تنفس اندوژنوس جهت مصرف پلیمرهای ذخیره‌ای داخلی (مانند PHA) و حذف کامل COD محلول باقی‌مانده از تصفیه‌خانه بود تا جمعیت میکروبی به‌سمت سویه‌های مقاوم‌تر با پتانسیل دنیتریفیکاسیون واقعی غربالگری شود، بدون آنکه تنوع زیستی اصلی از بین برود (Tang et al., 2011). این کار تضمین می‌کند که در مراحل بعدی، هرگونه مصرف کربن یا تولید COD صرفاً ناشی از شرایط آزمایش بوده و رقابت ناعادلانه بین هتروتروف‌ها و اتوتروف‌ها به دلیل منابع کربنی پنهان رخ ندهد (Albina et al., 2019).

برای غنی‌سازی دنیتریفایرهای هتروتروف، بخشی از لجن شسته‌شده به مدت یک ماه در شرایط انوکسیک با منبع کربن آلی دکستروز، منبع نیتروژن KNO₃ و منبع فسفر KH₂PO₄ تغذیه شد. نسبت جرمی کربن به نیتروژن به فسفر (C:N:P) برابر با ۱۰/۱ : ۳ : ۱ در نظر گرفته شد که معادل تقریبی نسبت استاندارد و رایج COD:N:P = 100:5:1 برای رشد هتروتروف و تأمین نیازهای تغذیه‌ای استاندارد باکتری‌ها است (Metcalf and Eddy, 2014).

به‌منظور جداسازی و غنی‌سازی دنیتریفایرهای هیدروژنوتروف، نمونه دیگری از لجن شسته‌شده به مدت یک ماه در معرض تغذیه با گاز هیدروژن به‌عنوان دهنده الکترون، دی‌اکسیدکربن به‌عنوان منبع کربن و نیترات پتاسیم به‌عنوان منبع نیتروژن قرار گرفت. در طول دوره غنی‌سازی یک‌ماهه، هیچ‌گونه منبع کربن آلی به راکتورهای اتوتروف اضافه نگردید تا صرفاً باکتری‌های هیدروژنوتروف که توانایی استفاده از H₂ و CO₂ را داشتند، فرصت رشد و غالب شدن پیدا کنند.

این مرحله غنی‌سازی تا زمانی ادامه یافت که جمعیت میکروبی غالب بتواند در سه سیکل متوالی ناپیوسته، بیش از ۹۰ درصد از نیترات اولیه (۵۰ mg/L) را در کمتر از ۲۴ ساعت حذف نماید. این معیار کمی، تضمین‌کننده تسلط و فعالیت پایدار باکتری‌های دنیتریفایر هدف بود. لازم به ذکر است که پروتکل جداسازی دنیتریفایرهای هتروتروف و هیدروژنوتروف از طریق مراحل شستشو و سپس خوراک‌دهی، در مطالعات پیشین نیز استفاده شده است (Rezvani et al., 2020; Rezvani and Sarrafzadeh, 2025).

۲.۲. ویژگی‌های آب مورد استفاده

آب مورد استفاده در این مطالعه از چاه‌های منطقه احمدآباد مستوفی تهیه گردید. مقدار کل مواد محلول (TDS) اولیه این آب حدود ۳۴۵ میلی گرم بر لیتر و غلظت پایه نیتروژن نیتراتی کمتر از ۵ میلی گرم بر لیتر بود. همچنین، اندازه‌گیری‌ها نشان داد که آب چاه دارای COD اولیه بسیار پایینی (کمتر از ۵ میلی گرم بر لیتر) است؛ این ویژگی شرایط مناسبی را برای جلوگیری از رقابت باکتری‌های هتروتروف در راکتورهای هیدروژنوتروف فراهم ساخت. نمونه‌های آب تا زمان انجام آزمایش‌ها در ظروف پلی‌اتیلنی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به‌منظور شبیه‌سازی آلودگی برخی چاه‌های اطراف تهران، غلظت نیتروژن نیتراتی در راکتورها به‌صورت کنترل‌شده به ۵۰ میلی گرم بر لیتر افزایش یافت.

اگرچه غلظت نیتروژن نیتراتی برای شبیه‌سازی آلودگی برخی چاه‌های اطراف تهران به ۵۰ میلی گرم بر لیتر افزایش یافت، اما استفاده از آب چاه واقعی به‌جای محیط کشت مصنوعی، به‌منظور حفظ تأثیرات ماتریس زمینه‌ای (شامل قلیائیت طبیعی، مواد معدنی و رقابت‌های میکروبی بومی) بر عملکرد فرآیند انجام شد که نتایج را به شرایط واقعی تصفیه‌خانه‌ها نزدیک‌تر می‌کند. آب چاه حاوی یون‌های پس‌زمینه، عناصر ردیاب یا کم مقدار و قلیائیت طبیعی است که نقش حیاتی در بافرینگ pH و تأمین نیازهای میکروبی ایفا می‌کنند و حذف آن‌ها در آب مصنوعی می‌تواند منجر به نتایج غیرواقعی در مقیاس پایلوت گردد.

۲.۳. مشخصات راکتورها و شرایط عملیاتی

آزمایش‌های ناپیوسته در چهار راکتور شیشه‌ای یک‌لیتری انجام شد. هر راکتور حاوی آب چاه با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر نیتروژن نیتراتی و نسبت N:P برابر ۱۰ بود. دنیتریفایرهای هتروتروف و هیدروژنوتروف با غلظت اولیه زیست‌توده ۰/۰۲ گرم بر لیتر به راکتورها افزوده شدند. تمام راکتورها تحت شرایط انوکسیک با غلظت اکسیژن محلول (DO) کمتر از ۰/۵ میلی گرم بر لیتر و با استفاده از همزن مغناطیسی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای محیط به مدت ۴۸ ساعت بهره‌برداری شدند. هرچند که در ابتدای آزمایش و با تزریق گاز نیتروژن، اکسیژن محلول از داخل محیط خارج شد تا غلظت آن به کمتر از ۰/۵ میلی گرم بر لیتر برسد، در طول آزمایش نیز با تزریق گازهای دی‌اکسیدکربن و هیدروژن، اکسیژن از محیط خارج می‌شد. دور همزن نیز به‌گونه‌ای تنظیم شد که غلظت اکسیژن محلول را افزایش ندهد و با بستن درب بیوراکتور و تعبیه تنها یک منفذ برای خروج گازهای تولیدی و باقی‌مانده، از تبادل با محیط اطراف جلوگیری به عمل آمد.

در راکتورهای هتروتروف، نسبت جرمی C:N:P برابر با ۰/۱ : ۳ : ۱ در نظر گرفته شد که معادل تقریبی نسبت استاندارد و رایج COD:N:P برابر با ۱۰۰:۵:۱ برای رشد هتروتروف و تأمین نیازهای تغذیه‌ای استاندارد باکتری‌ها است (Abascal et al., 2022; Metcalf and Eddy, 2014; Tang et al., 2012). لازم به ذکر است که این نسبت در شرایط آزمایشگاهی ناپیوسته به‌منظور جلوگیری از محدودیت سوپسترا (کربن) و بررسی سینتیک حداکثری حذف نیترات توسط توده میکروبی غنی‌شده در نظر گرفته شده است و بررسی تأثیر تغییرات این نسبت در محدوده اهداف این تحقیق قرار نداشته است. دلیل اصلی استفاده از این نسبت، فقدان مقادیر کافی از ترکیبات کربنی و فسفوری در آب چاه مورد استفاده برای تأمین نیازهای متابولیک دنیتریفایرها بود که افزودن کنترل‌شده این مواد برای ارزیابی عملکرد باکتری‌ها ضروری می‌نمود. شایان ذکر است که علی‌رغم پیگیری‌های مکرر، امکان دسترسی به نمونه واقعی آب زیرزمینی آلوده به نیترات در زمان انجام آزمایش‌ها میسر نگردید و از این‌رو، شبیه‌سازی شرایط آلودگی با استفاده از آب چاه سالم و افزودن نیترات استاندارد به آن انجام پذیرفت. در کاربردهای واقعی و مقیاس کامل تصفیه آب‌های زیرزمینی که به‌طور طبیعی فاقد مواد آلی هستند، منبع کربن خارجی (مانند متانول، اتانول یا استات) به‌صورت کاملاً استوکیومتری و کنترل‌شده، دقیقاً متناسب با غلظت نیترات ورودی تنظیم و تزریق می‌شود تا از باقی‌ماندن مواد آلی کربنه در قالب COD در آب خروجی و بروز چالش‌های کیفیت آب جلوگیری گردد (Karanasios et al., 2010; Tang et al., 2012).

