

key words

Bioleaching

Electric arc furnace dust

Yarrowia lipolytica

Crude glycerol

Manganese

Utilizing *Yarrowia lipolytica* supernatant for electric arc furnace dust bioleaching

Seyedeh Neda Mousavi¹, Seyyed Mohammad Mousavi^{1,2*}, Ferancesca Beolchini³

1- Biotechnology Group, Chemical Engineering Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, P.O. Box: 14115-111.

2-Modares Environmental Research Institute, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Department of Life and Environmental Sciences, Università Politecnica Delle Marche, Ancona, Italy

Abstract

Research subject: One of the steel industry's concerns is the management of consequential waste, which is essential from the point of view of the environment and economy. Electric arc furnace dust is a residual; until now, hydrometallurgy, pyrometallurgy, and stabilization methods have been used to handle it. These methods produce hazardous secondary wastes, so researchers face the challenge of finding an environmentally friendly and economical method for electric arc furnace dust management.

Research approach: This research used bioleaching as a cost-effective and environmentally friendly method to recover manganese from the electric arc furnace dust of the Tabarestan steel foundry. The spent culture medium of *Yarrowia lipolytica* yeast was employed for the bioleaching process. *Yarrowia lipolytica* secretes organic acids by consuming crude glycerol as a cheap carbon source in a specific culture medium. To investigate the effect of the culture medium's initial pH and crude glycerol concentration, four culture media were prepared with initial pH of 5.5 and 7 and crude glycerol concentration of 80 g/l and 100 g/l at 30 °C and 140 rpm. After 9 days, a centrifuge separated the yeast from the produced metabolites.

Main results: LC-MS test showed citric, malic, and succinic acids in the cell-free culture media. The highest secretion of organic acids in the culture medium are 79600 mg/l citric acid, 28100 mg/l malic acid, and 1000 mg/l succinic acid. Cell-free culture media was utilized for spent culture medium bioleaching in the presence of 10 g/l pulp density during 3, 6, and 9 days at 60 °C and 140 rpm. The results showed that the highest manganese extraction was related to the spent culture medium with 80 g/l crude glycerol and an initial pH of 5.5, which recovered 58.5% of manganese in the presence of 10 g/l pulp density within 3 days. The comparison between the FTIR diagram of the electric arc furnace dust and the bioleaching residue showed that C=C and O-H bonds have been added to the bioleaching residue, which indicates structural changes transpire during the bioleaching process. Also, this graph shows that the intensity of the peak related to iron sulfate has increased in the bioleaching residue, which can be related to iron deposition.

*To whom correspondence should be addressed:
mousavi_m@modares.ac.ir

کلمات کلیدی

فروشوی زیستی

غبار کوره قوس الکتریکی

یاروویا لیپولیتیکا

گلیسرول خام

منگنز

*مسئول مکاتبات:

mousavi_m@modares.ac.ir

فروشوی زیستی غیرمستقیم غبار کوره قوس الکتریکی با استفاده از متابولیت‌های تولیدشده توسط مخمر یاروویا لیپولیتیکا در حضور منبع کربن گلیسرول خام

سیده ندا موسوی^۱، سیدمحمد موسوی^{۲،*}، فرانچسکا بنولچینی^۳

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۱۱۱

۲- پژوهشکده محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشکده علوم زیستی و محیط زیست، دانشگاه پلی تکنیک دل مارکه، آنکنا، ایتالیا

چکیده

موضوع تحقیق: از جمله نگرانی‌های صنعت فولاد، مدیریت پسماندهای حاصل از آن است، که از نظر محیط زیستی و اقتصادی اهمیت بسیار دارد. غبار کوره قوس الکتریکی پسماندی است، که تاکنون از روش‌های هیدرومتالورژی، پیرومتالورژی و تثبیت برای مدیریت آن استفاده شد.

روش تحقیق: در این پژوهش از فروشوی زیستی به‌عنوان روشی مقرون به‌صرفه و دوست‌دار محیط زیست برای بازیابی منگنز از غبار کوره قوس الکتریکی ریخته‌گری فولاد طبرستان استفاده شد. فرآیند فروشوی زیستی با استفاده از محیط کشت مستعمل حاصل از مخمر یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30168 انجام شد. برای بررسی اثر pH اولیه و غلظت گلیسرول خام موجود در محیط کشت، چهار محیط کشت با pH اولیه ۵/۵ و ۷ و غلظت گلیسرول خام ۸۰ و ۱۰۰ گرم بر لیتر در دمای ۳۰ °C و سرعت ۱۴۰ دور بر دقیقه تهیه شدند. پس از ۹ روز با استفاده از سانتریفیوژ مخمر از متابولیت‌های تولیدی جدا شد.

نتایج اصلی: آزمون LC-MS نشان داد اسیدهای آلی سیتریک، مالیک و سوکسینیک در محیط حضور دارند. بیشترین مقدار اسیدهای آلی ترشح شده در محیط کشت به‌ترتیب ۷۹۶۰۰، ۲۸۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسیدهای سیتریک، مالیک و سوکسینیک بدست آمد. از محیط کشت بدون مخمر برای فروشوی زیستی به روش محیط کشت مستعمل در حضور چگالی توده ۱۰ گرم بر لیتر، طی ۳، ۶ و ۹ روز در دمای ۶۰ °C و ۱۴۰ دور بر دقیقه استفاده شد. نتایج نشان دادند بیشترین میزان بازیابی مربوط به محیط کشت مستعمل با غلظت ۸۰ گرم بر لیتر گلیسرول خام و pH اولیه ۵/۵ بود، که منجر به بازیابی ۵۸/۵٪ منگنز موجود در غبار در حضور چگالی توده ۱۰ گرم بر لیتر طی ۳ روز شد. مقایسه انجام شده بین نمودار FTIR غبار کوره قوس الکتریکی و باقیمانده حاصل از فروشوی زیستی نشان داد، پیوندهای C=C و O-H به باقیمانده فروشوی زیستی اضافه شده است، که نشان‌دهنده تغییرات ساختاری در باقیمانده فروشوی زیستی است. همچنین این نمودار نشان می‌دهد، شدت قله مربوط به سولفات آهن در نمونه پس از فروشوی زیستی افزایش داشته است، که می‌تواند مربوط به تشکیل رسوب این فلز باشد.

۱- مقدمه

به ترتیب با استفاده از مواد اسیدی و قلیایی قوی و مصرف انرژی بالا هم به محیط زیست آسیب می‌زنند و هم هزینه‌بر هستند [۲] و [۵]، مزایایی مانند راندمان قابل قبول، ایمنی بالاتر، مصرف انرژی کمتر، کنترل آسان‌تر، توانایی انجام فرآیند در دما و فشار محیط و سازگاری با محیط زیست دارد. این فرآیند به دو روش مستقیم و غیرمستقیم انجام می‌شود. در روش مستقیم ریزاندامگان در فرآیند فروشویی مشارکت دارد ولی در غیرمستقیم ریزاندامگان در محیط فروشویی زیستی حضور ندارد [۱۰].

فروشویی زیستی با قارچ‌ها و مخمرها مزایایی نسبت به باکتری‌ها دارد که می‌توان به توانایی رشد در pH بالاتر، فرآیند فروشویی سریع‌تر و فاز تأخیر کوتاه‌تر و توانایی متابولیت‌های ترشح‌شده مانند اسیدهای آلی برای ایجاد هم‌تافت (Complex) با یون‌های فلزی اشاره کرد [۱۱]. مخمرها نیز نسبت به قارچ‌ها به دلیل بهره‌وری بالاتر و سهولت کشت، گزینه سودمندتری برای استفاده صنعتی هستند. *یاروویا لیپولیتیکا* (*Yarrowia lipolytica*) مخمری غیر بیماری‌زاست، که تحمل غلظت بالای سوبسترا را دارد و در برابر فلزات سنگین مقاوم است. این سویه می‌تواند در محیط‌های متنوعی مانند محیط‌های غنی از چربی، محیط‌های دریایی و سوبستراهایی مانند هیدروکربن‌ها، اسیدهای چرب، الکل‌ها و استات‌ها رشد کند و پتانسیل تولید اسیدهای آلی مختلفی مانند، اسیدهای سیتریک، ایزوسیتریک، آلفا-کتوگلوটারیک، فوماریک، مالیک و پیروویک را در شرایط مختلف کشت دارد [۱۲].

پژوهش‌هایی انجام شده که در آنها تولید اسیدهای سیتریک و ایزوسیتریک از *یاروویا لیپولیتیکا* با استفاده از سویه‌ها و منابع کربن مختلف بررسی شده است [۱۳]، [۱۴] و [۱۵]. از این مخمر برای فروشویی زیستی فلزات سنگین و عناصر نادر خاکی از پسماندهای جامد خاکستر بالارونده نیروگاه انرژی و کراکینگ کاتالیزوری سیال بستر مصرف‌شده استفاده شد [۱۶] و [۱۷].

