

بهینه‌سازی جذب زیستی مالاشیت گرین از محلول‌های آبی با استفاده از ریز جلبک‌های سبز

مسعود کوشا^۱، امیدوار فرهادیان*^۲، سالار درافشان^۳، نصراله محبوبی صوفیانی^۴

masoudkoush76@gmail.com

۱. کارشناس ارشد، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. دانشیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

sdorafshan@cc.iut.ac.ir

۳. استادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

soofiani@cc.iut.ac.ir

۴. استاد دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۱۴

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۹

چکیده

در مطالعه حاضر، از ریزجلبک‌های سبز *Chlorella vulgaris* و *Scenedesmus quadricauda* برای بهینه‌سازی شرایط در جذب زیستی مالاشیت گرین استفاده شد. در این آزمایش‌ها تأثیر همزمان ۴ فاکتور اصلی غلظت اولیه مالاشیت گرین (۲، ۶ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)، pH اولیه محلول حاوی مالاشیت گرین (۳، ۴/۵ و ۶)، وزن زیتوده جلبک‌ها (۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) و مدت زمان انجام آزمایش (۱۰، ۵۰ و ۹۰ دقیقه) بر بازده حذف مالاشیت گرین با استفاده از روش باکس-بنکن ارزیابی شد. آنالیز واریانس داده‌های آزمایش طرح رویه‌های پاسخ برای اعتبارسنجی مدل پیشنهادی انجام گرفت. سپس، معادله‌های چندمتغیره مرتبه دوم و مدل‌های درجه دوم برای تعیین رابطه بین بازده حذف مالاشیت گرین و ۴ فاکتور مؤثر مستقل ارائه شدند. ضریب همبستگی بالا ($>0/99$)، مقدار P-value معنی‌دار ($<0/0001$) و مقدار آماره LoF بی‌معنی ($>0/05$) نشان‌دهنده دقت بالا و اعتبار مدل پیشنهادی به منظور پیش‌بینی بازده حذف مالاشیت گرین از طریق *C. vulgaris* و *S. quadricauda* از محلول‌های آبی‌اند. از این رو، این مدل‌ها به منظور آنالیزهای بعدی استفاده شدند. بر این اساس برای هر دو جاذب، بازده حذف مالاشیت گرین همواره با کاهش غلظت اولیه مالاشیت گرین از ۱۰ به ۲ میلی‌گرم بر لیتر، افزایش pH اولیه محلول حاوی مالاشیت گرین از ۳ به ۶، زیتوده جلبک‌ها به صورت تقریبی از ۴۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان انجام آزمایش از ۱۰ تا ۹۰ دقیقه افزایش نشان داد. ظرفیت جذب زیستی *C. vulgaris* و *S. quadricauda* به ترتیب ۵۷/۱۷ و ۶۸/۴۹ میلی‌گرم بر گرم اندازه‌گیری شد.

کلیدواژه

جذب زیستی، رویه‌های پاسخ، مالاشیت گرین، *Chlorella vulgaris*، *Scenedesmus quadricauda*.

۱. سرآغاز

سرطان‌زایی و جهش‌زایی‌اند (Cheng, et al., 2009). یکی از این مواد مالاشیت گرین^۱ است که به‌منزله ترکیب رنگی با ساختار شیمیایی تری فنیل متان، به‌طور گسترده‌ای علیه انگل‌های خارجی، قارچ‌ها و باکتری‌ها در صنعت تکتیر و پرورش ماهیان و سخت‌پوستان استفاده شده است. همچنین، از آن در صنایع رنگی برای رنگ‌آمیزی موادی چون ابریشم، پشم، کف، چرم و کاغذ

در آینده‌ای نزدیک باید هزینه‌های سرسام‌آوری بابت جبران صدمات ناشی از فعالیت‌های صنعتی و پیشرفت‌های تکنولوژیکی پرداخت شود (Gupta and Suhas, 2009). امروزه رنگ‌ها، کاربردها و نقش‌های مختلفی در بسیاری از صنایع دارند (Culp and Beland, 1996). اما با وجود این، بسیاری از آن‌ها برای انسان‌ها و سایر جانوران دارای آثار

استفاده می‌شود. مالاشیت گرین به طور مؤثری عفونت‌های ناشی از باکتری، قارچ، پروتوزوا^۲، سستود^۳، نماتود^۴، ترماتود^۵ و سخت‌پوستان^۶ را در آبی‌پروری کنترل می‌کند، اما دارای آثار سمی است و موجب بروز تومور در کبد پستانداران می‌شود (Srivastava, et al., 2004). علاوه بر این، تحقیقات نشان داده است که مالاشیت گرین سبب گلیکوژنولایزیز عضلانی، سنتز پروتئین‌های جفتی، آسیب شدید آبشش‌ها و تغییرات فساد در ماهیان می‌شود. مالاشیت گرین همراه فرم کاهش‌یافته خود یعنی لوکومالاشیت گرین در بافت‌های خوراکی ماهیان برای مدت طولانی باقی می‌ماند (Kumar, et al., 2005). بنابراین، مصرف مقادیر بیش از حد مجاز مالاشیت گرین به علت آثار مخرب زیست‌محیطی و تهدید سلامت پستانداران و انسان‌ها حائز اهمیت است و توجه ویژه برای رفع این مشکل ضروری است (Parshetti, et al., 2006). تاکنون چندین روش فیزیکوشیمیایی معمول چون ته‌نشینی شیمیایی^۷، عصاره‌گیری حلال^۸، رزین تبادل یونی^۹، جداسازی غشایی^{۱۰}، از ناسیون^{۱۱}، فتواکسیداسیون^{۱۲}، انعقاد الکتریکی^{۱۳}، شناورسازی کف^{۱۴}، اسمز معکوس^{۱۵}، تعویض یونی^{۱۶} و لخته‌سازی^{۱۷} به منظور حذف مالاشیت گرین و سایر ترکیبات آلی مضر از پساب‌ها به کار رفته است (Kaushik and Malik, 2009).

بر اساس ساختار مولکولی و کمپلکس آروماتیکی رنگ‌ها، به طور کلی رنگ‌ها به نور، فعالیت‌های بیولوژیکی، عوامل اکساینده و سایر شرایط زیست‌محیطی تجزیه‌ای مقاوم‌اند (Mondal, ; Forgacs, et al., 2004). از این رو، سیستم‌های تصفیه بیولوژیکی مرسوم در تصفیه پساب‌های شامل رنگ‌ها ناکارآمدند. از طرف دیگر، این روش‌ها دارای معایبی چون حذف ناقص مالاشیت گرین و تجهیزات گران‌قیمت‌اند و به سیستم نظارت، انرژی و مصرف بالای مواد شیمیایی و تولید لجن سمی نیاز دارند (Ertugrul, et al., 2009).

استفاده از فرایندهای زیستی در تصفیه پساب‌های آلوده

و غنی از آلاینده ضمن رفع مشکلات و تکمیل روش‌های فیزیکی و شیمیایی معمول، ابزاری اقتصادی و کم‌هزینه برای تصفیه پساب‌های آلوده را فراهم می‌آورد. امروزه یک توجه ویژه به استفاده از انواع مختلف زیتوده‌های ارزان برای حذف آلاینده‌های معدنی و آلی از پساب‌ها پدید آمده است (Khataee, 2009; Aleboeyeh, et al., 2008). در سال‌های اخیر مطالعاتی در میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری، قارچ و جلبک‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی انجام شده است (Gupta ; Daneshvar, et al., 2007a; Banat, et al., 1996). اما محققان (Kaushik and Malik, 2009; and Suhas, 2009) به جلبک‌ها به لحاظ پتانسیل بالای‌شان در حفاظت محیط‌زیست توجه بسیاری کرده‌اند (Tahir and Rauf, 2006). جاذب‌های جلبکی به علت ساختار سلولزی دیواره سلولی، مکان‌های اتصال کربوکسیلی و هیدروکسیلی بیشتری دارند (Tunali, et al., 2006).

