

Biotransformation von Kohle – Basis für reduktive Prozesse in Braunkohleabraumkippen

Elisabeth Simon & Andrea Kassahun

Grundwasserforschungsinstitut GmbH Dresden, Meraner Straße 10, 01217 Dresden,
Email: estiebitz@gfi-dresden.de

Die in den Braunkohleabraumkippen verstürzte tertiäre organische Substanz kann den Ausgangspunkt für mikrobielle (heterotrophe) Umsatzprozesse bilden. In der vorliegenden komplexen Form als Kohlemakromolekül ist dies jedoch kaum möglich. Es muss daher eine Transformation dahingehend stattfinden, dass mikrobiell verwertbare C-Quellen entstehen. Als erster Schritt der Kohleumwandlung wurde in Laborversuchen die Verflüssigung durch autochthone Pilze (*Mucor hiemalis*), die aus Kippenmaterial (Plessa/ Lausitz) angezogen wurden, identifiziert. Pilze sind als acidophil bzw. acidotolerant bekannt. Als Kohleverflüssigungsprodukt wurden schwarze Tropfen auf der Pilzoberfläche beobachtet. Sie enthalten wasserlöslichen organischen Kohlenstoff mit Konzentrationen von bis zu 20 g/L. Dieser DOC kann die Grundlage für reduktive mikrobielle Stoffwechselprozesse darstellen, bspw. Sulfatreduktion. Der Ablauf mikrobieller Reduktionsprozesse stellt ein enormes Selbstreinigungspotential für versauerte Kippenkörper dar.

Tertiary organic substance could be the base for microbial heterotrophic metabolism processes in overburden dumps of open cast lignite mines. The lignified organic matter in the dumps is very complex and not readily available for microorganisms. Therefore transformation into microbial substrates is necessary. As the initial step of coal transformation the liquefaction of coal by autochthonous fungi was mentioned in laboratory tests. The fungi (*Mucor hiemalis*) were isolated from dump material of the Plessa site (Lusatia) on Sabouraud-Glucose Agar. Fungi are known as acidotolerant to acidophil microorganisms. These fungi transformed the lignite particles into black droplets of very high organic carbon content (up to 20 mg/L). This dissolved organic carbon could be the starting point for reductive microbial metabolism processes e.g. sulfate reduction. These processes are very important as self-cleaning processes in acidified dumps.

1 Einleitung

In den achtziger und frühen neunziger Jahren wurden umfangreiche Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Kohlenutzbarmachung mit dem Ziel durchgeführt, Prozesse zu entwickeln, bei denen unter „milden“ Reaktionsbedingungen Kraftstoffe, Energieträger und Grundstoffe für die chemische Industrie entstehen können. Kohle sollte zum Zweck der Energiegewinnung nicht mehr nur ausschließlich verbrannt werden, sondern mikrobiologisch so verändert, dass ein Grundstoff zur weiteren Verwertung entsteht. Besonders die für den Abbau als unwirtschaftlich geltenden Braun- und Steinkohlevorkommen (Flöze in großen Tiefen, weniger kohleführende Begleitschichten) sollten so erschlossen werden (FAKOUSA 1992).

Zahlreiche Autoren haben sich mit der Problematik der mikrobiellen Kohleumwandlung und besonders der Kohleverflüssigung befasst. So haben (COHEN & GABRIELE 1982) herausgefunden, dass bestimmte Pilzarten in der Lage sind, Kohle

zu verflüssigen. (WARD 1985) isolierte kohleabbauende Pilze aus verwitterten Kippensedimenten und konnte nachweisen, dass diese mit einem Grundmedium (Sabouraud-Dextrose-Agar) dem Kohle beigefügt wurde, besser wachsen können, als mit reinem Grundmedium ohne Kohlezusatz. Ein Jahr später publizierten (SCOTT et al. 1986), dass verschiedene Pilzstämme in der Lage sind, Kohle zu verflüssigen. Für die Ermittlung des Selbstreinigungspotentials von Braunkohleabraumkippen könnte dieser Ansatz sehr vielversprechend sein, während er für die Energiegewinnung keine entsprechende Bedeutung erlangen konnte. In den Abraumkippen könnte aber die Umwandlung von Kohle in verfügbare Substrate für Mikroorganismen den Grundstein für die Sulfatreduktion legen. Diese wiederum würde durch FeS-Bildung zur Festlegung von Acidität und Metallen führen, welche durch die Verwitterung von kohlebegleitenden Pyriten, verursacht durch die Abraumbelüftung beim Kohleabbau, entsteht.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente kamen Sedimente des Kippengebietes Plessa (Lausitzer Revier) zum Einsatz. Die Kippe Plessa zählt zu den Altkippen, die derzeit als „Langzeitversuche“ zur Identifikation ablaufender Natural Attenuation Prozesse untersucht werden (TRÖGER et al. 2007).