هزینه فروشویی زیستی با استفاده از مواد خام و تجدیدپذیر به عنوان منابع کربن، مانند گلیسرول، کاهش

صنایع تولید فلز، در فرآیند استخراج فلزات خالص از سنگ معدن، مقادیر زیادی پسماند وارد محیط زیست می‌کنند. تولید فولاد با استفاده از کوره اکسیژن پایه (Basic Oxygen Furnace) و کوره قوس الکتریکی (Electric Arc Furnace) انجام می‌شود [۱]. حدود ۳۲٪ کل فولاد خام تولیدی در سراسر جهان و ۸۵٪ آن در ایران از طریق کوره قوس الکتریکی تولید می‌شود [۲] و [۳]. به علت دمای درون کوره قوس الکتریکی، که حین فرآیند به ۱۶۰۰ °C یا بیشتر می‌رسد، برخی فلزات موجود در بار کوره از جمله آهن، روی و سرب وارد فاز بخار می‌شوند و پس از سرد شدن به ازای هر تن فولاد خام تولیدی حدود ۱۵ تا ۲۰ کیلوگرم غبار کوره قوس الکتریکی (Electric Arc Furnace Dust (EAFD)) تولید می‌شود [۲]، [۴] و [۵].

مطالعات متعددی بر بازیابی روی از EAFD با استفاده از عوامل فروشویی معدنی و آلی قوی انجام شد، که تعدادی از آنها در جدول ۱ به صورت خلاصه آورده شد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود تمرکز پژوهش‌های انجام شده برای بازیابی فلزات از غبار کوره قوس الکتریکی بر فلز روی با روش شیمیایی است. اسید سولفوریک غلیظ در بیشتر پژوهش‌های انجام شده برای بازیابی آهن و روی از این غبار استفاده شد [۴]، [۵] و [۶]. EAFD همچنین می‌تواند برای بهبود کیفیت بتن سیمانی، آسفالت، آجر و سرامیک استفاده شود که جذب آب، مقاومت مکانیکی و دوام محصول نهایی را بهبود می‌بخشد [۷]. علیرغم تلاش‌هایی که برای بازیابی فلزات ارزشمند از EAFD در نقاط مختلف جهان انجام شد، حدود ۵۰٪ تولید جهانی آن همچنان در طبیعت رها می‌شود [۲]. بنابراین، دستیابی به فرآیندهای مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست چالشی مهم است [۸].

فروشویی زیستی روشی نسبتاً جدید است که از ریزاندامگان‌های مختلف برای بازیابی فلزات از پسماندهای جامد استفاده می‌کند. در مقایسه با روش‌های قبلی (هیدرومتالورژی و پیرومتالورژی، که

جدول ۱ پژوهش‌های انجام‌شده برای بازیابی فلزات سنگین از غبار کوره قوس الکتریکی

Table ۱. Studies carried out to recover heavy metals from electric arc furnace dust

Method	Leaching agent	Target metal	Recovery	Year	Reference
Chemical	Sulfuric acid 3 N	Zinc	%80	2010	[4]
Chemical	Two steps: Nitric acid and Sulfuric acid	Zinc and Cadmium	%97 and %97	2016	[1]
Chemical	Sulfuric acid 3 N	Zinc and iron	%98 and %99	2020	[5]
Chemical	Sulfuric acid 3 N	Zinc and iron	%67 and %98	2021	[6]
Chemical	Sodium citrate and Oxalic acid	Zinc	%50	2021	[9]

۷ دقیقه در 900°C قرار گرفت و این مرحله سه بار تکرار شد. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر آب به بشر ۵۰۰ میلی‌لیتری اضافه شد و ۲۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۳۷٪ به آن اضافه شد. نمونه تا زمانی که به طور کامل از بوتله خارج شود، در بشر روی گرم‌کن قرار داده شد. پس از خارج کردن نمونه از بوتله با میله شیشه‌ای، با آب شسته شد و ۲۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک به بشر اضافه شد. بشر تا انحلال کامل نمونه با شیشه ساعت پوشانده شد. در نهایت حجم محلول در فلاسک حجمی به ۲۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد [۲۵]. سپس محتوای فلز توسط طیف‌سنجی انتشار اتمی پلاسما جفت‌شده القایی (ICP-OES، Vista-pro، Varian، استرالیا) تعیین شد. ظرفیت خنثی‌سازی اسید- ظرفیت خنثی‌سازی باز ((Acid Neutralizing Capacity-Base Neutralizing Capacity (ANC-BNC) برای مشاهده تأثیر طولانی‌مدت غبار کوره قوس الکتریکی بر محیط زیست انجام شد [۲۴] و [۲۶].

۲-۲- کشت مخمر یاروویا لیپولیتیکا

یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30168 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران (Iranian Biological Resource Center) (IBRC) تهیه شد. سویه بر روی محیط کشت YM (Yeast Extract-Malt Extract) متشکل از ۳ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۳ گرم بر لیتر عصاره مالت، ۵ گرم بر لیتر پیتون گوشت و ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز (همه مواد از Merck تهیه شدند) در دمای 30°C به مدت ۲ روز کشت داده شد و هر شش ماه یکبار به صورت شیب‌دار کشت داده شد و در یخچال 4°C نگهداری شد [۱۳]. کشت با تلقیح یک کلنی در محیط YM انجام شد و سپس در گرمخانه لرزان (کره جنوبی DIAHAN Scientific) با دمای 30°C و دور ۱۴۰ دور بر دقیقه کشت داده شد.

یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30168 در گرمخانه لرزان با دمای 30°C و سرعت ۱۴۰ دور بر دقیقه به مدت ۹ روز کشت داده شد. هر ارلن‌مایر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت متشکل از دی سدیم هیدروژن فسفات ۱۲آبه، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۷آبه، منیزیم سولفات ۷آبه، کلسیم دی کلرید یک آبه، روی سولفات ۷آبه، منگنز سولفات یک آبه، آهن (III) کلرید ۶آبه و عصاره مخمر به ترتیب با غلظت‌های ۱/۵، ۷، ۱۷/۶۵، ۰/۲، ۰/۰۲، ۰/۰۶، ۰/۱۵ و ۰/۲۷ گرم بر لیتر (همه مواد از Merck تهیه شدند) بود [۱۷] و [۲۷].

در این پژوهش از گلیسرول خام به عنوان منبع کربن ارزان قیمت و آبدوست استفاده شد و اثر متابولیت‌های تولیدشده توسط یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30168 با استفاده از آن بر فروشویی زیستی غبار کوره قوس الکتریکی بررسی شد. گلیسرول خام از شرکت پارس پاک کیمیا تهران تهیه شد. گزارش این شرکت حاکی از آن است که گلیسرول خام حاوی کلرید سدیم،

می‌یابد. گلیسرول، محصول جانبی تولید بیودیزل است (۱۰۰ کیلوگرم گلیسرول خام به ازای هر تن بیودیزل تولیدی) و با وجود ناخالصی‌هایش سوبسترای مناسبی برای بسیاری از ریزاندامگان‌هاست [۱۸].

در این پژوهش، منگنز فلز هدف در فروشویی زیستی است. پسماندهای حاوی منگنز در صورت رها شدن در محل‌های دفن زباله باعث آلودگی محیطی، خاک و آب‌های زیرزمینی و برخی اختلالات عصبی از جمله بیماری پارکینسون می‌شوند [۱۹]. منگنز در صنایع مختلفی مانند شیشه و سرامیک، فولاد، باتری، مواد شیمیایی و رنگ نیز کاربرد دارد [۲۰]، که این کاربردها بر اهمیت بازیافت آن می‌افزاید. تمرکز مطالعه حاضر بر بازیابی منگنز از غبار کوره قوس الکتریکی با استفاده از فروشویی زیستی غیرمستقیم با مخمر یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30168 با منبع کربن ارزان قیمت گلیسرول خام است.

۲- بخش تجربی

۲-۱- آماده‌سازی غبار

غبار کوره قوس الکتریکی از دودکش کوره قوس الکتریکی ریخته گری فولاد طبرستان، مازندران، ایران، که بار آن ضایعات فولادی و آهن اسفنجی است، تأمین شد.

اندازه ذرات در فرآیند فروشویی نقش مهمی در انحلال فلزات دارد. بر این اساس، ذرات کوچکتر به دلیل نسبت سطح به حجم بالاتر، سرعت واکنش فروشویی زیستی را افزایش می‌دهند [۲۱]. براساس نتایج پژوهش‌های پیشین اندازه ذرات بهینه برای فروشویی زیستی بهینه ذرات کوچکتر از ۷۵ میکرون است [۲۲] و [۲۳]. با استفاده از الک لرزان با مش ۲۰۰، ذرات کوچکتر از ۷۵ میکرون جدا شدند و در ادامه برای اطمینان از همگن بودن ذرات از آزمون توزیع اندازه ذرات (آلمان H2396، HELOS Particle Size Analyzer) استفاده شد.