جلبک‌ها، ارگانیسم‌های فتوسنتزکننده‌ای به شمار می‌روند که تقریباً در تمام نقاط جهان و انواع زیستگاه‌ها وجود دارند (Bellinger and Sige, 2010). آن‌ها در تجزیه و حذف ترکیبات شیمیایی توانایی‌های مختلفی دارند، اما میزان این توانایی به ساختار شیمیایی ترکیب و نوع گونه جلبکی وابسته است (Kumar, et al., 2006). (Jabasingh and Pavithra, 2010).

استفاده از جلبک‌ها به صورت زیتوده خشک، بر خلاف شکل فعال و زنده محدودیت‌های چندانی ندارد. نظر به اینکه جلبک‌های فعال (زنده) امکان رشد و ادامه حیات در دماهای بالاتر از ۲۴ درجه سانتی‌گراد و pH کمتر از ۷ (مثلاً ۳، ۴/۵ و ۶ در مطالعه حاضر) را ندارند، شرایط بهینه جاذب در محیط آبی در دامنه نسبتاً مناسب حرارتی و pH در کارایی آن جاذب نقش کلیدی دارند. لذا، در پساب‌های متنوع با گستره دمایی متغیر، جلبک‌های زنده نمی‌توانند استفاده زیادی داشته باشند، لذا کاربرد آن‌ها به فرم زنده محدود می‌شود. همچنین، بی‌نیازی به سیستم نگهداری و پرورش، لزوم استفاده از زیتوده خشک را ضروری می‌کند.

لیتری حاوی آب استریل شده و محیط کشت استفاده شد، که برای هرگونه جلبک ۲ دوره کشت صورت گرفت. در این تحقیق برای کشت ریزجلبک‌های سندسموس و کلرلا از محیط کشت ^{18}BBM استفاده شد. در هر دوره کشت، پس از طی ۱۰ روز جلبک‌ها به حداکثر رشد خود می‌رسیدند. پس از آن، برای جداسازی زیتوده جلبک‌ها از محلول، آن‌ها در لوله‌های مخصوص ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و از طریق دستگاه سانتریفیوژ در سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه در مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌شدند. با ادامه این روند برای تمام ظروف کشت، در ظروف مجزای کوچک ۱۰۰ میلی‌لیتری مخلوط تغلیظ شده از هر دو جلبک سندسموس و کلرلا به دست آمد. نمونه تغلیظ شده جلبکی برای استفاده بعدی در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تهیه زیتوده خشک، محلول‌های تغلیظ شده را در پتری دیش‌های استریل شده ریختند و ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از آن، سلول‌های خشک شده جلبکی، از طریق هاون طی ۳ مرحله به صورت دستی کاملاً ساییده و به ذرات کاملاً ریز و یکنواخت (حالت پودری) تبدیل شدند. سپس، از زیتوده‌های آماده شده برای انجام آزمایش‌های جذب زیستی مالاشیت گرین استفاده شد.

۲.۳. طرح آماری رویه‌های پاسخ^{۱۹} برای آزمایش‌های جذب زیستی

وابستگی بازده جذب مالاشیت گرین از طریق جلبک‌ها به غلظت اولیه مالاشیت گرین، pH اولیه محلول، مقدار زیتوده جلبک و زمان آزمایش فرایند جذب زیستی قبلاً در مقالات مشخص شده است (Daneshvar, et al., 2007b). بنابراین، ۴ متغیر اصلی غلظت اولیه مالاشیت گرین (۲-۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)، pH اولیه محلول (۳-۶)، مقدار زیتوده جلبک (۴۰-۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) و زمان انجام آزمایش (۹۰-۱۰ دقیقه) برای بررسی مقدار تأثیرگذاری بر بازده جذب مالاشیت گرین از طریق کلرلا و سندسموس انتخاب شدند (جدول ۱).

جلبک‌های سبز سندسموس و کلرلا به علت فراوانی در آب‌های ایران، رشد سریع، تحمل بالای شرایط سخت طبیعی و پرورشی و سطح زیاد به ازای واحد وزن به منظور جذب رنگ انتخاب شدند. این جلبک‌ها در آب‌های آلوده داخلی و پساب‌های شهری شاخص‌اند و به فراوانی یافت می‌شوند. بنابراین، گسترش و سهولت دستیابی، به کاربردهای آن‌ها در این خصوص و موارد مشابه می‌افزاید. همچنین، در کشور ما با توجه به رشد روزافزون مراکز صنعتی و کشاورزی مختلف و داشتن منابع متنوع و غنی از جلبک‌ها در منابع آبی داخلی و دریایی لزوم انجام چنین مطالعاتی ضروری به نظر می‌رسد.

۲. مواد و روش بررسی

۲.۱. مواد شیمیایی مورد استفاده

تمام مواد شیمیایی استفاده شده در این آزمایش دارای درجه آزمایشگاهی بودند. استوک مالاشیت گرین به وسیله انحلال ۱۰۰ میلی‌گرم از ماده جامد کریستالی نمک اگزالات مالاشیت گرین (Serva, United States) در ۱ لیتر آب مقطر تهیه شد. سایر محلول‌های مورد استفاده در این تحقیق با رقیق‌سازی استوک اولیه مالاشیت گرین در گستره غلظت‌های مختلف ۰/۱-۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه و بلافاصله در آزمایش‌های جذب مالاشیت گرین استفاده شدند. مقدار pH اولیه هر محلول مالاشیت گرین قبل از شروع آزمایش با استفاده از محلول‌های مختلف رقیق شده ۰/۱-۱ مولار اسید سولفوریک و سود تغییر می‌یابد و به وسیله pH متر (744 pH meter Metrohm, Switzerland) اندازه‌گیری و در مقادیر مورد نظر تنظیم می‌شود.

۲.۲. آماده‌سازی جاذب‌ها

پس از تهیه استوک اولیه مناسب برای کشت انبوه جلبک‌های مورد مطالعه در آزمایشگاه شیلات دانشگاه صنعتی اصفهان، برای کشت انبوه جلبک‌ها از ۱۰ ظرف ۴

جدول ۱. طرح آزمایش‌های جذب زیستی مالاشیت گرین و مقدار بازده‌های واقعی و پیش‌بینی شده به دست آمده از طریق ریز جلبک‌های سبز *S. quadricauda* و *C. vulgaris* در روش باکس-بنکن