در راکتورهای هیدروژنوتروف، گازهای H_2 و CO_2 از طریق دیفیوژرهای سنگی و نرخ جریان ثابت vvm ۰/۱ (حجم گاز به ازای حجم مایع در دقیقه) به صورت پیوسته به درون بیوراکتور تزریق می‌شدند. گاز هیدروژن بر اساس نسبت جرمی استوکیومتری ۱/۲ گرم H_2 به ازای هر گرم نیتروژن نیتراتی (با در نظر گرفتن ضریب اطمینان برای سنتز سلولی) و معادل نسبت مولی ۵:۲ ($H_2 : NO_3^-$) تزریق گردید (Karanasios et al., 2010; Tang et al., 2011). همچنین گاز CO_2 به عنوان منبع کربن معدنی، با نسبت مولی تقریبی ۰/۵ مول CO_2 به ازای هر مول NO_3^- و با مازاد کنترل شده تأمین شد تا ضمن اطمینان از عدم محدودیت کربن برای رشد اتوتروف‌ها، نقش بافرینگ نیز ایفا نماید (Chen et al., 2022; Tang et al., 2011).

اگرچه محلول بافر شیمیایی خارجی به راکتورهای هیدروژنوتروف افزوده نشد، اما قلیائیت طبیعی موجود در آب چاه (به دلیل حضور بی‌کربنات‌ها) و همچنین تزریق پیوسته گاز CO_2 در راکتورهای هیدروژنوتروف، به عنوان یک سیستم بافرینگ طبیعی عمل کرده و از نوسانات شدید و خارج از محدوده pH (خارج از بازه ۷ تا ۸) جلوگیری نمودند. شکل ۱، تصویر راکتورهای ناپیوسته مورد استفاده در این پژوهش را نشان می‌دهد.



شکل ۱. بیوراکتورهای یک لیتری حاوی دنیتریفایرهای هتروتروف و هیدروژنوتروف

اگرچه در مطالعات اثبات مفهوم، استفاده از راکتورهای شاهد فاقد لجن فعال یا فاقد دهنده الکترون به منظور تفکیک حذف زیستی نیترات از فرآیندهای غیرزیستی متداول است، در پژوهش حاضر تلاش شده است که ماهیت زیستی حذف نیترات بر پایه مجموعه‌ای از شواهد مستقل و مکمل مورد تأیید قرار گیرد. لجن فعال پیش از آغاز آزمایش‌ها به مدت دو هفته تحت فرآیند شست‌وشو و گرسنگی شدید یا قحطی قرار گرفت تا ذخایر کربن درون سلولی و سهم تنفس درون‌زاد به حداقل برسد. در نتیجه، فعالیت دنیتریفیکاسیون مشاهده شده را می‌توان عمدتاً به دهنده‌های الکترون خارجی، شامل دکستروز و هیدروژن، نسبت داد؛ رویکردی که به طور گسترده برای کاهش اثرات ناشی از ترکیبات ذخیره‌ای و تنفس درون‌زاد در مطالعات دنیتریفیکاسیون توصیه شده است (Henze et al., 2008; Metcalf and Eddy, 2014). افزون بر این، تغییرات pH ثبت شده با روابط استوکیومتری مسیرهای مختلف دنیتریفیکاسیون مطابقت داشت؛ به گونه‌ای که در دنیتریفیکاسیون هتروتروف تولید قلیائیت و در دنیتریفیکاسیون هیدروژنوتروف مصرف قلیائیت مشاهده شد که با مبانی بیوشیمیایی گزارش شده در مطالعات پیشین همخوانی دارد (Lee and Rittmann, 2003). همچنین، افزایش قابل اندازه‌گیری جامدات معلق فرار (VSS) در طول دوره آزمایش، بیانگر رشد زیست‌توده و وقوع فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم‌ها بود. در مجموع، این شواهد به طور قوی نشان می‌دهند که حذف نیترات در شرایط این مطالعه ناشی از فرآیند دنیتریفیکاسیون زیستی بوده و احتمال وقوع کاهش غیرزیستی نیترات تحت شرایط فیزیکیوشیمیایی حاکم بر آزمایش ناچیز است.

۲.۴. روش‌های اندازه‌گیری و آنالیز

تمام آزمایش‌ها در دو راکتور مستقل انجام و نتایج به‌صورت میانگین گزارش شد. نمونه‌برداری هر ۴ ساعت یک‌بار صورت گرفت. نمونه‌ها پس از عبور از فیلتر آبدوست با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرون، تا زمان آنالیز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. غلظت نیترژن نیتراتی با روش اسپکتروفوتومتری UV در طول موج‌های ۲۲۰ و ۲۷۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. نیترژن نیتريتی با استفاده از روش Griess-Ilosvay و قرائت جذب در ۵۴۰ نانومتر تعیین گردید. COD با روش دی‌کرومات (Closed Reflux, Colorimetric) و اندازه‌گیری جذب در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (APHA, 2017). غلظت زیست‌توده (Biomass) بر اساس پارامتر جامدات معلق فرار (VSS) و مطابق با دستورالعمل استاندارد روش‌های اندازه‌گیری گزارش شد (APHA, 2017). این روش‌ها به دلیل دقت و تکرارپذیری بالا برای ارزیابی سیستم‌های دنیتريفيکاسيون در مقیاس آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفتند.

کلیه آزمایش‌ها به صورت دوبار تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین گزارش گردیدند. تمامی نمودارها در این مقاله با نرم افزار سیگما پلات ترسیم شده اند. حجم نمونه برداری شده برای هر آنالیز در هر مرحله زمانی ۵۰ میلی‌لیتر بود. به منظور بررسی خطای آزمایش‌ها و معناداری تفاوت‌ها بین دو سیستم، از آنالیز آماری واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار سیگما پلات ۱۵ استفاده شد و مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شدند.