۲-۱-۱- مشخصه‌یابی غبار

برای اندازه‌گیری pH غبار کوره قوس الکتریکی، ۱ گرم نمونه به ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه در ارلن‌مایر اضافه شد و با سرعت ۱۴۰ دور بر دقیقه در دمای اتاق هم زده شد. تا زمان تثبیت شدن pH، روزانه pH مخلوط با استفاده از pH متر دیجیتال (Multi Meter CP-500-L-Istek، کره جنوبی) اندازه‌گیری شد [۲۴]. از همجوشی پراکسید برای تبدیل غبار کوره قوس الکتریکی به محلول شفاف استفاده شد. بوتله تمیز نیکل در آن هیبرید شد و در کوره خشک شد. سپس، ۲ گرم کربنات سدیم، ۲ گرم پراکسید سدیم و ۰/۲۵ گرم EAFD با ترازو به دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شد و در بوتله ریخته شد. نمونه پس از همگن شدن، به مدت

شد [۱۲]. با استفاده از ۸۰۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید سیتریک ۱ مولار pH محیط کشت‌های CG۱ و CG۲ روی ۵/۵ تنظیم شد. شرایط محیط کشت‌های مورد بررسی در جدول ۲ آمده است.

از محیط کشت هر ارلن‌مایر هر ۱۲ ساعت نمونه‌برداری شد، اندازه‌گیری pH انجام شد و چگالی نوری آن ((Optical Density (OD) در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (UV/UV-Mecasys VIS Spectrophotometer-Optizen، ۳۲۲۰، کره جنوبی) اندازه‌گیری شد. پس از ۹ روز، آزمون کروماتوگرافی مایع - طیف‌سنجی جرمی (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)، ۲۶۹۵ Quattro Micro API Micro Mass Waters Alliance Separations Module، آمریکا) برای شناسایی نوع و غلظت اسیدهای آلی محیط کشت انجام شد.

۲-۳- فرآیند فروشویی زیستی

در روز نهم کشت، زیست توده یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M۳۰۱۶۸ از متابولیت‌های تولیدشده جدا شد و متابولیت‌ها متعاقباً با غبار کوره قوس الکتریکی در چگالی توده ۱۰ گرم بر لیتر مخلوط شدند. سرعت نفوذ عامل فروشویی در سطح مشترک ذرات پسماند و محیط مایع، در دماهای بالاتر افزایش می‌یابد که عملکرد فروشویی را افزایش می‌دهد [۳۰]. بنابراین، آزمایش‌های فروشویی زیستی در گرمخانه لرزان با

دی‌سديم اکسید، آهن و خاکستر سولفات است و خلوص تقریبی آن ۸۰ درصد است.

به‌علت ناخالصی‌های موجود در گلیسرول خام، پیش‌آزمایشی برای تعیین غلظت گلیسرول خام انجام شد. در این پیش‌آزمایش، از غلظت‌های مختلف گلیسرول خام (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ گرم بر لیتر) استفاده شد و از تیتراسیون پتانسیومتری برای اندازه‌گیری میزان اسیدهای آلی تولیدشده استفاده شد. این روش به دلیل سهولت در تجزیه و تحلیل و عدم نیاز به تخصص تحلیل‌گران ماهر یا تجهیزات گران‌قیمت انتخاب شد. از هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار برای تیتراسیون استفاده شد و تیرانت مورد نیاز برای رسیدن به نقطه پایان تیتراسیون (pH حدود ۱۰) ثبت شد. منحنی تیتراسیون به‌صورت pH برحسب حجم تیرانت مورد استفاده رسم شد و سپس با استفاده از مشتق این نمودار نقطه هم‌ارزی و پایانی تیتراسیون به صورت دقیق مشخص شد. درصد جرمی محتوای اسید آلی آزاد (X) با در نظر گرفتن تمام اسید تولیدی به صورت اسید سیتریک، مطابق معادله (۱) محاسبه شد [۲۸] و [۲۹]:

$$X = [(V_{eq} - V_b) \times 0.064] / m \times 100 \quad (1)$$

جدول ۲ شرایط محیط کشت‌های مورد بررسی

Table 2. Culture media conditions studied in this work

Culture medium	Initial pH	Carbon source concentration (g/l)
CG1	5.5	80
CG2		100
CG3	7	80
CG4		100

سرعت ۱۴۰ دور بر دقیقه و دمای ۶۰ °C انجام شد. به منظور حفظ غلظت محلول فروشویی حین فرآیند و برای جبران کاهش وزن ناشی از تبخیر، در صورت نیاز آب دیونیزه به محلول فروشویی اضافه شد. باقیمانده جامد و محیط مایع پس از ۳، ۶ و ۹ روز از هم جدا شدند. پس از جداسازی، باقیمانده فروشویی زیستی دو بار با آب دیونیزه شسته شد و تا ثابت شدن وزن در آن خشک شد. سپس تغییر جرم آن نسبت به میزان اولیه محاسبه شد. در مرحله نهایی، محتوای فلز مایع فروشویی با استفاده از آنالیز ICP-OES بررسی شد و بازده بازیابی فلزات با معادله (۲) محاسبه شد.

$$\text{درصد بازیابی} = [(C_s \times V_s) / (C_T \times M_T)] \times 100 \quad (2)$$

که در آن ۰/۰۶۴ میزان اسیدسیتریک معادل با ۱ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار برحسب گرم؛ V_{eq} حجم هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار مورد استفاده در تیتراسیون برحسب میلی‌لیتر، V_b حجم هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار مورد استفاده برای تیتراسیون نمونه شاهد برحسب میلی‌لیتر و m جرم ماده خام مورد استفاده برحسب گرم است.

pH اولیه محیط کشت روی 7 ± 0.2 و 5.5 ± 0.2 تنظیم شد [۱۱] و [۲۶] و با توجه به نتایج پیش‌آزمایش انجام‌شده غلظت گلیسرول خام مورد استفاده به‌عنوان منبع کربن ۸۰ و ۱۰۰ گرم بر لیتر انتخاب شد. از آنجایی که حضور اسید سیتریک در محیط می‌تواند ترشح اسید سیتریک از غشای سلولی را بهبود بخشد، تنظیم pH محیط کشت با اسید سیتریک ۱ مولار انجام

(2730.4 میلی گرم بر کیلوگرم)، سیلیس (433.0 میلی گرم بر کیلوگرم)، منگنز (413.4 میلی گرم بر کیلوگرم)، روی (100.0 میلی گرم بر کیلوگرم)، دیسپروزیوم (99 میلی گرم بر کیلوگرم)، اربیوم (189 میلی گرم بر کیلوگرم)، یوروپیم (77 میلی گرم بر کیلوگرم)، طلا (787 میلی گرم بر کیلوگرم) و نقره (418 میلی گرم بر کیلوگرم).

همانطور که از نتیجه آزمون ANC-BNC، در شکل ۱A مشخص است، pH غبار کوره قوس الکتریکی در محیط آبی با مقدار کمی اسید یا باز تغییر می کند. در نتیجه، اگر این پسماند بدون هیچ تصفیه ای دفن شود، ممکن است فلزات سنگین آن وارد محیط زیست شوند. آزمون توزیع اندازه ذرات برای غبار کوره قوس الکتریکی پس از غربالگری انجام شد. در شکل ۱B نمودار توزیع تجمعی بر حسب اندازه ذرات مشاهده می شود. همانطور که در شکل ۱B مشخص است، $99/65\%$ ذرات اندازه ای کمتر از 73 میکرون دارند و حدود 80% آنها کوچکتر از 15 میکرون هستند.