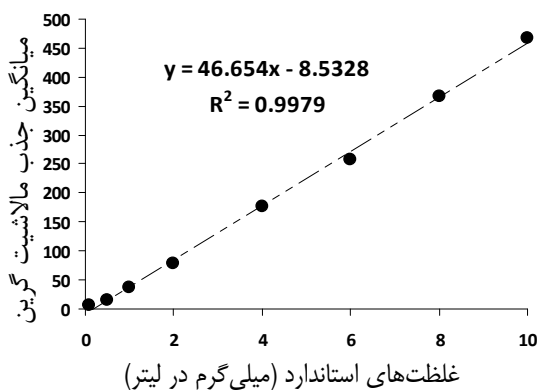
بازده جذب مالاشیت گرین (درصد)				مقادیر متغیرهای فرایند				شماره آزمایش
<i>C. vulgaris</i>		<i>S. quadricauda</i>		X_4	X_3	X_2	X_1	
تخمین	آزمایش	تخمین	آزمایش					
۶۶/۷	۶۵/۹	۶۸/۳	۶۹/۴	۵۰	۴۰	۶	۶	۱
۷۶/۴	۷۶/۲	۷۲/۳	۷۱/۹	۵۰	۱۲۰	۶	۶	۲
۸۲/۸	۸۳/۰	۵۸/۲	۵۹/۲	۹۰	۸۰	۴/۵	۱۰	۳
۶۸/۱	۶۸/۱	۶۲/۲	۶۳/۸	۵۰	۸۰	۴/۵	۶	۴
۶۷/۸	۶۷/۳	۶۹/۴	۷۰/۱	۵۰	۱۲۰	۴/۵	۲	۵
۵۵/۹	۵۷/۱	۴۲/۴	۴۰/۸	۵۰	۱۲۰	۳	۶	۶
۵۰/۹	۵۱/۲	۵۹/۸	۵۹/۲	۵۰	۴۰	۴/۵	۱۰	۷
۸۳/۴	۸۳/۵	۶۲/۰	۶۳/۲	۹۰	۱۲۰	۴/۵	۶	۸
۶۸/۱	۶۶/۹	۶۲/۲	۵۹/۸	۵۰	۸۰	۴/۵	۶	۹
۷۷/۵	۷۷/۸	۶۱/۸	۶۱/۲	۹۰	۴۰	۴/۵	۶	۱۰
۶۷/۶	۶۶/۲	۴۹/۴	۵۰/۳	۱۰	۱۲۰	۴/۵	۶	۱۱
۹۲/۵	۹۱/۲	۷۲/۱	۷۰/۵	۹۰	۸۰	۶	۶	۱۲
۵۰/۱	۵۱/۲	۳۰/۳	۳۱/۹	۱۰	۸۰	۳	۶	۱۳
۶۸/۱	۶۶/۶	۶۲/۲	۶۲/۴	۵۰	۸۰	۴/۵	۶	۱۴
۷۷/۰	۷۶/۳	۴۷/۸	۴۷/۶	۹۰	۸۰	۳	۶	۱۵
۴۳/۹	۴۴/۴	۴۲/۸	۴۲/۸	۵۰	۴۰	۳	۶	۱۶
۷۷/۹	۷۸/۴	۶۱/۳	۶۱/۶	۱۰	۸۰	۶	۶	۱۷
۶۸/۱	۷۰/۵	۶۲/۲	۶۱/۷	۵۰	۸۰	۴/۵	۶	۱۸
۷۴/۹	۷۵/۲	۷۱/۴	۷۲/۰	۵۰	۸۰	۶	۱۰	۱۹
۶۳/۶	۶۴/۴	۵۳/۸	۵۳/۰	۵۰	۱۲۰	۴/۵	۱۰	۲۰
۵۸/۹	۵۸/۷	۴۸/۳	۴۷/۸	۱۰	۸۰	۴/۵	۱۰	۲۱
۵۱/۸	۵۱/۷	۴۶/۱	۴۵/۳	۱۰	۴۰	۴/۵	۶	۲۲
۸۵/۷	۸۶/۲	۷۰/۳	۷۰/۳	۹۰	۸۰	۴/۵	۲	۲۳
۶۸/۱	۶۸/۳	۵۲/۰	۵۰/۶	۱۰	۸۰	۴/۵	۲	۲۴
۴۸/۱	۴۷/۶	۳۸/۳	۳۸/۷	۵۰	۸۰	۳	۱۰	۲۵
۵۹/۳	۵۸/۸	۵۱/۶	۵۱/۳	۵۰	۸۰	۳	۲	۲۶
۶۸/۱	۶۸/۶	۶۲/۲	۶۳/۴	۵۰	۸۰	۴/۵	۶	۲۷
۵۸/۷	۵۷/۶	۵۹/۹	۶۰/۸	۵۰	۴۰	۴/۵	۲	۲۸
۷۵/۸	۷۷/۲	۷۳/۸	۷۳/۸	۵۰	۸۰	۶	۲	۲۹

X_1 : غلظت اولیه مالاشیت گرین (میلی گرم بر لیتر)؛ X_2 : مقدار pH اولیه محلول؛ X_3 : مقدار زیتوده جلبک (میلی گرم بر لیتر)؛ X_4 : زمان انجام واکنش (دقیقه).

(Singh, et al., 2010):

$$\text{بازده جذب} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

که در آن C_i و C_f به ترتیب غلظت‌های اولیه و نهایی مالاویت گرین (بر حسب میلی گرم بر لیتر) و بازده جذب (بر حسب درصد) در محلول‌های آبی آزمایش به شمار می‌روند.



شکل ۱. منحنی استاندارد جذب رنگ مالاویت گرین در غلظت‌های استاندارد

۳. نتایج و بحث

۳.۱. تأیید صحت مدل

نتایج به دست آمده از طرح آماری رویه‌های پاسخ به روش باکس-بنکن برای هردو ریز جلبک سبز به طور خلاصه در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان دادند که بازده جذب مالاویت گرین در مقادیر مختلف از ۴ متغیر اصلی فرایند بسیار متفاوت نشان می‌دهد، که در نتیجه تجمع آثار انفرادی، دوتایی و چندتایی سطوح مختلف متغیرهای اصلی بر بازده جذب زیستی مالاویت گرین است. علاوه بر این، تفاوت اندک بین مقادیر بازده واقعی و پیش‌بینی شده نشان‌دهنده دقت بالای مدل در تخمین متغیر پاسخ (بازده جذب مالاویت گرین) است.

بر این اساس، آنالیز چندجمله‌ای^{۲۱} درجه دوم و مدل کوادراتیک^{۲۲} به منزله بهترین مدل برای یافتن رابطه بین متغیرهای اصلی و بازده جذب مالاویت گرین به کار گرفته شد. آنالیز واریانس (ANOVA) به منظور بازده حذف

برای بررسی تأثیر همزمان متغیرهای محیطی روی بازده جذب زیستی مالاویت گرین در ۳ سطح پایین (-۱)، متوسط (صفر) و بالا (+۱) از طرح آماری رویه‌های پاسخ به شیوه باکس-بنکن^{۲۰} استفاده شد. در این طرح آماری، برای انجام آزمایش جذب زیستی مالاویت گرین با ۴ متغیر اصلی در ۳ سطح معین شده، در مجموع ۲۹ آزمایش از طریق نرم‌افزار آماری Design Expert (Version 8.0.4, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) پیشنهاد شد.

۴.۲. شیوه انجام آزمایش‌های جذب زیستی

تمامی آزمایش‌های جذب زیستی در دمای 26 ± 2 درجه سانتی‌گراد روی شیکر (Dragon LAB, sk-330-pro, Germany) با سرعت ۱۳۵ دور بر دقیقه انجام شدند. واحدهای آزمایش ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری بودند. مطالعات جذب مالاویت گرین با مقادیر مختلفی از زیتوده‌های جلبکی ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محلول شامل ۲، ۶ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر مالاویت گرین در مقادیر pH اولیه محلول ۳، ۴/۵ و ۶ و زمان‌های آزمایش ۱۰، ۵۰ و ۹۰ دقیقه در ۲ تکرار انجام شد. در پایان هر یک از زمان‌های از پیش تعیین شده، محلول‌های نهایی از میکروفیلترهای غشایی ۰/۲ میکرون (Orange Scientific, GyroDisc CA-PC, Belgium) عبور کردند و محلول فیلترشده باقی‌مانده از طریق دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer, England Jenway, 6400) در طول موج جذب بیشین ۶۱۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد جذب رنگ مالاویت گرین در غلظت‌های استاندارد در شکل ۱ ارائه شده است. استفاده از چنین میکروفیلترهایی، گستره پایین غلظت رنگ مالاویت انتخاب شده، استفاده از نمونه شاهد و تکرار کردن تیمارها بدون جلبک (کنترل) تا سر حد امکان سبب سرشکن شدن خطای ناشی از جذب رنگ در صافی می‌شود.