۳. نتایج و تحلیل‌ها

۳.۱. مقایسه روند تغییرات غلظت نیترات در دنیتريفيکاسيون هتروتروف و هیدروژنوتروف

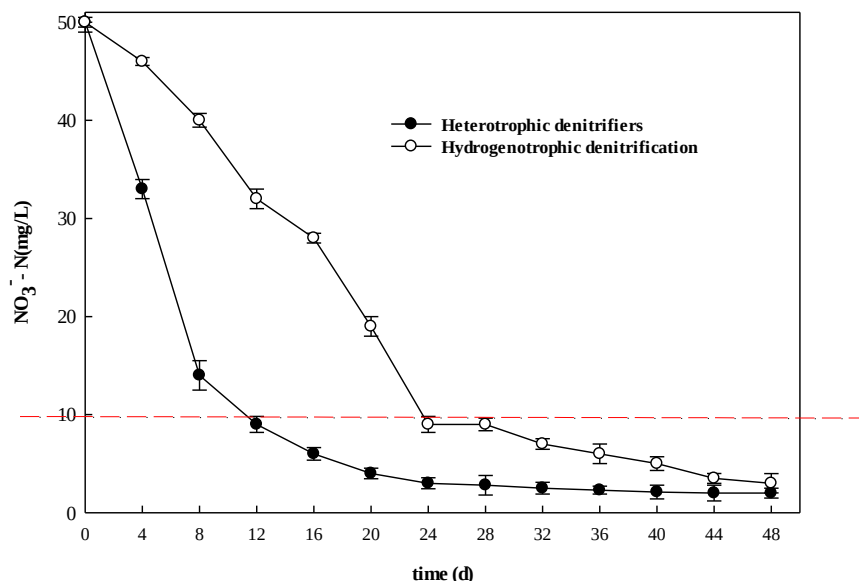
همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، تغییرات غلظت نیترژن نیتراتی در دو بیوراکتور نشان می‌دهد که هر دو فرآیند دنیتريفيکاسيون هتروتروف و هیدروژنوتروف از کارایی بالایی در حذف نیترات از آب چاه برخوردار هستند؛ با این حال، تفاوت‌های معنی‌داری از نظر سینتیک حذف نیترات و تغییرات کیفیت آب خروجی بین دو سامانه مشاهده شد ($p < 0.05$). غلظت اولیه نیترژن نیتراتی در دو راکتور ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تنظیم شد که به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بالاتر از مقدار راهنمای سازمان جهانی بهداشت برای آب آشامیدنی (۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نیترژن نیتراتی) بود (WHO, 2022). مطابق با نتایج ارائه‌شده در شکل ۲، در سیستم دنیتريفيکاسيون هتروتروف، کاهش غلظت نیترژن نیترات با سرعت بیشتری نسبت به سیستم هیدروژنوتروف انجام شد و زمان رسیدن به غلظت کمتر از ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور معنی‌داری کوتاه‌تر بود ($p < 0.05$)، به‌طوری‌که طی حدود ۱۲ ساعت، غلظت نیترژن نیتراتی به کمتر از حد مجاز برای آب آشامیدنی کاهش یافت. در مقابل، در سیستم هیدروژنوتروف، دستیابی به همین سطح کیفی حدود ۲۴ ساعت به طول انجامید. این اختلاف نشان می‌دهد که اگرچه هر دو فرآیند از کارایی بالایی در حذف نیترژن نیتراتی برخوردار هستند، اما سینتیک حذف در مراحل اولیه فرآیند به‌طور محسوسی تحت تأثیر نوع دهنده الکترون و ویژگی‌های انتقال جرم قرار دارد. کندتر بودن سینتیک اولیه حذف نیترژن نیتراتی در سامانه هیدروژنوتروف را می‌توان بیش از آنکه ناشی از رشد آهسته ذاتی باکتری‌های اتوتروف دانست، به محدودیت انتقال جرم هیدروژن از فاز گازی به فاز مایع و سپس به داخل سلول‌های میکروبی نسبت داد. حلالیت پایین هیدروژن در آب، مطابق قانون هنری، موجب می‌شود دسترسی میکروارگانیسم‌ها به دهنده الکترون در ابتدای فرآیند محدود باشد. در مقابل، در سامانه هتروتروف، دکستروز به‌عنوان یک منبع کربن محلول، به‌سرعت در اختیار میکروارگانیسم‌ها قرار گرفته و امکان آغاز سریع‌تر واکنش‌های احیای نیترات را فراهم می‌کند. این محدودیت انتقال جرم را می‌توان با بهینه‌سازی سامانه تزریق هیدروژن، کاهش اندازه حباب‌ها، افزایش زمان ماند گاز و بهبود اختلاط تا حد زیادی برطرف کرد (Kamei et al., 2023; Rezvani et al., 2019).

این تفاوت سینتیکی با نتایج مطالعات Tang et al., (2012) و Rossi et al., (2015) همخوانی دارد که گزارش کرده‌اند دنیتريفيکاسيون هتروتروف به دلیل نرخ رشد بالاتر میکروارگانیسم‌ها و دسترسی بهتر به دهنده الکترون آلی، در مراحل اولیه حذف نیترات عملکرد

سریع‌تری از خود نشان می‌دهد. به طوریکه سرعت حذف نیترات در سیستم هتروتروف (۱۲ ساعت برای رسیدن به زیر ۱۰ میلی گرم بر لیتر) با نتایج مطالعات مشابه همخوانی دارد. (Rossi et al., (2015 گزارش کرده اند که با استفاده از گلوکز به‌عنوان منبع کربن، ۶۰ mg/L از نیترات در عرض ۱۰ ساعت به زیر حد استاندارد رسید. در ایران، (Roshanravan et al., (2021 با استفاده از اسید سیتریک، زمان ۱۴ ساعت را برای حذف ۴۵ mg/L از نیترات را گزارش کرده اند. در مقابل، (Rezvani et al., (2019 و (Ye et al., (2025 بیان کرده‌اند که در سیستم‌های هیدروژنوتروف، محدودیت انتقال جرم هیدروژن از فاز گازی به فاز مایع و وابستگی واکنش‌ها به میزان حلالیت H_2 از عوامل اصلی کندتر بودن سینتیک اولیه حذف نیترات محسوب می‌شوند. این محدودیت‌ها موجب می‌شود که فرآیند هیدروژنوتروف، علی‌رغم پایداری بلندمدت، در ابتدای راه‌اندازی با نرخ کمتری پیش برود.

زمان ۲۴ ساعت بدست آمده از تحقیق حاضر برای سیستم هیدروژنوتروف در حذف نیترات نیتروژنی نیز با یافته‌های Karanasios et al., (2010) در یونان (۲۸-۲۰ ساعت) و مطالعه Taşkın and Cuci (2019) در ترکیه (۲۲ ساعت) قابل مقایسه است. با این حال، (Chen et al., (2022 در چین با استفاده از راکتور غشایی (MBfR) توانستند این زمان را به ۱۶ ساعت کاهش دهند که نشان‌دهنده تأثیر نوع راکتور بر سینتیک فرآیند است. هم چنین مطالعه‌ای در ایران توسط (Mirbagheri et al., (2016 نشان داد که در راکتور بیولوژیکی دوار (RBC) با شرایط هیدروژنوتروف، زمان ماند هیدرولیکی ۱۸ ساعت برای حذف ۵۰ mg/L نیترات کافی است که کمی سریع‌تر از نتایج حاضر است که این تفاوت می‌تواند به دلیل سطح تماس بیشتر بیوفیلم در RBC باشد.

بررسی تغییرات pH در دو سیستم نشان داد که مسیر متابولیکی دنیتریفیکاسیون تأثیر معنی‌داری بر روند تغییرات pH و تعادل اسیدی-بازی محیط دارد ($p < 0.05$). در سیستم دنیتریفیکاسیون هتروتروف، در مراحل اولیه فرآیند کاهش جزئی pH مشاهده شد که به تولید متابولیت‌های اسیدی ناشی از اکسیداسیون منبع کربن آلی نسبت داده می‌شود. با ادامه فرآیند و غالب شدن واکنش‌های احیای نیترات، به دلیل تولید قلیائیت، pH سیستم افزایش یافته و در محدوده خنثی تا کمی قلیایی (حدود ۷/۲ تا ۷/۸) تثبیت شد. رفتار مشابهی در مطالعات (Rossi et al., (2015 و (Roshanravan et al., (2021 نیز گزارش شده است. از دیدگاه شیمی واکنش‌ها، در دنیتریفیکاسیون هتروتروف که در آن باکتری‌ها از منابع کربن آلی مانند دکستروز به‌عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کنند، مصرف پروتون‌ها و تولید بی‌کربنات منجر به افزایش قلیائیت محیط می‌شود. مدل‌های فیزیکی-شیمیایی نشان داده‌اند که این افزایش قلیائیت در صورت عدم کنترل می‌تواند pH را از محدوده بهینه فعالیت میکروبی (تقریباً ۷ تا ۹) خارج کرده و منجر به کاهش راندمان فرآیند شود.