۳-۲- محیط کشت مخمر یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30168

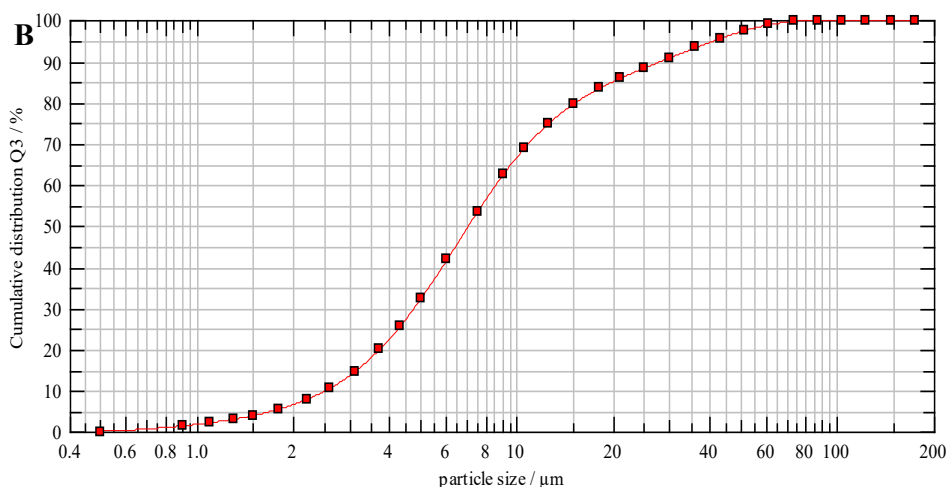
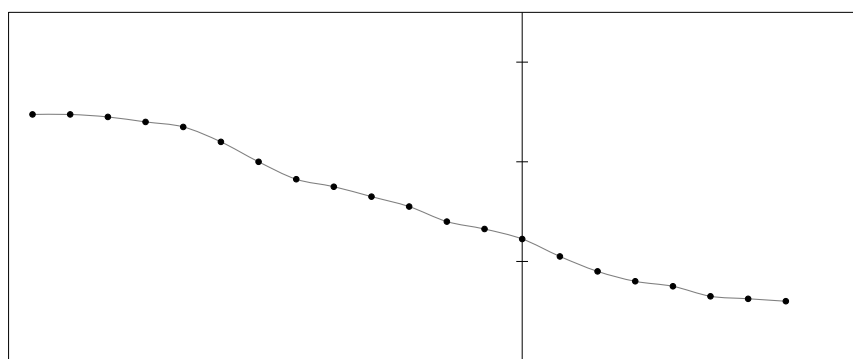
که در آن C_s میزان فلز در محلول فروشویی (میلی گرم بر لیتر)، C_T میزان فلز در غبار کوره قوس الکتریکی (میلی گرم بر گرم)، V_s حجم محلول فروشویی (لیتر) و M_T جرم غبار کوره قوس الکتریکی اولیه (گرم) است [۱۰].

برای بررسی اثر فروشویی زیستی، تجزیه و تحلیل طیفسنجی فروسرخ تبدیل فوریه (Fourier Transforms Infrared Spectroscopy (FTIR), PerkinElmer Spectrum, Version ۱۰.۳.۰۶، آمریکا) برای بررسی گروه های عاملی اصلی و پیوندها در نمونه غبار کوره قوس الکتریکی قبل و بعد از فرآیند فروشویی زیستی انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصه یابی غبار کوره قوس الکتریکی

اندازه گیری pH نشان داد pH غبار کوره قوس الکتریکی $4/5$ است. آزمون ICP-OES نشان داد که فلزات قابل توجه در غبار کوره قوس الکتریکی عبارتند از آهن



شکل ۱ (A) نمودار ANC-BNC غبار کوره قوس الکتریکی کارخانه فولاد طبهرستان و (B) نتیجه آزمون توزیع اندازه ذرات غبار کوره قوس الکتریکی پس از عبور از الک با مش ۲۰۰

Figure 1. (A) ANC-BNC diagram of electric arc furnace dust of Tabarestan steel foundry and (B) The result of the particle size distribution analysis of electric arc furnace dust after passing through a vibrating sieve with 200 mesh

pH و OD محیط کشت‌های مورد بررسی در طول رشد یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30-168 بررسی شد و در پایان فرآیند تخمیر، اسیدهای آلی ترشح‌شده در این محیط کشت‌ها توسط LC-MS بررسی شد.

نتایج اندازه‌گیری pH و OD محیط کشت در شکل ۲ نشان داده شد. همانطور که مشاهده می‌شود، روند نزولی pH با گذشت زمان نشان‌دهنده تأثیر ناچیز غلظت منبع کربن بر کاهش pH است. بررسی OD نشان داد که افزایش OD تا روز دوم فرآیند سریع‌تر اتفاق می‌افتد که دلیل آن حضور منبع نیتروژن و شرایط مناسب رشد برای این سویه است [۳۱]. پس از سه روز، مقادیر OD با سرعت بسیار کمتری افزایش یافت و تقریباً به مقدار ثابتی رسید. CG1 و CG2 به کمترین pH یعنی ۳/۷ رسیدند و بیشترین تغییر pH مربوط به CG3 و CG4 بود، که حدود ۲/۸ بود.

۳-۲-۱- بررسی نوع و میزان اسیدهای آلی تولیدشده

نتایج آزمون LC-MS محیط کشت یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30-168 در روز نهم نشان داد که اسیدهای سیتریک، مالیک و سوکسینیک توسط این سویه به محیط ترشح شد. بالاترین میزان اسیدهای آلی در محیط کشت CG2 بود که حاوی به‌ترتیب ۷۹۶۰۰، ۲۸۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر اسیدهای سیتریک، مالیک و سوکسینیک بود. مقدار اسید سوکسینیک در چهار محیط کشت بدون سلول مورد بررسی تقریباً یکسان و محتوای دو اسید آلی دیگر متفاوت گزارش شد.

اختلاف میزان اسید سیتریک موجود در محیط کشت‌های CG1 و CG2 (۷۵۱۰۰ و ۷۹۶۰۰ میلی گرم بر لیتر) با محیط کشت‌های CG3 و CG4 (۵۹۳۰۰ و ۶۲۸۰۰ میلی گرم بر لیتر) بیشتر از اسید سیتریک اضافه شده (۸۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) به محیط کشت‌های CG1 و CG2 برای تنظیم pH است که نشان

یاروویا لیپولیتیکا می‌تواند اسیدهای آلی، از جمله واسطه‌های چرخه تری کربوکسیلیک اسید را با منابع کربنی مختلف در کمبود نیتروژن تولید کند [۳۱] و [۳۲]. سیترات سنتاز کاتالیزور تبدیل اگزوالو استات و استیل کوآنزیم A به اسید سیتریک است و یون‌های آمونیوم به عنوان بازدارنده آن عمل می‌کنند. ایزوسیترات دهیدروژناز، اسید ایزوسیتریک را به آلفا-کتوگلو تارات تبدیل می‌کند و به صورت آلوستریکی توسط آدنوزین مونوفسفات فعال می‌شود. با این حال، در شرایط کمبود نیتروژن، AMP دآمیناز، AMP را هیدرولیز می‌کند و یون‌های آمونیاک تولید می‌کند، که اثر بازدارندگی بر فعالیت ایزوسیترات دهیدروژناز دارد. در نتیجه، هر دو اسیدهای سیتریک و ایزوسیتریک در میتوکندری تجمع می‌یابند [۱۲] و [۳۱]. در این پژوهش از عصاره مخمر به‌عنوان تنها منبع نیتروژن در محیط کشت استفاده شد. میزان نیتروژن کل عصاره مخمر مورد استفاده تقریباً ۱۰/۵٪ است. گلیسرول خام حاوی حدود ۳۰٪ وزنی کربن است و با توجه به غلظت گلیسرول خام موجود در محیط حدود ۲/۵-۳٪ محیط کشت از کربن تشکیل شده است. در نتیجه، نسبت C/N برای چهار محیط کشت مورد بررسی بیش از ۷۰۰ است.

بر اساس نتایج پیش‌آزمایش انجام شده، مقدار اسیدهای آلی تولیدشده معادل اسید سیتریک بر اساس نتایج تیتراسیون پتانسیومتری مطابق جدول ۳ بدست آمد. میزان اسیدهای آلی در تمام غلظت‌های گلیسرول خام مورد بررسی در روز نهم بیشینه بود. اسیدهای آلی موجود در محیط کشت‌های حاوی ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ گرم بر لیتر گلیسرول خام به‌عنوان منبع کربن، به‌ترتیب معادل ۹۵۰۰، ۱۶۰۰۰، ۱۸۵۰۰، ۲۰۰۰۰، ۲۳۰۰۰ و ۱۹۰۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید سیتریک بدست آمد. بنابراین در ادامه این پژوهش، غلظت گلیسرول خام مورد استفاده به‌عنوان منبع کربن ۸۰ و ۱۰۰ گرم بر لیتر انتخاب شد و فرآیند تخمیر در روز نهم اختتام یافت.