بازده جذب مالاویت گرین در محلول‌های آبی به وسیله زیتوده جلبکی از طریق معادله ۳-۳ محاسبه شد

چندمتغیره درجه دوم اثبات شد، بر اساس معادله رگرسیون، معنی دار بودن هر یک از ضرایب مربوط به متغیرهای معادله درجه دوم در جدول ۲ به وسیله مقادیر P-value و F-value بررسی شد. به عبارت دیگر، هر دو مقدار برای درک چگونگی و الگوی تداخل بین متغیرهای اصلی آزمایش روی بازده حذف استفاده شد. مقادیر F-value بزرگ تر و P-value کوچک تر برای هر یک از ضرایب دلالت بر معنی دار بودن است (Zarei, et al., 2010). از طرف دیگر، هر یک از این ضرایب مقدار کمیت و کیفیت تأثیرگذاری متغیرهای معادله درجه دوم (آثار خطی تکی، غیرخطی تکی و آثار دوتایی) در بازده جذب مالاشیت گرین از طریق ریزجلبک های سبز سندسموس و کلرلا را توصیف می کند.

مالاشیت گرین از طریق ریزجلبک های سبز سندسموس و کلرلا که به منظور تأیید اعتبار مدل استفاده شد.

مقادیر F-value مدل ها برای آنالیز واریانس ریزجلبک های سبز سندسموس و کلرلا به ترتیب ۱۲۱/۶۲ و ۱۵۵/۱۳ به دست آمدند که در سطح احتمال ۵ درصد از F-value جدول بزرگ تر بود. از سوی دیگر، مقادیر P-value مدل ها برای هر دو زیتوده جلبکی کوچک تر از ۰/۰۰۰۱ و نشان دهنده معنی داری مدل ها بودند. همچنین، مقادیر P-value بزرگ تر از ۰/۰۵ برای هر دو ریزجلبک سبز برای منبع تغییر مهم LoF شاخصی برای تأیید دقت بالای مدل در پیش بینی مقادیر تخمینی برای هر آزمایش است. به عبارت دیگر، LoF بی معنی علت فاصله ناچیز بین مقادیر واقعی و تخمینی را بیان می کند.

پس از اینکه اعتبار و دقت مدل کوادراتیک و معادله

جدول ۲. نتایج تخمین ضرایب برای معادله رگرسیون بازده جذب مالاشیت گرین از طریق ریزجلبک های سبز *S. quadricauda* و *C. vulgaris*

P-value		خطای استاندارد		ضرایب تخمینی		منبع
C. vulgaris	S. quadricauda	C. vulgaris	S. quadricauda	C. vulgaris	S. quadricauda	
		۰/۶۱	۰/۶۴	۶۸/۱۴	۶۲/۲۱	عرض از مبدأ
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۴۰	۰/۴۱	-۳/۰۳	-۳/۹۳	X ₁
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۴۰	۰/۴۱	۱۰/۸۱	۱۳/۸۳	X ₂
<۰/۰۰۰۱	۰/۰۵۰۶	۰/۴۰	۰/۴۱	۵/۴۳	۰/۸۸	X ₃
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۴۰	۰/۴۱	۱۰/۳۸	۷/۰۷	X ₄
۰/۰۰۲۳	۰/۰۰۱۹	۰/۶۸	۰/۷۲	۲/۵۵	۲/۷۲	X ₁ X ₂
۰/۲۰۸۲	<۰/۰۰۰۱	۰/۶۸	۰/۷۲	۰/۹۰	-۳/۸۵	X ₁ X ₃
۰/۰۳۵۸	۰/۰۱۱۵	۰/۶۸	۰/۷۲	۱/۵۹	-۲/۰۸	X ₁ X ₄
۰/۴۱۱۶	۰/۱۴۵۶	۰/۶۸	۰/۷۲	-۰/۵۸	۱/۱۰	X ₂ X ₃
۰/۰۰۰۵	۰/۰۳۲۷	۰/۶۸	۰/۷۲	-۳/۰۶	-۱/۷۰	X ₂ X ₄
۰/۰۰۲۸	۰/۳۰۹۶	۰/۶۸	۰/۷۲	-۲/۴۷	-۰/۵۷	X ₃ X ₄
۰/۰۰۱۸	۰/۴۴۶۵	۰/۵۴	۰/۵۶	-۲/۰۶	۰/۴۴	X ₁ ²
۰/۰۱۰۹	<۰/۰۰۰۱	۰/۵۴	۰/۵۶	-۱/۵۸	-۳/۸۶	X ₂ ²
<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۴۳	۰/۵۴	۰/۵۶	-۵/۸۵	-۱/۹۱	X ₃ ²
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۵۴	۰/۵۶	۷/۸۰	-۵/۴۷	X ₄ ²

X₁: غلظت اولیه مالاشیت گرین (میلی گرم بر لیتر); X₂: مقدار pH اولیه محلول; X₃: مقدار زیتوده جلبک (میلی گرم بر لیتر); X₄: زمان انجام واکنش (دقیقه).

درصد در غلظت اولیه ۲ میلی‌گرم بر لیتر، ۸۶/۵۶ درصد باز در غلظت اولیه ۲ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد، زمانی که این فاکتور به ترتیب در تقابل با فاکتورهای اصلی مقدار pH اولیه محلول (شکل ۳-الف)، مقدار زیتوده جلبکی (شکل ۳-ب) و زمان انجام واکنش (شکل ۳-ج) قرار گرفته بود. سطح بهینه غلظت اولیه مالاشیت گرین به دست آمده با آنچه در جلبک سبز سندسموس به دست آمده بود، یکسان است. استدلال ما این است که تفاوت میزان بازده جذب، به علت تفاوت ساختار پلیمرهای زیستی خارج دیواره سلولی در این دو جلبک سبز است که مکان‌های اتصال رنگی متفاوتی را ایجاد می‌کند. از این رو قدرت کشش بیشتری در اثر نیروی جاذبه و توان حفظ بالاتر پیوند تشکیل شده در شرایط مختلف در طول زمان آزمایش نشان داده شد (Santos and Boaventura, 2008).

۳.۳. تأثیر pH اولیه محلول

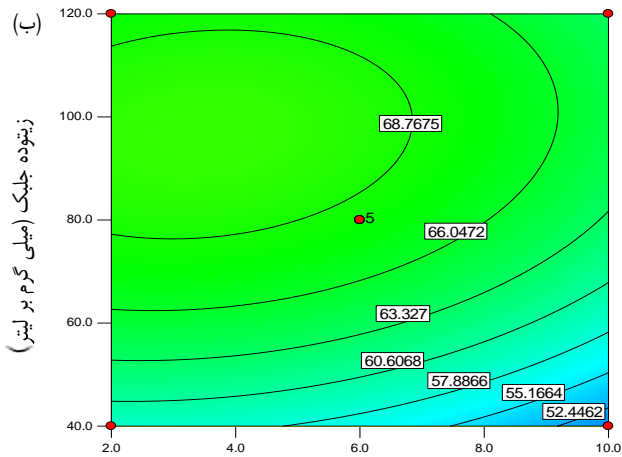
آثار دوتایی pH اولیه محلول با غلظت اولیه مالاشیت گرین، مقدار زیتوده جلبک و زمان تماس مالاشیت گرین با جلبک به صورت نمودار کانتر برای جلبک سندسموس نمایش داده شده است (شکل ۲ الف، د، ه). نتایج نشان دادند که حداکثر بازده‌های جذب مالاشیت گرین در زمان اثر تداخلی pH اولیه محلول با غلظت اولیه مالاشیت گرین ۷۳/۸۲ درصد، با مقدار زیتوده جلبک ۷۲/۶۷ درصد و با زمان تماس رنگ ۷۳/۴۷ درصد به دست آمد. در تمامی این آثار متقابل مقدار بیشینه pH اولیه محلول مقدار ۶ به دست آمد که دلالت بر بیشترین مقدار جذب مالاشیت گرین در بالاترین سطح pH اولیه محلول دارد. این مقدار به منزله pH بهینه اولیه محلول در نظر گرفته شد. همچنین، در زیتوده ریزجلبک کلرلا آثار تقابل pH اولیه محلول با سایر پارامترها در نمودارهای کانتر نشان داد که مقدار بیشینه بازده جذب مالاشیت گرین به ترتیب ۷۷/۴۱، ۷۸/۳۷ و ۹۲/۴۸ درصد بود که در تقابل با غلظت اولیه مالاشیت گرین، مقدار زیتوده و زمان انجام واکنش بود (شکل ۳ الف، د، ه).