شکل ۲. تغییر غلظت نیتروژن نیتراتی برای دو فرایند دنیتریفیکاسیون هتروتروف و اتوتروف

به منظور جلوگیری از این مسئله، استفاده از راهکارهای کنترلی نظیر افزودن اسیدهای معدنی (مانند HCl) یا تزریق کنترل شده CO_2 در سامانه‌های بیولوژیکی توصیه شده است (Tang et al., 2011). در سامانه دنیتریفیکاسیون هیدروژنوتروف، اگرچه واکنش‌های بیوشیمیایی به‌طور تئوریک موجب تولید قلیائیت می‌شوند، اما در این پژوهش تزریق هم‌زمان دی‌اکسیدکربن به‌عنوان منبع کربن معدنی، همراه با قلیائیت طبیعی آب چاه، یک سامانه بافری کربنات-بی‌کربنات ایجاد کرده و با خنثی‌سازی هیدروکسیدهای تولیدشده، سبب پایداری pH در محدوده خنثی (حدود ۷ تا ۸) شد. در نتیجه، نوسانات شدید pH مشاهده نشد و شرایط مناسبی برای فعالیت باکتری‌های هیدروژنوتروف در طول آزمایش حفظ گردید. مطالعات Karanasios et al., (2010) و Chen et al., (2022) و Duffner et al., (2021) نیز بر اهمیت تأمین قلیائیت و استفاده از سامانه‌های بافری برای حفظ pH بهینه در فرآیندهای دنیتریفیکاسیون هیدروژنوتروف تأکید کرده‌اند. Albina et al., (2019) نیز نشان داده‌اند که بازه pH بهینه برای دنیتریفیکاسیون هیدروژن‌محور معمولاً بین ۷/۶ تا ۸/۶ است و خروج از این محدوده می‌تواند موجب تجمع ترکیبات واسطه‌ای مانند نیتريت یا مهار رشد میکروارگانیسم‌ها شود. برای کنترل pH در این سیستم‌ها، استفاده از مواد بافرکننده‌ای نظیر بی‌کربنات سدیم (NaHCO_3) یا تزریق CO_2 به‌عنوان راهکارهای مؤثر پیشنهاد شده است.

در پایان دوره آزمایش، غلظت نیتروژن نیتراتی در هر دو سامانه به کمتر از ۳ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت که بیانگر پایداری عملکرد و کارایی بالای هر دو فرآیند در حذف نهایی نیترات است. به‌طور کلی، نتایج این بخش نشان می‌دهد که اگرچه دنیتریفیکاسیون هتروتروف از نظر سرعت اولیه حذف نیترات برتری دارد، اما دنیتریفیکاسیون هیدروژنوتروف از منظر پایداری فرآیند، کنترل بهتر pH و کاهش ریسک تجمع ترکیبات واسطه‌ای، گزینه‌ای ایمن‌تر و مناسب‌تر برای کاربردهای مرتبط با تصفیه آب آشامیدنی محسوب می‌شود. این نتایج با یافته‌های Karanasios et al., (2010) و Taşkın and Cuci (2019) در تصفیه آب‌های زیرزمینی با بار آلی پایین همخوانی دارد.

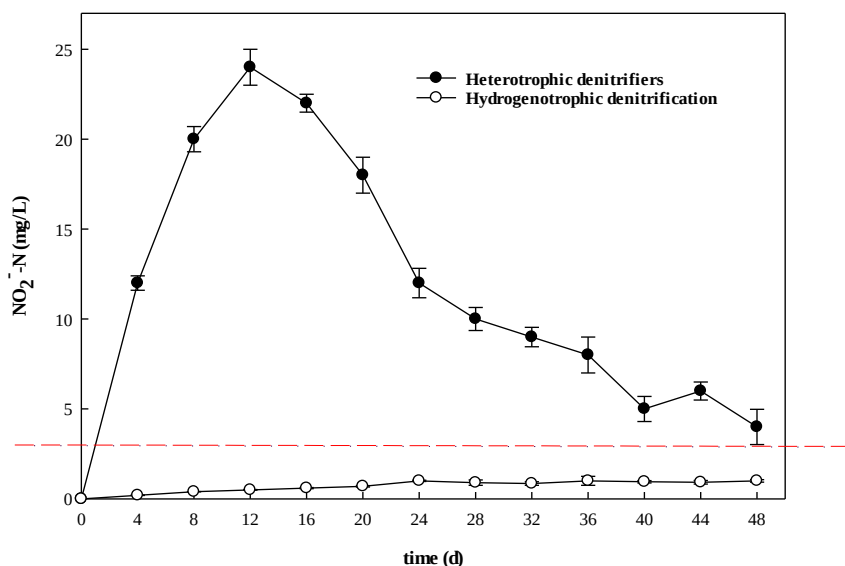
۳.۲. رفتار نیتريت و پایداری مسیر دنیتریفیکاسیون

نیترژن نیتريتی ($\text{NO}_2^- - \text{N}$) به عنوان مهم‌ترین ترکیب واسطه در فرآیند دنیتريفیکاسیون، شاخصی کلیدی برای ارزیابی پایداری و کامل بودن مسیر احیای نیترژن نیتريتی محسوب می‌شود. بررسی تغییرات غلظت نیترژن نیتريتی در طول زمان نشان داد که رفتار این پارامتر در سامانه‌های دنیتريفیکاسیون هتروترروف و هیدروژنوتروف تفاوت معنی‌داری دارد ($p < 0.05$) و این تفاوت‌ها به ویژگی‌های متابولیکی میکروارگانیسم‌ها و سینتیک واکنش‌های زیستی در هر سامانه مرتبط است. مطابق نتایج ارائه‌شده در شکل ۳، در سامانه دنیتريفیکاسیون هتروترروف، غلظت نیترژن نیتريتی در ساعات ابتدایی فرآیند به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت و به حدود ۲۴ میلی‌گرم بر لیتر رسید که به‌مراتب بالاتر از مقدار توصیه‌شده برای آب آشامیدنی (۳ میلی‌گرم بر لیتر نیترژن نیتريتی) است (WHO, 2022). این رفتار بیانگر وقوع یک عدم توازن گذرای سینتیکی در مراحل اولیه دنیتريفیکاسیون است؛ به‌گونه‌ای که نرخ احیای نیترژن نیتريتی به نیترژن نیتريتی، به‌طور موقت از نرخ احیای نیترژن نیتريتی به ترکیبات حدواسط بعدی و در نهایت گاز نیترژن پیشی می‌گیرد. در نتیجه، نیترژن نیتريتی به‌صورت موقت در محیط تجمع می‌یابد که با گذشت زمان کاهش می‌یابد و به مقادیر ۴ میلی‌گرم بر لیتر در انتهای فرآیند می‌رسد.