جدول ۳ نتایج تیتراسیون پتانسیومتری در روزهای هشتم، نهم و دهم در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های ۲۰ الی ۱۲۰ گرم بر لیتر
Table 3 Potentiometric titration results on the 8th to 10th days in culture media with crude glycerol concentration of 20 g/l to 120 g/l

Organic acids concentration (ppm)			
Crude glycerol concentration	Day 8th	Day 9th	Day 10th
20 g/l	5500	9500	8500
40 g/l	12500	16000	14500
60 g/l	14500	18500	16500
80 g/l	16000	20000	18000
100 g/l	18500	23000	21500
120 g/l	15000	19000	16500

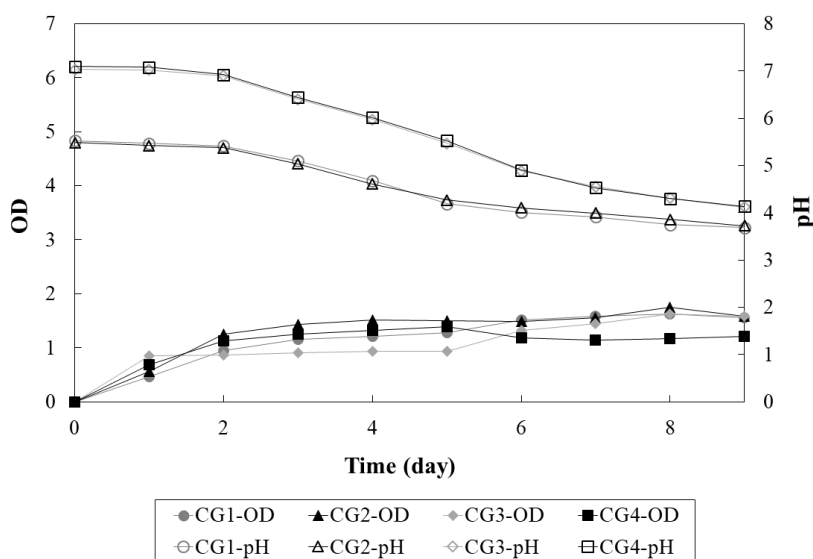


Figure 2. pH and OD changes for the studied culture media as a function of time

فروشویی زیستی دارند [۳۵] و [۳۶].

مطابق شکل ۳، اسید آلی اصلی ترشح شده در محیط کشت یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30168 در روز نهم، اسید سیتریک بود. همتافت‌های سیترات عمدتاً در pH < ۳ تشکیل می‌شوند. طی برهم کنش اسید سیتریک با کاتیون‌های فلزی، این اسید می‌تواند خواص لیگاندهای تک، دو، سه و چهار دندانه را نشان دهد. بنابراین همتافت‌های مختلفی تشکیل می‌شود [۳۵]. در pHهای بزرگتر از ۲، Mn^{2+} از فاز آبی حذف می‌شود و در pH حدود ۶ (حدود pH محیط‌های فروشویی زیستی مورد بررسی) به ترتیب فراوانی همتافت‌های $Mn(Cit)^- > Mn(HCit)^- > Mn(H_2Cit)^+ > Mn_2(Cit)_2(OH)_4^{4-}$ در فاز مایع حضور دارند [۳۸] و [۳۹]. در محیط فروشویی زیستی ممکن است معادله (۳)-(۵) برای تبدیل اکسیدهای منگنز به یون آن اتفاق بیفتد [۴۰].



سپس یون‌های Mn^{2+} حاصل از معادله (۳)-(۵)، با تشکیل همتافت با لیگاندهای مختلف اسید سیتریک در فاز مایع تثبیت می‌شوند (معادله (۶)-(۱۱)) [۴۰] و [۴۱].

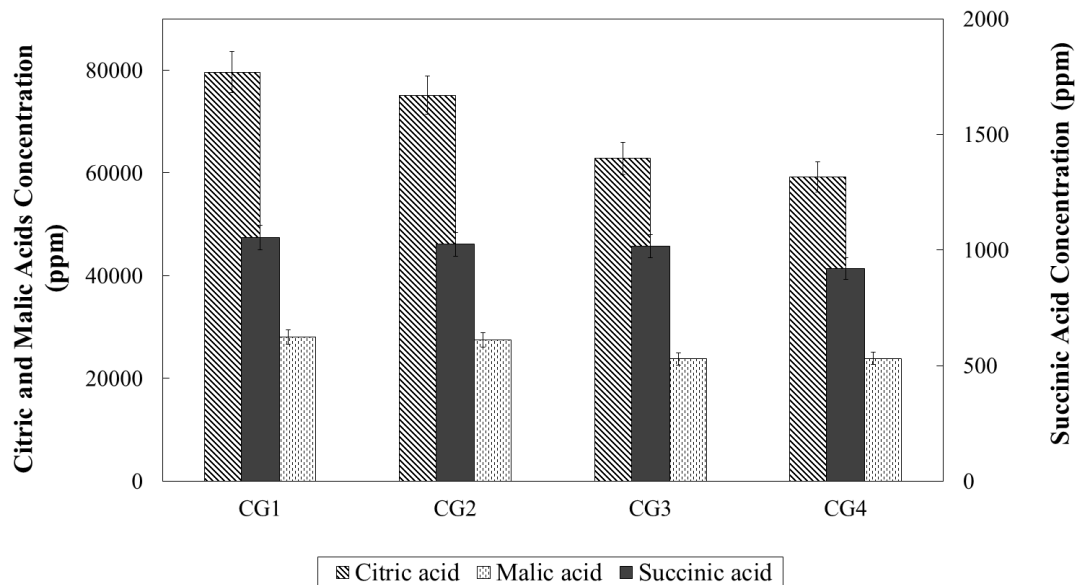


می‌دهد حضور اسید سیتریک در محیط میزان تولید این اسید را افزایش می‌دهد. میزان اسید مالیک نیز در محیط کشت‌های CG1 و CG2 که pH اولیه پایین‌تری داشتند، حدود ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر بیشتر از محیط کشت‌های CG3 و CG4 که pH اولیه آنها خنثی بود، تولید شد.

علاوه بر اسید سیتریک، یاروویا لیپولیتیکا اسید ایزوسیتریک نیز تولید می‌کند، که ایزومر ساختاری اسید سیتریک است و موقعیت گروه هیدروکسیل آن با اسید سیتریک متفاوت است. آزمون LC-MS محتوای کل این دو ایزومر را گزارش می‌کند. تولید اسید ایزوسیتریک را می‌توان با فعال کردن اکونیتات هیدراتاز افزایش داد [۱۴]. نسبت اسید سیتریک تولیدی به اسید ایزوسیتریک پارامتری پیچیده است که تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند فعالیت آنزیم‌های چرخه TCA و گلی اوکسیلات (اکونیتاز، سیترات سنتاز، ایزوسیترات دهیدروژناز، ایزوسیترات لیاز، ملات سنتاز) و فرآیندهای انتقال اسیدهای سیتریک و ایزوسیتریک از غشاهای میتوکندری و پلاسما است [۳۳] و [۳۴]. اسید مالیک یکی دیگر از اسیدهای آلی تولیدشده توسط یاروویا لیپولیتیکا IBRC-M30168 است که به طور گسترده در صنایع مختلف استفاده می‌شود [۱۸]. با این حال، نقش آن در فروشویی زیستی نسبت به اسید سیتریک به دلیل ثابت تفکیک پایین‌تر و آزادسازی H^+ کمتر، کم رنگ تر است.

۳-۱-۲-۳ سازوکار فروشویی زیستی

در میان چهار سازوکار اصلی فروشویی زیستی (اسیدکافت، تشکیل همتافت، اکسایش-کاهش و تجمع زیستی)، اسیدهای آلی معمولاً از طریق سازوکارهای اسیدکافت و تشکیل همتافت، فروشویی زیستی را انجام می‌دهند و در سویه‌های هتروتروف نقش پررنگ‌تری در

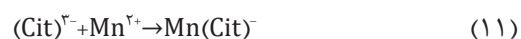
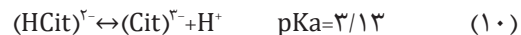


شکل ۳ نتیجه آزمون LC-MS برای محیط کشت‌های مورد بررسی
Figure 3. The result of the LC-MS analysis for the investigated culture media

یافت، در حالی که وزن باقیمانده‌های فروشویی زیستی با گذشت زمان افزایش می‌یابد (۴A). در شکل ۴C مشاهده می‌شود که میزان آهن محلول در روز نهم به صفر نزدیک شده است. با توجه به pH محیط فروشویی که در این روز به حدود خنثی نزدیک شد و افزایش وزن ۷۰-۹۰ درصدی وزن باقیمانده فروشویی زیستی غیرمستقیم با محیط کشت‌های CG۱، CG۲ و CG۳ ایجاد رسوب آهن را می‌توان نتیجه گرفت. براساس شکل ۴B و ۴C فروشویی زیستی غیرمستقیم با محیط کشت‌های CG۱ و CG۲ بازیابی منگنز و آهن بالاتری نسبت به محیط کشت‌های CG۳ و CG۴ داشتند. دلیل این تفاوت می‌تواند اسیدهای آلی بیشتر موجود در محیط کشت‌های CG۱ و CG۲ باشد (شکل ۳). فرآیند فروشویی زیستی غیرمستقیم با محیط کشت CG۱ بعد از ۳ روز بالاترین بازیابی آهن و منگنز را داشت (به ترتیب ۱۳٪ و ۵۸/۵٪). وزن باقیمانده فروشویی زیستی غیرمستقیم با محیط کشت CG۱ در روز سوم و ششم فرآیند به ترتیب ۱۴/۷٪ و ۱/۷٪ کاهش داشت، اما در روز نهم آزمایش ۲۵/۳٪ افزایش در وزن باقیمانده مشاهده شد. دلیل این تغییر ممکن است کاهش منگنز و آهن محلول به میزان حدودی ۳۰٪ و ۱۲٪ و تشکیل رسوب باشد. همانطور که از نمودارهای شکل ۴ مشخص است، با افزایش زمان، میزان بازیابی فلزات هدف کاهش می‌یابد و همزمان افزایش وزن باقیمانده فروشویی مشاهده می‌شود که نشان دهنده رسوب فلزات حل شده است.