۲.۳. تأثیر غلظت اولیه مالاشیت گرین

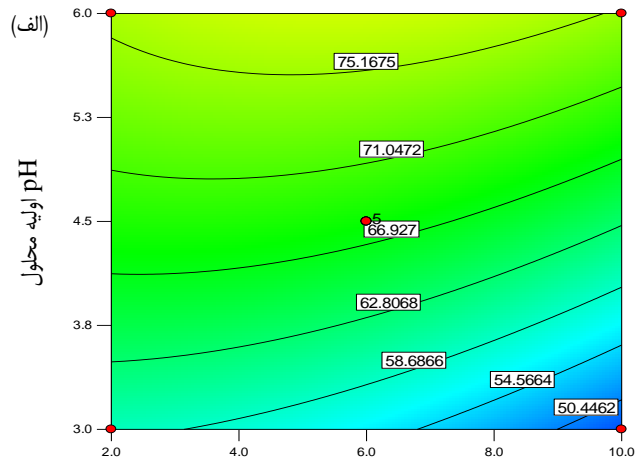
تأثیرات دوتایی غلظت اولیه مالاشیت گرین با مقدار pH اولیه محلول، مقدار زیتوده جلبکی و زمان تماس بین مولکول‌های مالاشیت گرین در محلول با سطح جلبک سندسموس در نمودارهای سه‌بعدی کانتر ارزیابی شده است (شکل ۲). نتایج نشان دادند که حداکثر بازده‌های جذب مالاشیت گرین از طریق جلبک سبز سندسموس ۷۳/۸۲ درصد در غلظت اولیه ۲ میلی‌گرم بر لیتر، ۶۹/۵۰ درصد در غلظت اولیه ۲ میلی‌گرم بر لیتر، ۷۰/۴۰ درصد باز در غلظت اولیه ۲ میلی‌گرم بر لیتر است در زمانی که این فاکتور به ترتیب در تقابل با فاکتورهای اصلی مقدار pH اولیه محلول (شکل ۲-الف)، مقدار زیتوده جلبکی (شکل ۲-ب) و زمان انجام واکنش (شکل ۲-ج) بررسی شد.

نتایج نشان دادند که با افزایش غلظت اولیه مالاشیت گرین از میزان بازده جذب آن در جلبک سبز سندسموس کاسته می‌شود. معمولاً میزان افزایش جذب مالاشیت گرین بر سطح زیتوده جلبکی کمتر از میزان افزایش مالاشیت گرین در محلول است. از سوی دیگر، می‌توان گفت که به علت پایین بودن مقدار زیتوده مصرفی در مقدار متوسط در این تحقیق (۸۰ میلی‌گرم بر لیتر محلول) مکان‌های اتصال بسیار محدودی با این مقدار ثابت از زیتوده جلبک سبز سندسموس وجود دارد. احتمالاً با اشغال تمامی جایگاه‌های اتصال ممکن در سطح پایین غلظت مورد مطالعه، افزایش مقادیر غلظت این ماده شیمیایی درون محلول نمی‌تواند تأثیری بیشتری در جذب مالاشیت گرین داشته باشد و تنها با افزایش مخرج کسر بازده جذب باعث کاهش بازده جذب مالاشیت گرین در جلبک سندسموس شده است.

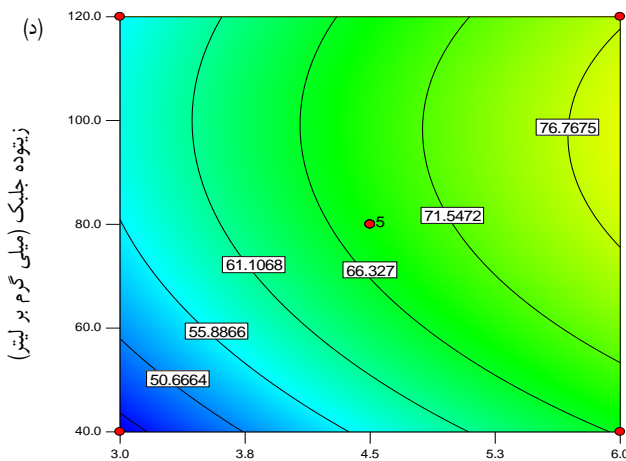
تأثیرات دوتایی غلظت اولیه مالاشیت گرین با مقدار pH اولیه محلول، مقدار زیتوده جلبکی و زمان تماس بین مولکول‌های مالاشیت گرین در محلول با سطح جلبک کلرلا در نمودارهای سه‌بعدی کانتر ارزیابی شده است (شکل ۳). همان‌گونه که مشاهده می‌شود، میزان حداکثر بازده‌های جذب مالاشیت گرین از طریق جلبک سبز کلرلا ۷۷/۴۱ درصد در غلظت اولیه ۲ میلی‌گرم بر لیتر، ۷۰/۲۴



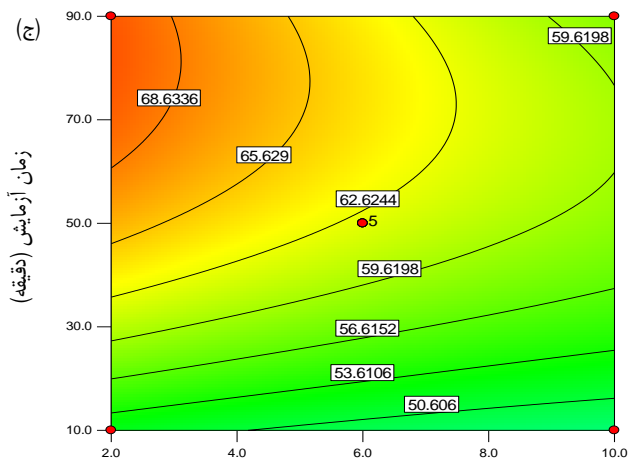
غلظت اولیه مالا شیت گرین (میلی گرم بر لیتر)



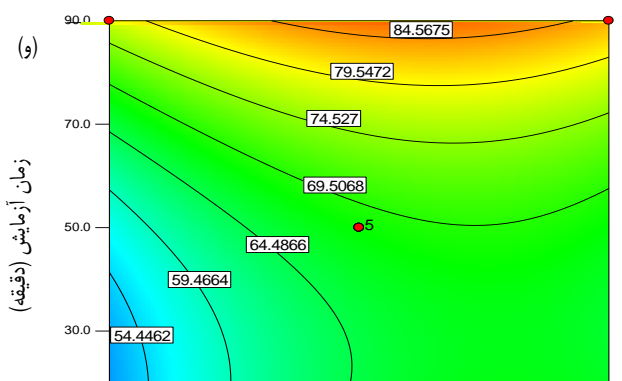
غلظت اولیه مالا شیت گرین (میلی گرم بر لیتر)



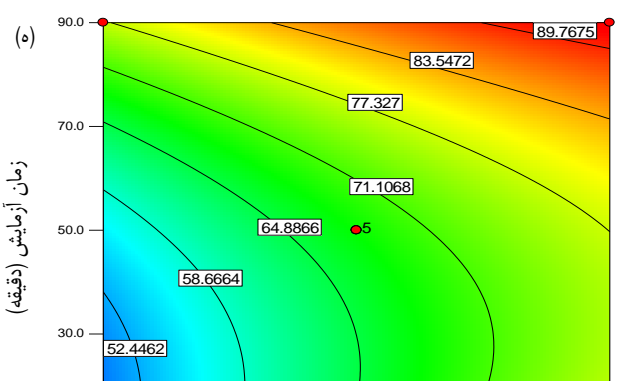
pH اولیه محلول



غلظت اولیه مالا شیت گرین (میلی گرم بر لیتر)