Für die Entnahme der Sedimentproben in Plessa wurde durch unseren Projektpartner der TU BA Freiberg (Institut für Bohrtechnik und Fluidbergbau, Dr. N. Hoth) im Kippengebiet ein Schurf (Abbildung 1) mit den Maßen B: 1,50 m, L: 1,50 m und T: 2,50 m angelegt. In ca. 2,30 m Tiefe wurde die Sedimentprobe entnommen, hier enthielt das sonst sandig bis schluffige Material einen hohen Anteil an Kohlestücken. Die mittels Feldeluat vor Ort aufgenommenen Milieuparameter sind in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 1) enthalten.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Anzuchtversuche

Zur Bestimmung der in den unterschiedlichen Kippensedimenten auftretenden Pilzarten wurde das Labor für Mikrobiologie und Hygiene in



Abb. 1: Schurf in Plessa.

Tab. 1: Milieu Schurf Plessa.

pH	Eh	ELF
[-]	[mV]	[μ S/cm]
3,3	252	1244

Tab. 2: Zusammensetzung Agar.

Chemikalie	Menge [g/L]
Fleischpepton	5
Caseinpepton	5
Glucose	20
Chloramphenicol	0,05
Gentamicin	0,1
Agar	20

Hoyerswerda mit der Anzucht, Identifizierung und Quantifizierung beauftragt. Hierzu wurden Petrischalen mit Sabouraud-Glucose-Agar (2%ig) der folgenden Zusammensetzung (Tabelle 2) ausgegossen.

Das Agar wies einen pH-Wert von 5,6 auf. Das auf Pilze zu untersuchende Sediment wurde direkt in das noch flüssige Agar gegeben. Anschließend wurden die Petrischalen abgedeckt und bei 20 °C inkubiert. Nach ca. 3 Wochen Wachstumsphase wurden die gewachsenen Pilze unter dem Mikroskop identifiziert und quantifiziert.

2.2.2 Plattentests zur Verflüssigung

Für die Kohleverflüssigungstests wurden die dicht bewachsenen Petrischalen mit frischem Sediment beaufschlagt. Das Sediment wurde einerseits feldfrisch eingesetzt. Für parallele Testreihen wurde es im Gefriertrockner getrocknet und auf eine Korngröße von < 200 μ m aufgemahlen. Nach dem Aufbringen der Sedimente auf die Pilzsporen wurden die Platten verschlossen und erneut bei 20°C für etwa 20 Tage inkubiert.

2.2.3 Anaerob-Batchtests

Um die Zusammensetzung der gelösten kippenbürtigen organischen Substanz zu ermitteln, wurden anaerobe Batchversuche durchgeführt.

Für die Untersuchungen wurden jeweils 100 g Kippenvorfeldsediment aus Zwenkau mit 2000 mL O₂-freiem aq. bidest. in 2-L-Schottflaschen mit Transferverschluss überführt. Die Flaschen wurden während des gesamten Versuches auf einem Tischschüttler geschüttelt und im 14-tägigen Rhythmus bezüglich Milieu, Kationen- und C_{org}-Gehalten beprobt. Die Spezialanalytik für organische Verbindungen erfolgte in größeren Abständen. Insgesamt dauerten die Versuche 300 Tage.

2.2.4 LC-OCD

Die gelöst vorliegende Substanz wurde mittels Liquid Chromatography - Organic Carbon Detection-Verfahren in 5 Fraktionen (Tabelle 3) unterteilt (Analytik: Technologiezentrum Wasser (TZW) Außenstelle Dresden; Dr. A. Korth). Hierzu wird eine wässrige Probe über Trennsäulen geleitet, die poröse Gele enthalten. Die Trennung der Fraktionen erfolgt prinzipiell über die Molekülgröße. Große Moleküle lösen sich schneller wieder aus dem Gel, da sie nicht so tief eindringen können, somit erfolgt die Elution dieser Moleküle schneller. Beeinflusst wird die Elution zusätzlich durch Effekte wie hydrophobe und ionogene Wechselwirkungen mit dem Gel. Somit ist eine noch genauere Unterteilung in einzelne Fraktionen möglich.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der im Kippengrundwasser vorliegenden organischen Substanz

Zunächst wurde für einige Grundwasserproben aus Plessa (MPL) eine DOC-Fraktionierung vorgenommen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 2 graphisch dargestellt.

Neben der Fraktion der Huminstoffe sind die Building Blocks und die amphiphilen / neutralen

Tab. 3: DOC-Fraktionierung mittels LC-OCD-Verfahren.