۳-۴- مقایسه باقیمانده فروشویی زیستی با غبار کوره

نتیجه حاصل از آزمون FTIR در محدوده 4000 cm^{-1} - 400 غبار کوره قوس الکتریکی پیش از فروشویی

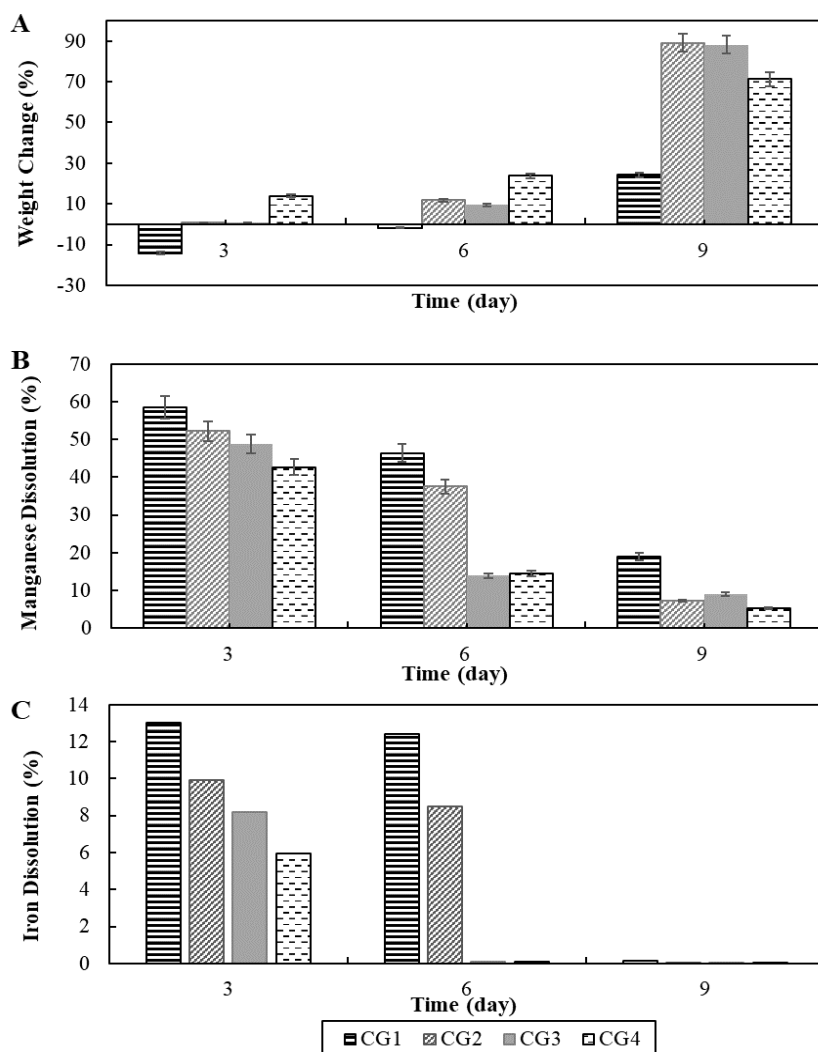


آهن در تشکیل همتافت سیترات با منگنز در رقابت است، بنابراین میزان آهن موجود در محلول فروشویی نیز اندازه‌گیری شد. در pH مورد بررسی، که حدوداً خنثی است، امکان حضور همتافت‌های $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Cit})_4\text{H}_4]^{2-}$ ، $(\text{H}_4\text{Cit})_3[\text{Fe}(\text{Cit})_4\text{H}_4]^-$ ، $[\text{Fe}(\text{Cit})_4\text{H}_4]^-$ و $[\text{Fe}_3(\text{Cit})_4\text{H}_4]^{2-}$ وجود دارد [۴۲].

۳-۳- فروشویی زیستی غیرمستقیم در حضور چگالی توده ۱۰ گرم بر لیتر

pH محیط کشت‌های مستعمل مورد بررسی حین فرآیند فروشویی زیستی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان دادند pH به تدریج در طول زمان افزایش یافت. در ۲۴ ساعت اول فرآیند این افزایش با سرعت بیشتری رخ داد و پس از ۱۴۴ ساعت، تقریباً pH در حدود ۶ ثابت شد. این تغییرات در pH با نمودار ANC-BNC غبار کوره قوس الکتریکی (شکل A۱) سازگار است که نشان می‌دهد افزودن مقدار کمی اسید هم منجر به تغییرات pH می‌شود. فرآیند فروشویی زیستی شامل واکنش‌های اکسایش-کاهش است که با حمله H^+ به سطح پسماند جامد میزان آن در محیط کاهش می‌یابد و منجر به افزایش pH می‌شود.

تغییر در وزن باقیمانده‌های فروشویی زیستی غیرمستقیم با محیط کشت‌های CG۱، CG۲، CG۳ و CG۴ و بازیابی منگنز و آهن به ترتیب در شکل ۴A، ۴B و ۴C نشان داده شد. نمودار ۴B و ۴C نشان می‌دهد که میزان منگنز و آهن فروشویی شده طی زمان کاهش



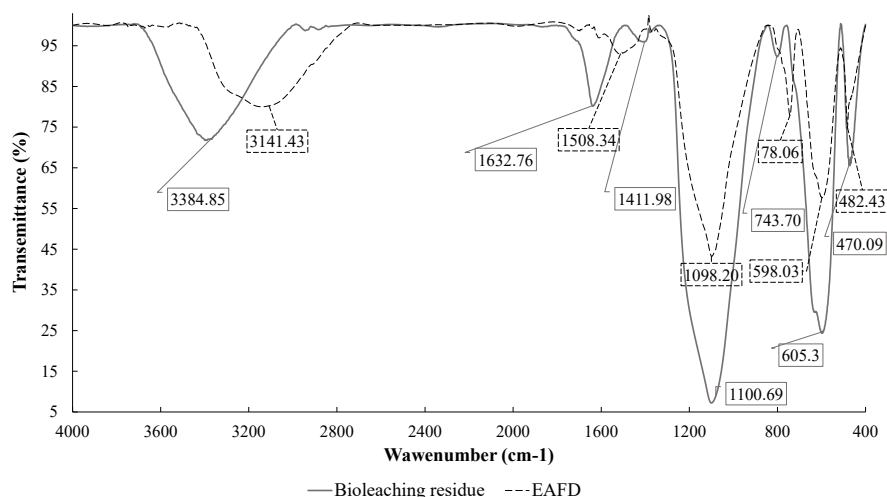
شکل ۴ (A) تغییرات وزن غبار کوره قوس الکتریکی پس از فروشویی زیستی غیرمستقیم، (B) میزان بازیابی منگنز و (C) آهن با محیط کشت های CG1، CG2، CG3 و CG4 در زمان های ۳، ۶ و ۹ روزه

Figure 4. (A) Weight change of bioleaching residue, (B) Manganese, and (C) Iron dissolution with CG-1CG4 spent culture medium in 6,3, and 9 days bioleaching

می‌دهد با وجود خشک شدن جامد باقیمانده از فروشویی زیستی مقداری آب وارد ساختار غبار شده است.

در محدوده اثر انگشت ($400-1300 \text{ cm}^{-1}$) قله‌های موجود در باقیمانده فروشویی زیستی نسبت به غبار اولیه تنها مقداری شدت بیشتری گرفتند و شکل کلی آنها یکسان است. قله‌های در محدوده عدد موجی 1000 تا 1110 cm^{-1} و 800 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی Si-O هستند و قله‌های حدود عدد موجی 550 cm^{-1} و 450 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات خمشی این پیوند هستند. قله در حدود عدد موجی 1150 cm^{-1} می‌تواند مربوط به پیوند کششی C-O دی‌اکسید باشد. نوارهای حاضر در اعداد موجی 574 cm^{-1} ، 465 cm^{-1} و 433 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات اکسیدهای ساده و اسپینل‌هاست (AB_2O_4). پیوند در عدد موجی 520 cm^{-1} نشان‌دهنده Zn-O است که می‌تواند در این پیک مستتر شده باشد [۴۳]، [۴۴] و [۴۵].