تجمع نیترژن نیتريتی در ساعات اولیه، پدیده شناخته‌شده‌ای موسوم به اوج تجمع یا پیک نیتريت است که در بسیاری از سامانه‌های دنیتريفیکاسیون هتروترروف گزارش شده است. این پدیده عمدتاً ناشی از عدم توازن گذرای میان فعالیت آنزیم نیتريت ردوکتاز (Nar) و آنزیم نیتريت ردوکتاز (Nir) است. در حضور غلظت اولیه بالای نیتريت و منبع کربن آلی زودتجزیه‌مانند دکستروز، فعالیت Nar به‌سرعت افزایش یافته و نیترژن نیتريتی با سرعت زیادی به نیترژن نیتريتی تبدیل می‌شود، در حالی که ظرفیت آنزیم Nir برای احیای نیترژن نیتريتی به همان سرعت افزایش نمی‌یابد. این اختلاف موقتی در نرخ واکنش‌ها موجب تجمع گذرای نیترژن نیتريتی می‌شود. با کاهش غلظت نیترژن نیتريتی و سازگار شدن جامعه میکروبی، تعادل میان مراحل مختلف دنیتريفیکاسیون برقرار شده و غلظت نیترژن نیتريتی به‌تدریج کاهش می‌یابد (Abascal et al., 2022; Roshanravan et al., 2021). مطالعه (Samil et al., 2025) نیز نشان داد که در راکتورهای ناپیوسته هتروترروف، به‌ویژه در غلظت‌های اولیه بالای نیترژن نیتريتی، احتمال بروز اوج تجمع نیترژن نیتريتی در ساعات ابتدایی فرآیند افزایش می‌یابد. این رفتار به اختلاف موقتی در ظرفیت آنزیم‌های دخیل در مراحل مختلف دنیتريفیکاسیون، شوک متابولیکی اولیه و تغییرات ناگهانی شرایط واکنش نسبت داده شده است. با این حال، با ادامه فرآیند و افزایش سازگاری جامعه میکروبی، غلظت نیترژن نیتريتی به‌تدریج کاهش یافته و در پایان آزمایش به مقادیر ناچیز رسید که نشان‌دهنده تکمیل فرآیند دنیتريفیکاسیون و برقراری تعادل میان مراحل متوالی احیای نیترژن است.

در مقابل، در سامانه دنیتريفیکاسیون هیدروژنوتروف، غلظت نیترژن نیتريتی در تمام مدت آزمایش کمتر از ۳ میلی‌گرم بر لیتر باقی ماند و به‌طور معنی‌داری کمتر از سامانه هتروترروف بود ($p < 0.05$). این رفتار نشان‌دهنده هماهنگی مناسب میان مراحل متوالی احیای نیترژن نیتريتی و نیترژن نیتريتی و در نتیجه پایداری بالای مسیر دنیتريفیکاسیون در این سامانه است. تأمین پیوسته هیدروژن به‌عنوان دهنده الکترون، همراه با رشد آهسته‌تر اما پایدارتر میکروارگانیسم‌های هیدروژنوتروف، موجب حفظ تعادل میان نرخ تولید و مصرف نیترژن نیتريتی شده و از تجمع این ترکیب در طول فرآیند جلوگیری می‌کند. نتایج حاصل از این پژوهش با یافته‌های (Tang et al., 2012)، (Chen et al., 2022) و (Zhao et al., 2025) مطابقت دارد که گزارش کرده‌اند دنیتريفیکاسیون هیدروژنوتروف در کنترل تجمع نیترژن نیتريتی و حفظ کیفیت آب خروجی نسبت به سامانه‌های هتروترروف عملکرد مطلوب‌تری دارد. از دیدگاه کاربردی، کنترل غلظت نیترژن نیتريتی در آب خروجی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا نیتريت یکی از آلاینده‌های بالقوه مخاطره‌آمیز برای سلامت انسان محسوب می‌شود و تجمع آن می‌تواند کاربرد فرآیند را در تصفیه آب آشامیدنی با محدودیت مواجه سازد. بنابراین، پایین بودن غلظت نیترژن نیتريتی در سامانه هیدروژنوتروف، علاوه بر نشان دادن پایداری بیشتر مسیر دنیتريفیکاسیون، بیانگر کیفیت بالاتر آب تولیدی نیز است.

در مجموع، نتایج این بخش نشان داد که اگرچه دنیتريفيکاسيون هتروتروف از نظر سرعت اوليه حذف نيتروژن نيتراتي عملکرد مطلوب تري دارد، اما از منظر پايداري مسير دنيتريفيکاسيون، کنترل تجمع نيتروژن نيتريتي و کيفيت آب خروجي، سامانه دنيتريفيکاسيون هيدروژنوتروف عملکرد برتري از خود نشان مي دهد. اين يافته ها بيانگر آن است که انتخاب نوع فرايند دنيتريفيکاسيون بايد علاوه بر سرعت حذف آلاينده، بر اساس کيفيت نهايي آب، پايداري فرايند و الزامات بهره برداري، به ويژه در کاربردهاي مرتبط با توليد آب آشاميدني، انجام گيرد.



شکل ۳. تغيير غلظت نيتروژن نيتريتي توليدي در طول دو فرايند دنيتريفيکاسيون هتروتروف و اتوتروف

۳.۳. توليد زيست توده و پيامدهاي بهره برداري

نتايج داد که ميزان زيست توده توليدي در سيستم دنيتريفيکاسيون هتروتروف به طور معنا داري بيشتر از سيستم هيدروژنوتروف است ($p < 0.05$)، به طوري که غلظت زيست توده در سيستم هتروتروف به حدود 0.09 گرم بر ليتر و در سيستم هيدروژنوتروف به حدود 0.05 گرم بر ليتر رسيد. اين اختلاف عمدتاً به نرخ رشد بالاتر ميكروارگانيسم هاي هتروتروف و استفاده از منبع کربن آلي خارجي براي تأمين انرژي و الکترون نسبت داده مي شود. در سيستم هاي هتروتروف، بخش قابل توجهي از کربن مصرفي صرف سنتز سلولي شده و منجر به افزايش توليد زيست توده مي شود، در حالي که در سيستم هاي هيدروژنوتروف، انرژي حاصل از اکسيداسيون هيدروژن عمدتاً صرف نگهداشت سلولي شده و رشد خالص زيست توده محدودتر است. توليد زيست توده 0.09 g/L در سيستم هتروتروف با مقادير گزارش شده توسط Rossi et al., (2015) به مقدار 0.1 g/L و Smail et al., (2025) به مقدار 0.08 g/L قابل مقايسه است. در ايران، Mirbagheri et al., (2016) توليد زيست توده 0.07 g/L را در راکتور RBC گزارش کردند که کمي پايين تر از مقدار بدست آمده در اين تحقيق است که احتمالاً به دليل چسبیدن بيوفيلم به حامل ها است. توليد زيست توده 0.05 g/L در سيستم هيدروژنوتروف با يافته هاي Karanasios et al., (2010) با مقادير 0.04 تا 0.06 گرم بر ليتر و Chen et al., (2022) با مقدار 0.05 گرم بر ليتر نيز همخواني کامل دارد که البته اين کاهش زيست توده توليدي در هيدروژنوتروف ها يکي از مزايای اصلي آنها نسبت به هتروتروف ها مي باشد.

Abascal et al., (2022) و Mirbagheri et al., (2016) نیز گزارش کرده‌اند که تولید زیست‌توده بالا در سیستم‌های هتروتروف می‌تواند پیامدهای عملیاتی نامطلوبی از جمله افزایش کدورت آب خروجی، انسداد بسترهای فیلتراسیون، افزایش افت فشار و نیاز به مدیریت و دفع لجن بیولوژیکی اضافی را به همراه داشته باشد. این چالش‌ها به‌ویژه در کاربردهای مرتبط با تصفیه آب آشامیدنی اهمیت بیشتری پیدا می‌کنند، زیرا پایداری بهره‌برداری و کیفیت آب خروجی در اولویت قرار دارد. در مقابل، رشد آهسته‌تر و تولید زیست‌توده کمتر در سیستم دنیتریفیکاسیون هیدروژنوتروف موجب افزایش پایداری عملیاتی، کاهش دفعات شست‌وشوی معکوس فیلترها و کاهش هزینه‌های مرتبط با دفع لجن می‌شود. این ویژگی در مطالعات (Karanasios et al., 2010) و Pang and Wang (2021) و Zhao et al., (2025) به‌عنوان یکی از مزایای اصلی دنیتریفیکاسیون هیدروژنوتروف برای تصفیه آب‌های زیرزمینی با بار آلی پایین معرفی شده است. از دیدگاه بهره‌برداری بلندمدت، کاهش تولید زیست‌توده در این سیستم‌ها می‌تواند منجر به افزایش قابلیت اطمینان فرآیند و کاهش نیاز به مداخلات عملیاتی شود.