Fraktion	Bemerkungen
Niedermolekulare Verbindungen / Säuren	C ₁ -C ₅
Building Blocks	< 350 g/mol
Huminstoffe	350 - 10.000 g/mol
Amphiphile und neutrale Stoffe	schwer verfügbar
Polysaccharide	> 20.000 g/mol
natürliche hydrophobe Stoffe	hydrophobe Substanzen

Stoffe am häufigsten vertreten. Amphiphile Stoffe stellen Umbauprodukte von Huminstoffen dar und lassen somit auf mikrobielle Tätigkeit schließen. Building Blocks entstehen durch die Oxidation und Hydrolyse von Huminstoffen und bilden in ihrer Gesamtheit Substrate für Mikroorganismen. Zur Gruppe der Building Blocks zählen unter anderem die Dicarbonsäuren wie Oxalsäure, Malonsäure und Bernsteinsäure. Speziell diese organischen Säuren wurden als Substrate für sulfatreduzierende Bakterien beschrieben (WIDDEL 1988). Die Fraktion der Säuren enthält organische Verbindungen mit 1 bis 5 C-Atomen, die ebenfalls mikrobiologische Substrate darstellen. Zur genaueren Identifikation von möglichen Substraten sulfatreduzierender Bakterien wurde an die LC-OCD-Analytik noch eine Einzelstoffanalytik mittels GC/MS- und HPLC-Analyse bezüglich organischer Säuren und Di-

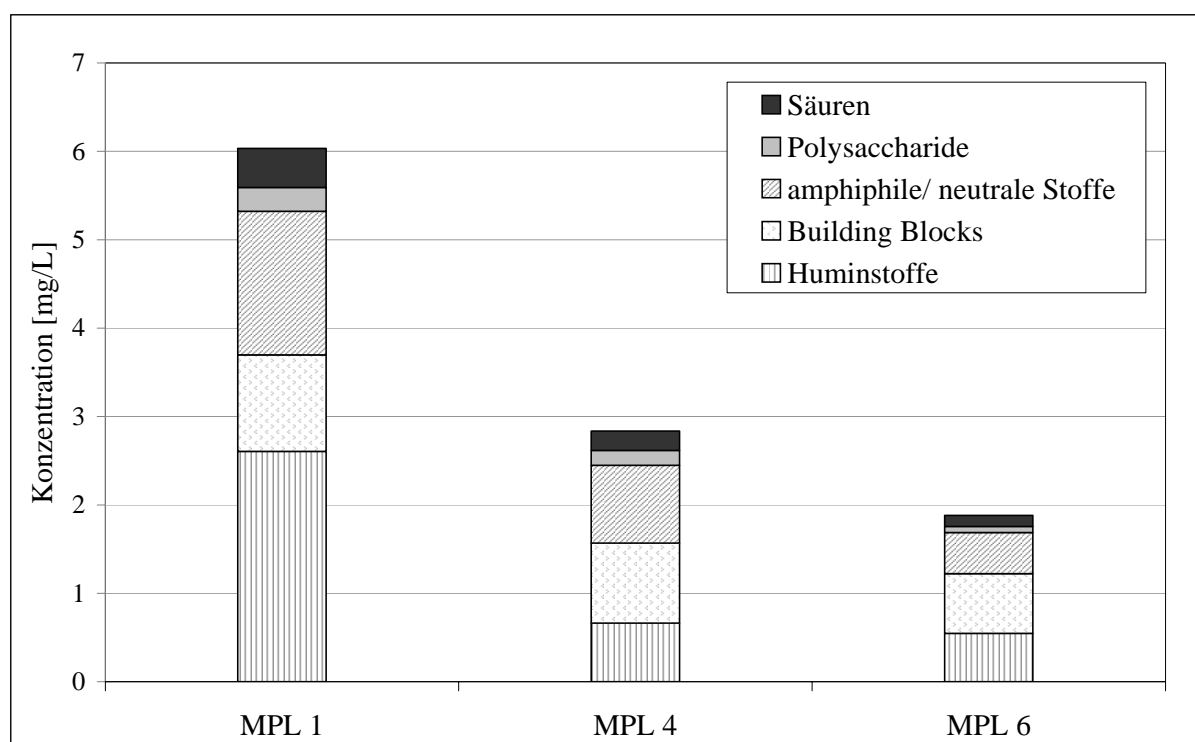


Abb. 2: DOC-Fractionen Kippengrundwasser Plessa.

Tab. 4: Einzelstoffanalytik Kippengrundwasser.