زیستی و پس از فروشویی زیستی غیرمستقیم با محیط کشت CG1 در شکل ۵ نشان داده شد. مشاهده می‌شود پیوندها در باقیمانده فروشویی زیستی تقریباً مشابه غبار اولیه است و تنها پیوند O-H به نمونه بعد از فروشویی زیستی اضافه شد. الگوی FTIR پیش از فروشویی زیستی پیوندهای کششی C-H و O-H را در محدوده عدد موجی $3400-3100 \text{ cm}^{-1}$ نشان می‌دهد (زنجیره کربن آلیفاتیک که نشان‌دهنده حضور مواد آلی است). پیوند در حدود عدد موجی $1630-1620 \text{ cm}^{-1}$ پیوند C=C را نشان می‌دهد. این قله در غبار اولیه دیده نمی‌شود ولی در باقیمانده فروشویی زیستی این پیوند وجود دارد که می‌تواند بین کربن محیط و کربن موجود در غبار ایجاد شده باشد و نشان‌دهنده تغییر ساختاری غبار پس از فروشویی زیستی است. پیوند در حدود عدد موجی 1400 cm^{-1} پیوندهای O-H را نشان می‌دهد. این پیوند در غبار اولیه دیده نمی‌شود ولی در باقیمانده فروشویی زیستی این قله وجود دارد. این اتفاق نشان



شکل ۵ نمودار FTIR غبار کوره قوس الکتریکی (EAFD) و باقیمانده حاصل از فروشویی زیستی غیرمستقیم با محیط کشت CG1 ۳ روزه (Bioleaching residue)

Figure 5. FTIR diagram of electric arc furnace dust (EAFD) and bioleaching residue of spent culture medium CG1 after 3 days (Bioleaching residue)

شد. فروشویی زیستی به روش محیط کشت مستعمل با چهار محیط کشت مورد بررسی در 60°C ، چگالی توده 10 گرم بر لیتر و طی 3 و 9 روز نشان داد بیشترین میزان فروشویی منگنز مربوط به محیط کشت مستعمل CG1 (pH اولیه $5/5$ و غلظت گلیسرول خام 80 گرم بر لیتر) بود که منجر به بازیابی $58/5\%$ از منگنز موجود در غبار کوره قوس الکتریکی شد. روند تغییرات وزن باقیمانده فروشویی زیستی و درصد بازیابی آهن و منگنز با گذشت زمان نشان می‌دهند با افزایش زمان، افزایش وزن باقیمانده فروشویی زیستی رخ می‌دهد و میزان فلزات محلول کاهش می‌یابند. با توجه به نتایج آزمون FTIR کاهش انحلال و افزایش وزن می‌تواند مربوط به رسوب سولفات تشکیل شده باشد. انحلال منگنز با افزایش pH تا حدود خنثی کاهش می‌یابد. در نتیجه با توجه به نتایج اندازه‌گیری pH محیط فروشویی زیستی، با افزایش زمان فروشویی pH محیط افزایش و منگنز محلول کاهش می‌یابد. با توجه به نتایج بدست‌آمده متابولیت‌های تولیدشده توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* IBRC-M30168 در حضور منبع کربن گلیسرول خام توانایی بازیابی منگنز از غبار کوره قوس الکتریکی را دارند.

قدردانی

این پژوهش توسط دانشگاه تربیت مدرس [با شماره گرنت IG-39701] حمایت مالی شد. نویسندگان قدردان حمایت مالی ستاد توسعه زیست‌فناوری جمهوری اسلامی ایران و مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی (Center for International Scientific Studies and Collaboration (CISSC)) وزارت علوم، تحقیقات و فناوری نیز هستند.

پیوند موجود در نزدیکی عدد موجی 1120 cm^{-1} می‌تواند مربوط به ارتعاشات سولفات باشد و انتظار می‌رود قله بعدی مربوط به این پیوند در حدود 617 cm^{-1} روی نوار ارتعاشی قوی‌تر اسپینل‌ها سوار شده باشد (598 cm^{-1}). در محدوده عدد موجی $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ پیوندهای مربوط به سولفات آهن قرار دارد. این قله ممکن است در قله بزرگی که در این محدوده در باقیمانده فروشویی زیستی دیده می‌شود، قرار داشته باشد. این قله در غبار اولیه نیز وجود دارد ولی پس از فروشویی شدت آن بیشتر شد که می‌توان آن را به رسوب سولفات آهن ایجادشده حین فرآیند فروشویی زیستی نسبت داد [۴۶].

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش اثر متابولیت‌های تولید شده توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* IBRC-M30168، در حضور گلیسرول خام به‌عنوان تنها منبع کربن، در فروشویی زیستی غیرمستقیم به روش محیط کشت مستعمل غبار کوره قوس الکتریکی ریخته‌گری فولاد طبرستان برای بازیابی منگنز بررسی شد. محیط کشت اختصاصی برای تولید اسیدهای آلی استفاده شد و نتایج آزمون LC-MS نشان داد این سویه در حضور منبع کربن گلیسرول، اسیدهای سیتریک، مالیک و گلوکونیک تولید می‌کند. میزان اسیدهای آلی تولیدشده در چهار محیط کشت مورد بررسی نشان داد حضور اسید سیتریک در محیط با تنظیم pH اولیه روی $5/5$ منجر به افزایش تولید اسیدهای سیتریک و مالیک شد. محیط کشت با pH اولیه $5/5$ و غلظت گلیسرول خام 80 گرم بر لیتر حاوی بیشترین مقدار اسیدهای آلی بود. در این محیط کشت به‌ترتیب 79600 ، 28100 و 1000 میلی‌گرم بر لیتر اسیدهای سیتریک، مالیک و سوکسینیک ترشح

مراجع

- [1] Montenegro V., Agatzini-Leonardou S., Oustadakis P., and Tsakiridis P., Hydrometallurgical Treatment of EAF Dust by Direct Sulphuric Acid Leaching at Atmospheric Pressure, Waste and Biomass Valorization, 7(6), 1531–1548, 2016.
- [2] Lanzerstorfer C. and Preitschopf W., Steelmaking Dust: Speciation of Zinc by Sequential Leaching, Inzynieria Mineralna, 2020(2), 79–82, 2020.
- [3] Zoraga M., Ilhan S., and Kalpakli A.O., Leaching Kinetics of Electric Arc Furnace Dust in Nitric Acid solutions, International Journal of Chemical Kinetics, 52(12), 933–942, 2020.
- [4] Oustadakis P., Tsakiridis P. E., Katsiapi A., and Agatzini-Leonardou S., Hydrometallurgical Process for Zinc Recovery from Electric Arc Furnace Dust (EAFD). Part I: Characterization and Leaching by Diluted Sulphuric Acid, Journal of Hazardous Materials, 179, 8–14, 2010.
- [5] Khanmohammadi Hazaveh P., Karimi S., Rashchi F., and Sheibani S., Purification of the Leaching Solution of Recycling Zinc from the Hazardous Electric Arc Furnace Dust Through an As-Bearing Jarosite, Ecotoxicology and Environmental Safety, 202, 110893, 2020.
- [6] Darezereshki E., Vakylabad A.B., and Koohestani B., A Hydrometallurgical Approach to Produce Nano-ZnO from Electrical Arc Furnace Dusts, Mining, Metallurgy and Exploration, 38(3), 1525–1535, 2021.
- [7] Nair A.T., Mathew A., Archana A.R., and Akbar M.A., Use of Hazardous Electric Arc Furnace Dust in the Construction Industry: A Cleaner Production Approach, Journal of Cleaner Production, 377, 134282, 2022.
- [8] Dutra A.J.B., Paiva P.R.P., and Tavares L.M., Alkaline Leaching of Zinc from Electric Arc Furnace Steel Dust, Minerals Engineering, 19(5), 478–485, 2006.
- [9] Borda J. and Torres R., Comparative Study of Selective Zinc Leaching from EAFD using Carboxylic Agents, Revista Mexicana Ingenieria Quimica, 20(1), 389–398, 2021.
- [10] Vakilchab F., Mousavi S.M., and Shojaosadati S.A., Role of *Aspergillus niger* in Recovery Enhancement of Valuable Metals from Produced Red Mud in Bayer process, Bioresource Technology, 218, 991–998, 2016.
- [11] Rasoulnia P. and Mousavi S.M., Maximization of Organic Acids Production by *Aspergillus niger* in a Bubble Column Bioreactor for V and Ni Recovery Enhancement from Power Plant Residual Ash in Spent-medium Bioleaching Experiments, Bioresource Technology, 216, 729–736, 2016.
- [12] Cavallo E., Charreau H., Cerrutti P., and Foresti M.L., *Yarrowia lipolytica*: A Model Yeast for Citric Acid Production, FEMS Yeast Research, 17(8), 1–16, 2017.
- [13] Magdoui S., Brar S.K., and Blais J.F., Morphology and Rheological Behavior of *Yarrowia lipolytica*: Impact of Dissolved Oxygen Level on Cell Growth and Lipid Composition, Process Biochemistry, 65, 1–10, 2018.
- [14] Kamzolova S.V., Samoilenko V.A., Lunina J.N., and Morgunov I.G., Effects of Medium Components on Isocitric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* Yeast, Fermentation, 6(4), 112, 2020.
- [15] Tomaszewska L., Rymowicz W., and Rywińska A., Mineral Supplementation Increases Erythrose Reductase Activity in Erythritol Biosynthesis from Glycerol by *Yarrowia lipolytica*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 172(6), 3069–3078, 2014.
- [16] Bankar A., Winey M., Prakash D., Kumar A.R., Gosavi S., Kapadnis B., and Zinjarde S., Bioleaching of Fly Ash by the Tropical Marine Yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, Applied Biochemistry and Biotechnology, 168(8), 2205–2217, 2012.
- [17] Ferreira D.M., Silva J.A.S., Sérvulo E.F.C., Frescura V.L. A., Dognini J., de Melo Juste Silva A.A., and Oliveira F.J.S., Valorization of Solid Waste from Oil Refining and Biodiesel Industries for the Biorecovery of Rare Earth Elements, Biomass Conversion and Biorefinery, 12(7), 2891–2900, 2020.
- [18] Qian X., Xu N., Jing Y., Song M., Zhou J., Dong W., Xin F., Zhang W., Jiang M., and Ochsenreither K., Valorization of Crude Glycerol into Citric Acid and Malic Acid by *Yarrowia lipolytica*, Industrial and Engineering Chemistry Research, 59(39), 17165–17172, 2020.
- [19] Naseri T., Mousavi S.M., and Kuchta K., Environmentally Sustainable and Cost-effective Recycling of Mn-rich Li-ion Cells Waste: Effect