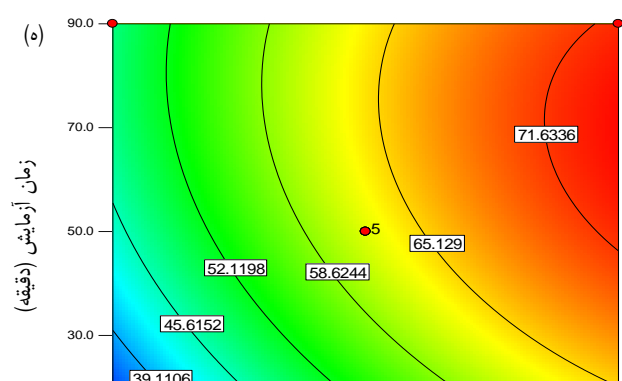
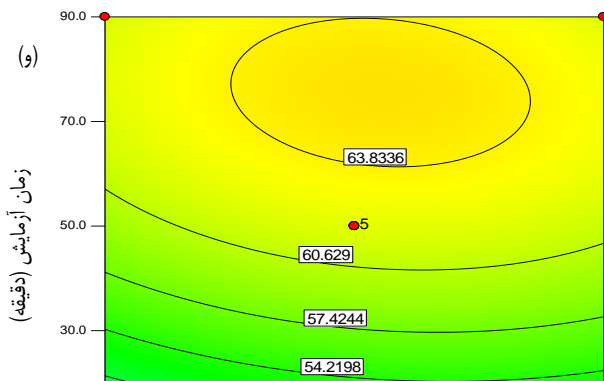
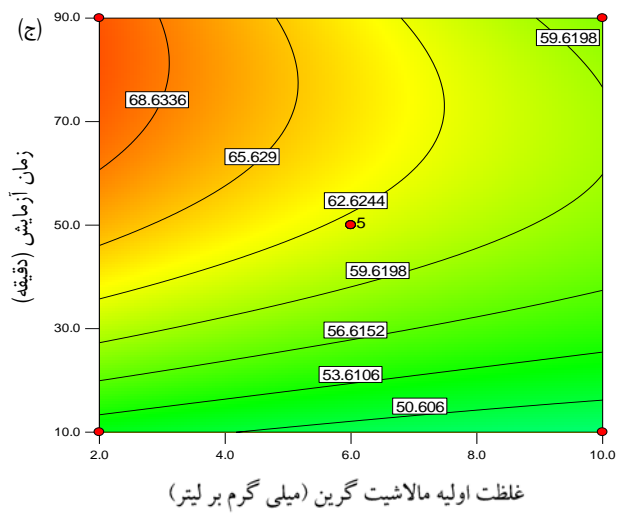
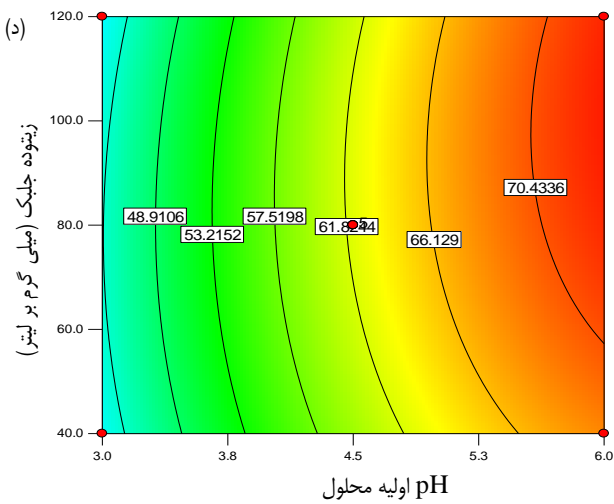
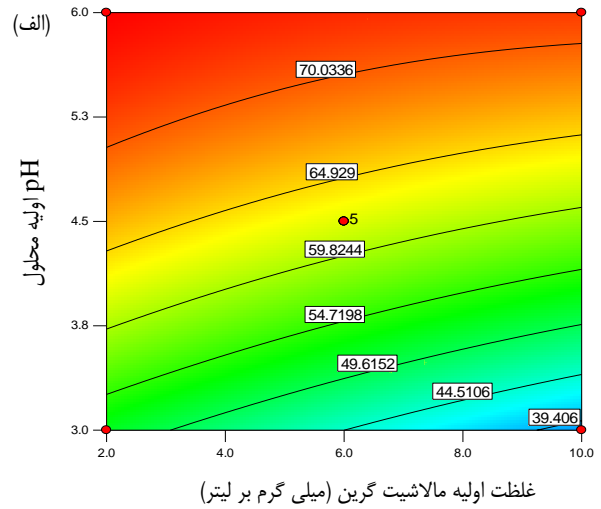
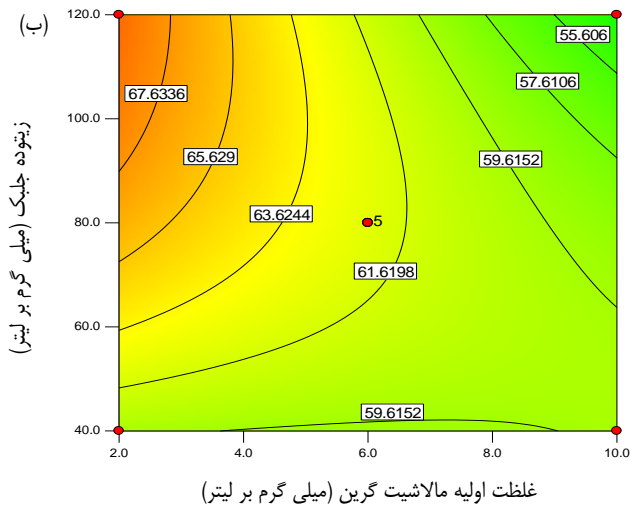


زیتوده جلبک (میلی گرم بر لیتر)



pH اولیه محلول

شکل ۲. آثار متقابل متغیرهای فرایند به صورت منحنی کانتور بر بازده جذب مالا شیت گرین (درصد) از طریق ریز جلبک سبز S. quadricauda؛ غلظت اولیه و pH (الف)، غلظت اولیه و زیتوده جلبک (ب)، غلظت اولیه و زمان آزمایش (ج)، pH و زیتوده جلبک (د)، pH و زمان آزمایش (ه) و زیتوده جلبک و زمان آزمایش (و)



شکل ۳. آثار متقابل متغیرهای فرایند به صورت منحنی کانتر بر بازده جذب مالاشیت گرین (درصد) از طریق ریز جلیک سبز vulgaris؛ غلظت اولیه و pH اولیه (الف)، غلظت اولیه و زیتوده جلیک (ب)، غلظت اولیه و زمان آزمایش (ج)، pH و زیتوده جلیک (د)، pH و زمان آزمایش (ه) و زیتوده جلیک و زمان آزمایش (و)

درصد، در زیتوده ۹۹/۳۶ میلی گرم بر لیتر و با زمان تماس مالاشریت گرین با جذب ۶۴/۵۰ درصد در مقدار بهینه زیتوده ۸۳/۳۴ میلی گرم بر لیتر بود. در ریزجلبک سبز کلرلا زمانی که در تقابل با غلظت اولیه مالاشریت گرین قرار دارد، مقدار بیشینه جذب ۷۰/۲۴ درصد در زیتوده ۹۴/۴۱ میلی گرم بر لیتر و در تقابل با مقدار pH اولیه محلول ۷۸/۳۸ درصد در زیتوده ۹۴/۳۱ میلی گرم بر لیتر و در تقابل با زمان انجام واکنش بیشترین مقدار جذب ۸۶/۶۷ درصد در مقدار زیتوده ۸۹/۷۸ میلی گرم بر لیتر بود (شکل ۳ ب، د، و).