۳.۴. COD باقی‌مانده و کیفیت آب خروجی

بررسی COD باقی‌مانده در آب خروجی نشان داد که در سیستم دنیتریفیکاسیون هتروتروف، غلظت COD حدود ۹۵ میلی گرم بر لیتر است که به‌طور معنی‌داری بیشتر از سامانه هیدروژنوتروف بوده ($p < 0.05$) و بیانگر مصرف ناقص منبع کربن آلی افزوده‌شده به سیستم است. حضور COD محلول در آب خروجی می‌تواند منجر به رشد میکروبی ثانویه در شبکه توزیع آب، افزایش ناپایداری زیستی و بالا رفتن پتانسیل تشکیل محصولات جانبی گندزدایی، به‌ویژه در فرآیندهای مبتنی بر کلرزی، شود (Abascal et al., 2019; Rezvani et al., 2022). از این رو، بالا بودن COD خروجی یکی از محدودیت‌های اساسی سیستم‌های هتروتروف در کاربردهای مرتبط با آب آشامیدنی محسوب می‌شود. در مقابل، COD آب خروجی در سیستم دنیتریفیکاسیون هیدروژنوتروف حدود ۱۵ میلی گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد که در محدوده قابل قبول برای آب آشامیدنی قرار دارد. پایین بودن COD در این سیستم به حذف نیاز به منبع کربن آلی خارجی و استفاده از هیدروژن به‌عنوان دهنده الکترون نسبت داده می‌شود. مطالعات (Chen et al., 2022) و Tang et al., (2012) نشان داده است که COD کمتر از ۲۰ میلی گرم بر لیتر خطر رشد بیولوژیکی ثانویه و تشکیل بیوفیلم ناخواسته در شبکه توزیع را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد.

از آنجاییکه در مطالعه حاضر، COD اولیه آب خام (آب چاه) پیش از ورود به بیوراکتورها اندازه‌گیری شد و مقدار آن کمتر از حد تشخیص روش استاندارد یعنی کمتر از ۵ میلی گرم بر لیتر بود؛ بنابراین، COD موجود در پساب خروجی عمدتاً ناشی از فرآیندهای زیستی داخل راکتور است. در سامانه هتروتروف، تزریق منبع کربن آلی (دکستروز) سبب باقی ماندن بخشی از کربن مصرف‌نشده و همچنین آزاد شدن مواد آلی محلول ناشی از متابولیسم و تجزیه زیست‌توده می‌شود که در نهایت COD خروجی را به حدود ۹۵ میلی گرم بر لیتر رساند. در مقابل، در سامانه هیدروژنوتروف به دلیل عدم استفاده از منبع کربن آلی در ورودی، COD خروجی (حدود ۱۵ میلی گرم بر لیتر) عمدتاً به مواد آلی محلول حاصل از محصولات متابولیکی و بخش اندکی از زیست‌توده جداشده از بیوفیلم نسبت داده می‌شود. بنابراین، مقدار پایین COD در این سامانه با سازوکار بیولوژیکی فرآیند هیدروژنوتروف سازگار بوده و نشان می‌دهد که منشأ اصلی COD خروجی، آب خام نبوده بلکه فرآیندهای زیستی داخل راکتور است. این نتایج با مطالعات Mirbagheri et al., (2016) نیز همخوانی دارد که در سامانه‌های دنیتریفیکاسیون هتروتروف، COD خروجی را در برخی شرایط بیش از ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر گزارش کرده و استفاده از مرحله پس‌تصفیه را ضروری دانسته‌اند. در مقابل، (Chen et al., 2022) در سامانه‌های هیدروژنوتروف مقادیر COD خروجی کمتر از ۲۰ میلی گرم بر لیتر را گزارش کردند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

از دیدگاه کیفیت آب آشامیدنی، باقی‌ماندن COD به‌ویژه در سامانه هتروتروف (۹۵ میلی گرم بر لیتر) می‌تواند پیامدهای نامطلوبی به همراه داشته باشد. مواد آلی محلول، بستر مناسبی برای رشد مجدد میکروارگانیسم‌ها در شبکه توزیع فراهم کرده و موجب کاهش

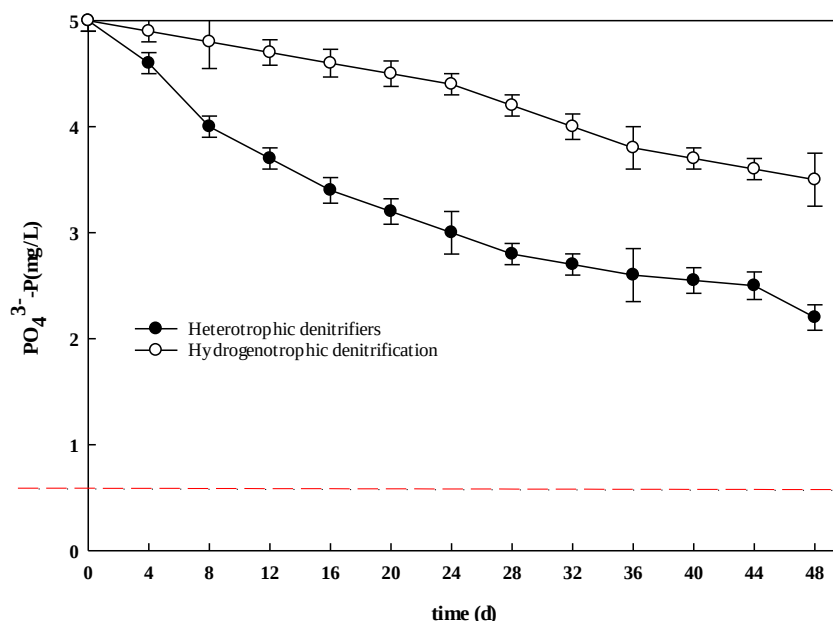
پایداری بیولوژیکی آب و افزایش احتمال بروز مشکلات طعم و بو می‌شوند. علاوه بر این، این ترکیبات در مرحله گندزدایی با کلر به‌عنوان پیش‌ساز محصولات جانبی گندزدایی (DBPs)، به‌ویژه تری‌هالومتان‌ها (THMs)، عمل کرده و خطر تشکیل این ترکیبات را افزایش می‌دهند. در مقابل، به دلیل پایین بودن COD در سامانه هیدروژنوتروف (حدود ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر)، انتظار می‌رود پتانسیل رشد مجدد میکروبی و تشکیل THMs به‌طور قابل توجهی کمتر باشد، هرچند حذف کامل این مخاطرات مستلزم ارزیابی پارامترهایی مانند کربن آلی محلول (DOC)، کربن آلی قابل جذب (AOC) و اندازه‌گیری مستقیم DBPs پس از کلرزنی است. از این‌رو، برای کاربرد در تصفیه آب شرب، به‌ویژه در سامانه هتروتروف، استفاده از یک مرحله پس‌تصفیه مانند جذب روی کربن فعال، انعقاد-لخته‌سازی یا سایر فرآیندهای حذف مواد آلی پیش از گندزدایی نهایی توصیه می‌شود تا ضمن کاهش COD، احتمال تشکیل محصولات جانبی گندزدایی، مشکلات طعم و بو و رشد مجدد میکروبی در شبکه توزیع نیز به حداقل برسد.