of Carbon Sources on the Leaching Efficiency of Metals Using Fungal Metabolites, Waste Management, 157, 47-59, 2023.

[20] Ghosh S., Mohanty S., Akcil A., Sukla L.B., and Das A.P., A Greener Approach for Resource Recycling: Manganese Bioleaching, Chemosphere, 154, 628-639, 2016.

[21] Gu T., Rastegar S.O., Mousavi S.M., Li M., and Zhou M., Advances in Bioleaching for Recovery of Metals and Bioremediation of Fuel Ash and Sewage Sludge, Bioresource Technology, 261, 428-440, 2018.

[22] Gomes H.I., Funari V., Mayes W.M., Rogerson M., and Prior T.J., Recovery of Al, Cr, and V from Steel Slag by Bioleaching: Batch and Column Experiments, Journal of Environmental Management, 222, 30-36, 2018.

[23] Horeh N.B., Mousavi S.M., and Shojaosadati S.A., Bioleaching of Valuable Metals from Spent Lithium-ion Mobile Phone Batteries Using *Aspergillus niger*, Journal of Power Sources, 320, 257-266, 2016.

[24] Sadeghabad M.S., Bahaloo-Horeh N., and Mousavi S.M., Using Bacterial Culture Supernatant for Extraction of Manganese and Zinc from Waste Alkaline Button-cell Batteries, Hydrometallurgy, 188, 81-91, 2019.

[25] Zhang W. and Hu Z., Recent Advances in Sample Preparation Methods for Elemental and Isotopic Analysis of Geological Samples, Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy, 160, 105690, 2019.

[26] Glass G.K. and Buenfeld N.R., Differential Acid Neutralization Analysis, Cement and Concrete Research, 29(10), 1681-1684, 1999.

[27] Egermeier M., Russmayer H., Sauer M., and Marx H., Metabolic Flexibility of *Yarrowia lipolytica* Growing on Glycerol, Frontiers in Microbiology, 8, 1-9, 2017.

[28] Maslov O.Y., Kolisnyk S.V., Kostina T.A., Shovkova Z.V., Ahmedov E.Y., and Komisarenko M.A., Validation of the Alkalimetry Method for the Quantitative Determination of Free Organic Acids in Raspberry Leaves, Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry, 1548(73), 53-58, 2021.

[29] Sergunova E.V., Sorokina A.A., Bokov D.O., Marakhova I., and Vyacheslavovna E., Qualitative and Quantitative Determination of Organic Acids in Crude Herbal Drugs and Medicinal

Herbal Preparations for Quality Control in Russian Federation by Modern Physicochemical Methods, Pharmacognosy Journal, 11(5), 1132-1137, 2019.

[30] Malekian H., Salehi M., and Biria D., Investigation of Platinum Recovery from a Spent Refinery Catalyst with a Hybrid of Oxalic Acid Produced by *Aspergillus niger* and Mineral Acids, Waste Management, 85, 264-271, 2019.

[31] Yuzbasheva E.Y., Scarcia P., Yuzbashev T.V., Messina E., Kosikhina I.M., Palmieri L., Shutov A.V., Taratynova M.O., Amaro R.L., Palmieri F., Sineoky S.P., and Agrimi G., Engineering *Yarrowia lipolytica* for the Selective and High-level Production of Isocitric Acid Through Manipulation of Mitochondrial Dicarboxylate-Tricarboxylate Carriers, Metabolic Engineering, 65, 156-166, 2021.

[32] Finogenova T.V., Kamzolova S.V., Dedyukhina E.G., Shishkanova N.V., Il'chenko A.P., Morgunov I.G., Chernyavskaya O.G., and Sokolov A.P., Biosynthesis of Citric and Isocitric Acids from Ethanol by Mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under Continuous Cultivation, Applied Microbiology and Biotechnology, 59(4-5), 493-500, 2002.

[33] Harzevili F.D., Biotechnological Applications of the Yeast *Yarrowia lipolytica*, Springer Briefs in Microbiology, 1-74, 2014.

[34] Kamzolova S.V., Finogenova T.V., and Morgunov I.G., Microbiological Production of Citric and Isocitric Acids from Sunflower Oil. Food Technology and Biotechnology, 46(1), 51-59, 2008.

[35] Rasoulnia P., Mousavi S.M., Rastegar S.O., and Azargoshasb H., Fungal Leaching of Valuable Metals from a Power Plant Residual Ash Using *Penicillium simplicissimum*: Evaluation of Thermal Pretreatment and Different Bioleaching Methods, Waste Management, 52, 309-317, 2016.

[36] Srichandan H., Mohapatra R.K., Parhi P.K., and Mishra S., Bioleaching Approach for Extraction of Metal Values from Secondary Solid Wastes: A Critical Review, Hydrometallurgy, 189, 105122, 2019.

[37] Nefedova K.V., Zhuravlev V.D., Khaliullin S.M., Tyutyunnik A.P., and Buldakova L.Y., Study of the Composition of a Precipitate Formed from Solutions for the Synthesis of Cathodic Materials Containing Manganese and Citric Acid, The-

oretical Foundations of Chemical Engineering, 55(1), 117–122, 2021.

[38] Ferella F., De Michelis I., Beolchini F., Innocenzi V., and Vegliò F., Extraction of Zinc and Manganese from Alkaline and Zinc-carbon Spent Batteries by Citric-sulphuric Acid Solution, International Journal of Chemical Engineering, 2010, 659434, 2010.

[39] Villamizar E., Jiménez-Martínez J., Blanco S., and Delvasto P., Obtention of a Cobalt-bearing Coating Using Spent Batteries as Raw Materials, Journal of Physics: Conference Series. 1386(1), 012015, 2019.

[40] Naseri T., Pourhossein F., Mousavi S.M., Kaksonen A.H., and Kuchta K., Manganese Bioleaching: An Emerging Approach for Manganese Recovery from Spent Batteries, Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 21(2), 447–468, 2022.

[41] Rasoulnia P., Barthen R., and Lakaniemi A.M., A Critical Review of Bioleaching of Rare Earth Elements: The Mechanisms and Effect of Process Parameters, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 51(4), 378–427, 2021.

[42] Silva A.M.N., Kong X., Parkin M.C., Cammack R., and Hider R.C., Iron(III) Citrate Speciation in Aqueous Solution, Dalton Transactions, 40, 8616–8625, 2009.

[43] Martins F.M., Neto J.M. dos R., and Cunha C.J.da, Mineral Phases of Weathered and Recent Electric Arc Furnace Dust, Journal of Hazardous Materials, 154(1–3), 417–425, 2008.

[44] Nikolic I., Durovic D., Markovic, S., Veselinovic L., Jankovic-Castvan I., Radmilovic V.V., and Radmilovic V.R., Alkali Activated Slag Cement Doped with Zn-rich Electric Arc Furnace Dust, Journal of Materials Research and Technology, 9(6), 12783–12794, 2020.

[45] Chang F., Wu S., Zhang F., Lu H., and Du K., Characterization of Minerals, Metals, and Materials 2015, Springer International Publishing, 83–90, 2015.

[46] Adamou A., Manos G., Messios N., Georgiou L., Xydas C., and Varotsis C., Probing the Whole Ore Chalcopyrite–bacteria Interactions and Jarosite Biosynthesis by Raman and FTIR Microspectroscopies, Bioresource Technology, 214, 852–855, 2016.