هرچه زیتوده بیشتری در اختیار باشد سطح تماس و مکان‌های فعال اتصال بیشتر است. حضور مکان‌های اتصال بیشتر تأمین‌کننده گروه‌های عاملی مؤثرتر است که در فرایند جذب مالاشریت گرین نقش مهمی دارند. از این رو، با افزایش این گروه‌های عاملی مربوط به پلیمرهای زیستی خارج سلولی واقع در بخش خارجی دیواره سلولی، امکان برقراری پیوند بیشتری بین کاتیون‌های مالاشریت گرین با بارهای ناهمنام روی گروه‌های عاملی زیتوده جلبکی فراهم می‌شود. با افزایش تعداد این برخوردها بین مولکول‌های مالاشریت گرین با سطح زیتوده جلبک موجبات افزایش جذب مالاشریت گرین از محلول آبی و افزایش بازده جذب آن فراهم می‌شود (Porkodi and Kumar 2007; Muralidhar, et al., 2001).

زمانی که مقدار زیتوده جلبکی بیش از حد بهینه افزایش یابد نشانه این است که مقدار زیتوده بیشتر از حد لازم در دسترس است. این انباشتگی موجب برخورد ذرات زیتوده جلبک با یکدیگر به جای برخورد آن‌ها با مولکول رنگ و جذب آن می‌شود که این امر اتلاف انرژی در محلول برای جذب رنگ را به دنبال خواهد داشت و از طرف دیگر، مانع برقراری برخوردهای مؤثر بین مولکول‌های مالاشریت گرین و مکان‌های اتصال روی زیتوده جلبکی خواهد شد. به عبارت دیگر، این آشفتگی و بی‌نظمی در محلول مالاشریت گرین در مقادیر بیش از حد بهینه زیتوده جلبکی، موجب افزایش طول مسیر انتشار و کاهش سطح مؤثر جذب برای جذب مولکول‌های مالاشریت گرین می‌شود.

طبق تحقیقات برخی محققان، تمامی زیتوده‌های جلبکی مقدار pH ایزوالکتریک (pI) که در آن بار سطحی جلبک صفر است) حدود ۳-۴ است (Donmez, et al., 1999). بنابراین، هرگاه pH اولیه محلول در اثر افزایش اسیدیته محیط آزمایش کمتر از این مقدار شود به علت افزایش مقدار یون‌های مالاشریت گرین و ترکیب آن‌ها با سطح جذب، بار سطحی جذب مثبت می‌شود، به طوری که هرچه pH اولیه محلول پایین‌تر باشد، سطح جذب مثبت‌تر می‌شود. از طرف دیگر، نیز با افزایش pH اولیه محلول بیشتر از مقدار pH ایزوالکتریک جلبک، به علت کاهش یون‌های H^+ و افزایش یون‌های OH^- سبب تغییر بار سطحی جذب‌های جلبکی به سمت بارهای منفی می‌شود که در جذب یون‌های مثبت مالاشریت گرین بسیار مناسب است. باید به این نکته اشاره کرد که افزایش pH اولیه محلول در میزان یونیزاسیون مالاشریت گرین تأثیر منفی دارد، به طوری که با افزایش pH اولیه محلول از مقدار تفکیک یون‌های مثبت به علت انحلال کاسته می‌شود که این امر خود بر بازده جذب تأثیر منفی دارد (Daneshvar, et al., 2007b). این ترکیب در pHهای ۴، ۶/۹، ۷/۴ و ۱۰/۱ به ترتیب دارای ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و صفر درصد از فرم یونی خود در محلول است (Goldacre and Philips, 1949). بنابراین، با افزایش pH اولیه محلول بیشتر از ۶/۹ که در واقع pK_a مالاشریت گرین است، با وجود افزایش بار منفی بر سطح جذب، از میزان یونیزاسیون آن و در نتیجه، بازده جذب مالاشریت گرین کاسته می‌شود.

۴.۳. تأثیر مقدار زیتوده جلبکی

آثار متقابل مقدار زیتوده جلبک با سایر پارامترهای آزمایش در جلبک سبز سندسموس به صورت نمودارهای کانتر ارائه شده است (شکل ۲ ب، د، و). در جلبک سندسموس مقدار حداکثر بازده جذب مالاشریت گرین در زمانی که مقدار زیتوده در تقابل با غلظت اولیه بود ۶۹/۴۱ درصد، در زیتوده ۱۲۰ میلی گرم بر لیتر با مقدار pH اولیه محلول ۷۲/۷۱

شدت این واکنش کاسته شد و مولکول‌های رنگی باقی‌مانده برای اشغال جایگاه‌های اتصال بسیار محدود باقی‌مانده رقابت می‌کنند. در انتهای واکنش، میزان جذب مالاثیت‌گرین ثابت باقی می‌ماند که زمان‌های بهینه ۸۴، ۷۲ و ۷۵ دقیقه (کمتر از ۹۰ دقیقه) برای حداکثر بازده جذب مالاثیت‌گرین در جلبک سندسموس به خوبی نشان‌دهنده این شرایط است. اما زمان ۹۰ دقیقه محاسبه‌شده برای کلرلا نشان‌دهنده مکان‌های اتصال بیشتر روی کلرلا نسبت به سندسموس است. به طور کلی، پس از بهینه‌سازی نتایج آزمایش بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌ها در تابع مطلوبیت، مقدار بهینه زمان‌های تماس برای سندسموس و کلرلا به ترتیب ۸۳ و ۹۰ دقیقه به دست آمد.

۴. نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر پتانسیل دو گونه ریزجلبک سبز *S. quadricauda* و *C. vulgaris* ارزیابی شد. اعتبار و دقت مدل کوادراتیک از طریق ضریب همبستگی بالا ($0.99 >$)، مقدار *P-value* معنی‌دار مدل به اثبات رسید. حداکثر بازده جذب برای جلبک‌های سندسموس و کلرلا ۷۳/۴۹ و ۹۱/۶۱ درصد محاسبه شد. در این تحقیق بر اساس حداکثر بازده جذب، مناسب‌ترین سطح برای غلظت اولیه مالاثیت‌گرین ۲ میلی‌گرم بر لیتر برای هر دو ریزجلبک سبز سندسموس و کلرلا و مناسب‌ترین pH اولیه مقدار ۶ به دست آمد. همچنین، سطح متوسط (۸۰ میلی‌گرم بر لیتر)، مناسب‌ترین زیتوده جلبکی برای حداکثر بازده جذب مالاثیت‌گرین در جلبک سندسموس و کلرلا و مناسب‌ترین سطح زمان تماس برای رسیدن به حداکثر جذب مالاثیت‌گرین برای جلبک سندسموس ۸۳ دقیقه و برای جلبک کلرلا ۹۰ دقیقه به دست آمد. بر اساس مقادیر بهینه، ظرفیت جذب زیستی دو گونه ریزجلبک سبز *C. vulgaris* و *S. quadricauda* به ترتیب ۵۷/۱۷ و ۶۷/۴۹ میلی‌گرم بر گرم اندازه‌گیری شد.

و مولکول‌های مالاثیت‌گرین سخت‌تر و کمتر به سطح زیتوده انتقال می‌یابند و متصل می‌شوند (Jabasingh and Singh, et al., 2010; Pavithra, 2010).

در اشکال کانتیر مقدار حداکثر جذب مالاثیت‌گرین با افزایش زیتوده تا نزدیکی سطح بالایی زیتوده جلبکی بود، به طوری که بعد از آن کاهش یافت. مطالعات جذب زیستی کروم (VI) با استفاده از *Mucor racemosus* نیز نشان داد که با افزایش زیتوده پس از رسیدن به بیشینه جذب یون فلزی مقدار بازده جذب آن کاهش می‌یابد (Jabasingh and Pavithra, 2010).