۳.۵. مصرف فسفر و الزامات تغذیه‌ای

بررسی تغییرات غلظت فسفر فسفاتی ($PO_4^{3-}-P$) در دو فرآیند دنیتریفیکاسیون هتروتروف و هیدروژنوتروف (شکل ۴) نشان داد که میزان مصرف فسفر در سیستم هتروتروف به‌طور معناداری بیشتر از سیستم هیدروژنوتروف است ($p < 0.05$). در این مطالعه، غلظت اولیه $PO_4^{3-}-P$ برابر با ۵ میلی‌گرم بر لیتر بود که در پایان دوره بهره‌برداری به حدود ۲/۲ میلی‌گرم بر لیتر در سیستم هتروتروف و به حدود ۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر در سیستم هیدروژنوتروف کاهش یافت. این تفاوت عمدتاً به نیاز تغذیه‌ای بالاتر میکروارگانیسم‌های هتروتروف برای سنتز زیست‌توده و تقسیم سلولی نسبت داده می‌شود.

Wang et al., (2018) نشان داده‌اند که محدودیت فسفر اثر منفی شدیدتری بر راندمان دنیتریفیکاسیون هتروتروف نسبت به سیستم‌های اتوتروف دارد، زیرا کاهش فسفر مستقیماً رشد زیست‌توده و فعالیت آنزیمی را محدود می‌کند. در مقابل، در سیستم‌های هیدروژنوتروف، به‌دلیل نرخ رشد پایین‌تر میکروارگانیسم‌ها، نیاز فسفوری کمتر بوده و فرآیند از پایداری بیشتری در شرایط کم‌مغذی برخوردار است. با این حال، Zhang et al., (2023) و Peng et al., (2024) تأکید کرده‌اند که در سیستم‌های هیدروژنوتروف، مدیریت دقیق نسبت N:P برای جلوگیری از باقی‌ماندن فسفر در آب خروجی و حفظ پایداری زیستی سیستم ضروری است.

از منظر کاربرد در تصفیه آب آشامیدنی، غلظت فسفر فسفاتی باقی‌مانده در آب خروجی هر دو سیستم (به‌ویژه ۲/۲ میلی‌گرم بر لیتر در هتروتروف و ۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر در هیدروژنوتروف) به‌طور قابل توجهی بالاتر از حد مجاز استاندارد آب شرب (حداکثر ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر) است و می‌تواند زمینه‌ساز رشد میکروبی ثانویه در شبکه توزیع شود. این موضوع نشان‌دهنده نیاز قطعی به یک مرحله پاکسازی نهایی پیش از توزیع آب در شبکه است. در این راستا، استفاده از مراحل تصفیه تکمیلی ساده نظیر جذب فسفر با فیلترهای حاوی جاذب‌هایی مانند اکسیدهای آهن یا آلومینیوم یا نانوفیلتراسیون می‌تواند به‌عنوان راهکاری کم‌هزینه و مؤثر برای تضمین پایداری زیستی و ارتقای کیفیت نهایی آب خروجی مورد استفاده قرار گیرد (Peng et al., 2024; Zhang et al., 2023).



شکل ۴. تغییر غلظت فسفر فسفاتی باقی مانده در محیط در طول ۴۸ ساعت از دنیتریفیکاسیون هتروتروف و اتوتروف

جدول ۲ خلاصه‌ای از عملکرد دو فرآیند دنیتریفیکاسیون هتروتروف و هیدروژنوتروف را ارائه می‌دهد و نتایج حاصله از آزمایش را برجسته می‌کند. مطابق با جدول ۱، سیستم هتروتروف NO_2^- ، تولید زیست‌توده و COD باقی‌مانده بالاتری دارد، در حالی که سیستم هیدروژنوتروف با NO_2^- پایین‌تر، زیست‌توده و COD کمتر، پایداری و کیفیت آب خروجی بهتری ارائه می‌دهد. این یافته‌ها سرعت بالای حذف نیتрат در هتروتروف و پایداری بلندمدت در هیدروژنوتروف را برجسته می‌کنند.

جدول ۲. خلاصه نتایج مرتبط به دنیتریفیکاسیون هتروتروف و هیدروژنوتروف در تصفیه آب چاه

فرایند	COD باقی مانده در محیط (mg/L)	زیست توده تولید شده (g/L)	$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ باقی مانده در محیط (mg/L)	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg/L) باقی مانده در محیط	$\text{NO}_2^-\text{-N}$ (mg/L) باقیمانده در محیط
دنیتریفیکاسیون هتروتروف	95 ± 1	$\pm 0.002 / 0.09$	3.5 ± 0.4	3 ± 0.5	4 ± 0.75
دنیتریفیکاسیون هیدروژنوتروف	15 ± 1.5	$\pm 0.001 / 0.05$	2.2 ± 0.5	3 ± 0.5	$< 3 \pm 0.5$

۴. جمع‌بندی نهایی

نتایج این مطالعه نشان داد که هر دو فرآیند دنیتریفیکاسیون هتروتروف و هیدروژنوتروف از کارایی بالایی در حذف نیترات از آب‌های زیرزمینی برخوردار هستند، با این حال تفاوت‌های معناداری از نظر سینتیک حذف، پایداری فرآیند و کیفیت آب خروجی میان آن‌ها

مشاهده شد. دنیتریفیکاسیون هتروتروف حذف سریع‌تر نیترات را در مراحل اولیه فراهم می‌کند، اما با تجمع موقت نیتريت، تولید زیست‌توده بیشتر و باقی‌ماندن COD همراه است که می‌تواند محدودیت‌هایی برای کاربرد در تصفیه آب آشامیدنی ایجاد کند. در مقابل، سیستم دنیتریفیکاسیون هیدروژنوتروف اگرچه از نظر سرعت اولیه حذف نیترات عملکرد کندتری دارد، اما به دلیل پایداری مسیر دنیتریفیکاسیون، تولید کمتر نیتريت، COD و زیست‌توده، کیفیت بالاتری از آب خروجی را فراهم می‌سازد. در هر دو سیستم، مدیریت نسبت عناصر غذایی و شرایط عملیاتی نقش کلیدی در عملکرد مطلوب فرآیند دارد؛ با این حال، مصرف کمتر مواد مغذی، تولید لجن پایین‌تر و پایداری زیستی بالاتر آب خروجی به دلیل تولید حداقل زیست‌توده، COD محلول باقیمانده ناچیز و عدم تجمع نیتريت که مانع از رشد مجدد میکروارگانیسم‌های ثانویه و تولید در شبکه توزیع آب می‌شود، سیستم هیدروژنوتروف را به گزینه‌ای مناسب‌تر و پایدارتر برای تصفیه آب‌های حاوی نیترات و طراحی سامانه‌های کارآمد و سازگار با محیط‌زیست تبدیل می‌کند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از تمامی همکاران در پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، بالاخص آزمایشگاه محیط زیست که در انجام این پروژه با بنده همکاری داشته‌اند، صمیمانه سپاسگزاری و قدردانی می‌نمایم.

اظهارنامه مالی

این پژوهش با حمایت مالی و اجرایی طرح تحقیقاتی مصوب بنیاد ملی علم ایران به شماره ۴۰۳۴۰۰۹ و در پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انجام شده است.

اظهارنامه نحوه استفاده از هوش مصنوعی

در ویرایش کلی متن و یافتن برخی منابع مرتبط، از ابزار هوش مصنوعی استفاده شده است.