۵.۳. تأثیر زمان انجام آزمایش

تأثیر همزمان و متقابل زمان تماس با سایر متغیرهای فرایند از قبیل غلظت اولیه مالاثیت‌گرین، مقدار زیتوده جلبک و مقدار pH اولیه محلول در جلبک سندسموس و کلرلا بررسی شد. همان‌طور که مشاهده می‌کنید، مقدار حداکثر بازده جذب مالاثیت‌گرین در مدت زمان تماس در تقابل با غلظت اولیه مالاثیت‌گرین، ۷۰/۴۰ درصد در مدت ۸۴ دقیقه، با مقدار pH اولیه محلول ۷۳/۴۷ درصد در مدت ۷۲ دقیقه و با مقدار زمانی که جلبک ۶۴/۵۰ درصد در مدت زمان بهینه ۷۵ دقیقه به دست آمد (شکل ۲ ج، ن، و). اما در ریزجلبک سبز کلرلا زمانی که پارامتر زمان تماس در تقابل با غلظت اولیه مالاثیت‌گرین، مقدار pH اولیه محلول و مقدار زمانی که جلبک قرار می‌گیرد، مقادیر بیشینه جذب ۸۶/۵۶، ۹۲/۴۶ و ۸۶/۶۷ درصد در بالاترین سطح پارامتر زمان تماس (۹۰ دقیقه) به دست آمدند (شکل ۳ ج، ه، و). با افزایش مدت زمان تماس در هر دو جلبک سندسموس و کلرلا، بازده جذب مالاثیت‌گرین به نحو چشمگیری افزایش یافت. علت این امر را می‌توان به زمان شروع آزمایش، زمانی که مولکول‌های مالاثیت‌گرین، تازه در حضور جاذب‌های جلبکی قرار گرفته‌اند نسبت داد. مکان‌های اتصال فراوان در سطح جلبک‌ها موجب هجوم مولکول‌های رنگی می‌شوند. با گذشت زمان به تدریج از

یادداشت‌ها

1. Malachite green
2. Protozoa
3. Cestode
4. Nematod
5. Trematod
6. Crustacea
7. Chemical precipitation
8. Solvent extraction
9. Ion exchange
10. Membrane isolation
11. Ozonation
12. Photooxidation
13. Electrocoagulation
14. Froth flotation
15. Reverse Osmosis
16. Ion exchange
17. Flocculation
18. Bold Basal Medium
19. Response Surface Methodology (RSM)
20. Box-Behnken
21. Polynomial analysis
22. Quadratic model

منابع

- Aleboye, A., Kasiri, M.B., Olya, M.E., Aleboye, H. 2008. Prediction of azo dyedecolorization by UV/H₂O₂ using artificial neural networks. *Dyes and Pigments*, Vol. 77, PP:288-294.
- Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D. 1996. Microbial decolourization of textile-dyecontaining effluents: a review *Bioresource Technology*, Vol. 58, PP:217-227.
- Bellinger, E.G., Sige D.C. 2010. *Freshwater Algae Identification and Use as Bioindicators*. John Wiley & Sons, Ltd, Publication, 271 p.
- Cheng, R., Jiang, Z., Ou, S., Li, Y., Xiang, B. 2009. Investigation of acid black 1 adsorption onto amino-polysaccharides. *Polymer Bulletin*, Vol. 62, PP:69-77
- Culp, S.J., F.A., Beland. 1996. Malachite green: a toxicological review. *Journal of American Colloid Toxicology*, Vol. 15, PP:219-238.
- Daneshvar, N., Ayazloo, M., Khataee, A.R., Pourhassan, M. 2007a. Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp. *Bioresource Technology*, Vol. 98, PP:1176-1182.
- Daneshvar, N., Khataee, A.R., Rasoulifard, M.H., Pourhassan, M. 2007b. Biodegradation of dye solution containing Malachite Green: optimization of effective parameters using Taguchi method. *Journal of Hazardous Material*, Vol. 143, PP:214-219.
- Donmez, G.C., Aksu, Z., Ozturk, A., Kutsal, T. 1999. A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochemistry*, Vol. 34, PP:885-892.
- Ertugrul, S., Sam, N.O., Donmez, G. 2009. Treatment of dye (Remazol Blue) and heavy metals using yeast cells with the purpose of managing polluted textile wastewaters. *Ecological Engineering*, Vol. 35, PP:128-134.
- Forgacs, E., Cserhati, T., Oros, G. 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment International*, Vol. 30, PP:953-971.

Goldacre, R.J., Philips, J.N. 1949. The ionization of basic triphenylmethane dyes. *Journal of Chemistry Society*, Vol. 11, PP:1724-1732.

Gupta, V.K., Suhas, T.L. 2009. Application of low-cost adsorbents for dye removal—a review. *Journal of Environment Management*, Vol. 90, PP:2313–2342.

Jabasingh, S.A., Pavithra, G. 2010. Response surface approach for the biosorption of Cr⁶ ions by *Mucor racemosus*. *Clean- Soil, Air, Water*, Vol. 38, PP:492–499.

Kaushik, P., Malik, A. 2009. Fungal dye decolorization: recent advances and further potential. *Environment International*, Vol. 35, PP:127–141.

Khataee, A.R. 2009. Photocatalytic removal of C.I. basic red 46 on immobilized TiO₂ nanoparticles: artificial neural network modeling. *Environment Technology*, Vol. 30, PP:1155–1168.

Kumar, K.V., Ramamurthi, V., Sivanesan, S. 2006. Biosorption of malachite a green cationic dye onto *Pithophora* sp., a fresh water algae. *Dyes and Pigments*, Vol. 69, PP:74–79.

Kumar, K.V., Sivanesan, S., Ramamurthi, V. 2005. Adsorption of malachite green onto *Pithophora* sp., a fresh water algae: equilibrium and kinetic modelling. *Process Biochemistry*, Vol. 40, PP:2865-2872.

Mondal, S. 2008. Methods of dye removal from dye house effluent—an overview. *Environmental Engineering Science*, Vol. 25, PP:383–396.

Muralidhar, R.V., Chirumamila, R.R., Marchant, R., Nigam, P. 2001. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 9, PP:17–23.

Parshetti, G., Kalme, S., Sartale, G., Govindwar, S. 2006. Biodegradation of malachite green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Acta Chimica Slovenica*, Vol. 53, PP:492-498.

Porkodi, K., Kumar, K.V. 2007. Equilibrium, kinetics and mechanism modeling and simulation of basic and acid dyes sorption onto jute fiber carbon: eosin yellow, malachite green and crystal violet single component systems. *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 143, PP:311-327.

Santos, S.C.R., Boaventura, R.A.R. 2008. Adsorption modelling of textile dyes by sepiolite. *Applied Clay Science*, Vol. 42, P:137

Singh, R., Chadetrik, R., Kumar, R., Bishnoi, K., Bhatia, D., Kumar, A., Bishnoi, Singh, N. 2010. Biosorption optimization of lead(II), cadmium(II) and copper(II) using response surface methodology and applicability in isotherms and thermodynamics modeling. *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 174, PP:623–634.

Srivastava, S., Sinha, R., Roy, D. 2004. Toxicological effects of malachite green. *Aqua. Toxicol.*, 66, 319–329.

Tahir, S.S., Rauf, N. 2006. Removal of a cationic dye from aqueous solutions by adsorption onto bentonite clay. Chemosphere, Vol. 63, PP:1842-1848.

Tunali, S., Akar, T., Özcan, A.S., Kiran, I., Özcan, A. 2006. Equilibrium and kinetics of biosorption of lead(II) from aqueous solutions by *Cephalosporium aphidicola*. Separation and Purification Technology, Vol. 47, PP:102-109.

Zarei, M., Salari, D., Niaei, A., Khataee, A. R. 2010. Application of response surface methodology for optimization of peroxi-coagulation of textile dye solution using carbon nanotube-PTFE cathode. Journal of Hazardous Materials, Vol. 173, PP:544-551.