مراجع:

- Abascal, E., Gómez-Coma, L., Ortiz, I., and Ortiz, A., (2022), "Global diagnosis of nitrate pollution in groundwater and review of removal technologies", *Science of the Total Environment*, 810, 152233, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152233>
- Aghabalaee, V., Baghdadi, M., Aminzadeh Goharrizi, B., and Noorimotlagh, Z., (2024), "A systematic review of strategies to overcome barrier for nitrate separation systems from drinking water: Focusing on waste streams treatment processes", *Chemosphere*, 349, 140757, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140757>
- Albina, P., Durban, N., Bertron, A., Albrecht, A., Robinet, J.-C., and Erable, B., (2019), "Influence of hydrogen electron donor, alkaline pH, and high nitrate concentrations on microbial denitrification: A review", *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5163, <https://doi.org/10.3390/ijms20205163>
- Amarine, M., Jerroumi, S., Lekhlif, B., Zouheir, Y., Chafik, A., Mliji, E.M., and Echaabi, J., (2022), "Nitrate removal from groundwater using an activated sludge as a source of bacteria", *Water Quality Research Journal*, 57(3), 165–176, <https://doi.org/10.2166/wqrj.2022.005>
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association, and Water Environment Federation, (2017), "Standard methods for the examination of water and wastewater", 23rd ed., Washington, DC: American Public Health Association.
- Chen, Y.Z., Zhang, L.J., Ding, L.Y., Zhang, Y.Y., Wang, X.S., Qiao, X.J., Pan, B.Z., Wang, Z.W., Xu, N., and Tao, H.C., (2022), "Sustainable treatment of nitrate-containing wastewater by an autotrophic hydrogen-oxidizing

- bacterium”, *Environmental Science and Ecotechnology*, 9, 100146, <https://doi.org/10.1016/j.es.2022.100146>
- Duffner, C., Wunderlich, A., Schlöter, M., Schulz, S., and Einsiedl, F., (2021), “Strategies to overcome intermediate accumulation during in situ nitrate remediation in groundwater by hydrogenotrophic denitrification”, *Frontiers in Microbiology*, 12, 610437, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.610437>
- Ghafari, S., Hasan, M., and Aroua, M. K., (2009), “Nitrate remediation in a novel upflow bio-electrochemical reactor (UBER) using palm shell activated carbon as cathode material”, *Electrochimica Acta*, 54(17), 4164–4171, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.02.062>
- Henze, M., van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G. A., and Brdjanovic, D., (2008), “Biological wastewater treatment: Principles, modelling and design”, *IWA Publishing*, <https://doi.org/10.2166/9781780401867>
- Kamei, T., Tsutsumi, Y., Rujakom, S., Eamrat, R., and Kazama, F., (2023), “Hydrogenotrophic denitrification for treatment of nitrate-contaminated groundwater: Using a microbubble diffuser to optimize performance”, *Journal of Water Process Engineering*, 55, 104062, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.104062>
- Karanasios, K.A., Vasiliadou, I.A., Pavlou, S., and Vayenas, D.V., (2010), “Hydrogenotrophic denitrification of potable water: A review”, *Journal of Hazardous Materials*, 180(1–3), 20–37, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.04.090>
- Lee, K. C., and Rittmann, B. E., (2003), "Effects of pH and precipitation on autohydrogenotrophic denitrification using the membrane-biofilm process", *Water Research*, 37(7), 1551–1556, [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00519-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00519-5)
- Metcalf and Eddy, Inc., (2014), “Wastewater engineering: Treatment and resource recovery”, 5th ed., McGraw-Hill Education.
- Mirbagheri, S.A., Ahmadi, S., and Biglari-Joo, N., (2016), “Denitrification of nitrate-contaminated groundwater in an anoxic rotating biological contactor: A case study”, *Desalination and Water Treatment*, 57, 4694–4700, <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.994106>
- Pang, Y., and Wang, J., (2021), “Various electron donors for biological nitrate removal: A review”, *Science of the Total Environment*, 794, 148699, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148699>
- Peng, Y., Gu, X., Zhang, M., Yan, P., Sun, S., and He, S., (2024), “Simultaneously enhanced autotrophic–heterotrophic denitrification in iron-based ecological floating bed by plant biomass: Metagenomics insights into microbial communities, functional genes and nitrogen metabolic pathways”, *Water Research*, 248, 120868, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120868>
- Rezvani, F., and Sarrafzadeh, M. H., (2025), “Innovative strategy for nitrate removal from groundwater: Synergistic interactions of autotrophic microalgae and heterotrophic denitrifiers in sequential batch process”, *Water, Air, and Soil Pollution*, 236(13), 860, <https://doi.org/10.1007/s11270-025-08516-8>
- Rezvani, F., Sarrafzadeh, M. H., and Oh, H. M. (2020), “Hydrogen producer microalgae in interaction with hydrogen consumer denitrifiers as a novel strategy for nitrate removal from groundwater and biomass production”, *Algal research*, 45, 101747, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101747>
- Rezvani, F., Sarrafzadeh, M.H., Ebrahimi, S., and Oh, H.M., (2019), “Nitrate removal from drinking water with a focus on biological methods: A review”, *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 1124–1141, <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9185-0>
- Roshanravan, H., Borghei, S.M., Hassani, A.H., and Vagheei, R., (2021), “Nitrate removal from drinking water wells by heterotrophic denitrification using citric acid as a carbon source and ozonation”, *Water and Wastewater Journal*, 31 (7), 63-77, <https://doi.org/10.22093/wwj.2020.201484.2928>
- Rossi, F., Motta, O., Matrella, S., Proto, A., and Vigliotta, G., (2015), “Nitrate removal from wastewater through biological denitrification with OGA 24 in a batch reactor”, *Water*, 7(1), 51–62, <https://doi.org/10.3390/w7010051>

- Smail, S.S., Lemlikchi, W., Benbelkacem, O., and Fauconnier, M.L., (2025), "Heterotrophic denitrification for the simultaneous reduction of nitrates using acorn cups as an energy source", *Scientific Reports*, 15, 37186, <https://doi.org/10.1038/s41598-025-09460-7>
- Tang, Y., Zhou, C., Ziv-El, M., and Rittmann, B.E., (2011), "A pH-control model for heterotrophic and hydrogen-based autotrophic denitrification", *Water Research*, 45(1), 232–240, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.049>
- Tang, Y., Ziv-El, M., Meyer, K., Zhou, C., Shin, J.H., Ahn, C.H., McQuarrie, J., Candelaria, D., Swaim, P., Scott, R., and Rittmann, B., (2012), "Comparing heterotrophic and hydrogen-based autotrophic denitrification reactors for effluent water quality and post-treatment", *Water Science and Technology: Water Supply*, 12(2), 227–233, <https://doi.org/10.2166/ws.2012.138>
- Taşkın, E.G., and Cuci, Y., (2019), "Removal of nitrate from groundwater using a hydrogen-based membrane biofilm reactor: The effects of hydrogen pressure and hydraulic retention time", *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 13(38), 101–106, <https://izlik.org/JA63GJ33WU>
- Wang, Z., He, S., Huang, J., Zhou, W., and Chen, W., (2018), "Comparison of heterotrophic and autotrophic denitrification processes for nitrate removal from phosphorus-limited surface water", *Environmental Pollution*, 238, 562–572, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.080>
- World Health Organization (WHO), (2022), "Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda", Geneva: World Health Organization. <https://doi.org/10.2471/9789240045064>
- Ye, Y., Zhang, K., Peng, X., Zhou, Q., Pan, Z., Xing, B., and Liu, X., (2025), "Research progress on biological denitrification process in wastewater treatment", *Water*, 17(4), 520, <https://doi.org/10.3390/w17040520>
- Zhang, J., Fan, C., Zhao, M., Wang, Z., Jiang, S., Jin, Z., Bei, K., Zheng, X., Wu, S., Lin, P., and Miu, H., (2023), "A comprehensive review on mixotrophic denitrification processes for biological nitrogen removal", *Chemosphere*, 313, 137474, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137474>
- Zhao, Y.-F., Lai, C.-Y., and Zhao, H.-P., (2025), "Investigation of nitrogen conversion efficiency in hydrogen-based autotrophic nitrate reduction reactor", *Journal of Water Process Engineering*, 72, 107536, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107536>