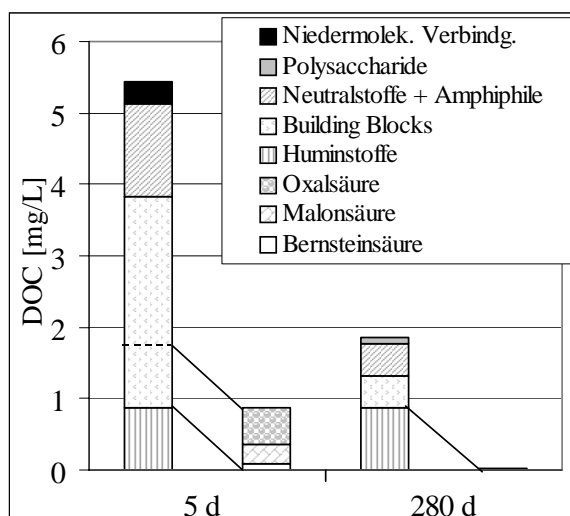
Grundwasserprobe	nachgewiesener Einzelstoff	Konzentration
RZW 1	Oxalsäure	3,1 mg/L
MPL 1	Benzoessäure	0,03 mg/L
	Phenol	0,02 mg/L
	Phthalsäure / Isophthalsäure	quantitativ
MPL 11	Benzoessäure	0,24 mg/L
	Sebacinsäure	quantitativ
	3-Methylglutarsäure	quantitativ
	1,4-Benzendicarbonsäure	quantitativ
MPL 12	Benzoessäure	0,21 mg/L
	Sebacinsäure	quantitativ
	3-Methylglutarsäure	quantitativ
	1,4-Benzendicarbonsäure	quantitativ

carbonsäuren angeschlossen (SCHMALZ et al. 2002). Hierbei konnten zwar teilweise nur qualitative Nachweise erfolgen, dennoch gibt eine solche Einzelstoffanalytik einen guten Überblick über mögliche verwertbare C-Quellen für Bakterien (Tabelle 4).

3.2 Anaerob-Batchtest zur Wandlung der organischen Substanz

Mit den Batchversuchen wurde die Zusammensetzung und die Wandlung der organischen Substanz im Kippenmaterial untersucht. Ferner sollten Aussagen über mögliche, aus dem Kippensediment stammende Substrate für Mikroorganismen (speziell Sulfatreduzierer) getroffen werden.

Um auch für diese Versuchswässer eine erste Idee von der Art der gelöst vorliegenden organischen Substanz zu erlangen, wurde zunächst ebenfalls eine LC-OCD-Analyse durchgeführt.

**Abb. 3: Vergleich DOC-Fractionen und Einzelstoffanalyse.**

Die Ergebnisse hierfür sind im nachfolgenden Diagramm (Abbildung 3) zusammengefasst. In diesem Diagramm sind ebenfalls die Ergebnisse der durchgeführten Einzelstoffanalytik enthalten. Das erste Balkenpaar zeigt den Versuchszustand zu Beginn des Batchtests und das zweite Balkenpaar den Zustand nach 280 Tagen.

Die bestimmten Dicarbonsäuren Oxalsäure, Bernsteinsäure und Malonsäure sind den Building Blocks zuzuordnen und nehmen zu Versuchsbeginn ca. 28 % in dieser Fraktion ein. Der Anteil am Gesamt-DOC beträgt ca. 16 %. Nach 280 Versuchstagen sind die als abbaubar bzw. leicht verwertbar geltenden Fraktionen der niedermolekularen Verbindungen, der amphiphilen Stoffe und der Building Blocks gegenüber den Anfangskonzentrationen stark reduziert. Die Dicarbonsäuren sind nur noch im μg -Bereich nachweisbar, es fand demnach ein deutlicher mikrobieller Abbau statt. Für die aus dem Kippensediment eluierten bzw. herausgelösten organischen Verbindungen kann also festgestellt werden, dass sie mikrobiell verwertbar sind. Ein weiterer Hinweis auf mikrobielle Aktivität in den Versuchen findet sich im Anstieg der Fraktion der Polysaccharide. In dieser Stoffgruppe ist u.a. extrazelluläre polymere Substanz (EPS) enthalten, die auf lebendes und z.T. auch totes Zellmaterial hinweist (SIMON & HOTH 2007).

3.3 Experimente zum Ursprung der gelösten organischen Substanz

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass die vorliegende organische Substanz verwertbar ist, war das Ziel der im Folgenden beschriebenen Experimente, die Bestimmung des Ursprungs dieser gelöst vorliegenden Substanzen. Hierzu wurden die eingangs beschriebenen Kohlever-

Tab. 5: Ergebnisse des Pilz-Screenings.

Probe	Keimzahl [koloniebildende Einheiten/10g]	Identifizierung
PL 11 (2,20-2,50m)	2.400	90 % <i>Mucor plumbeus</i> ; 10 % <i>Eurotium herbariorum</i>
PL 11 (5,47-5,70m) (Kohle)	3.600	40 % <i>Monascus ruber</i> ; 30 % <i>Absidia corymbifera</i> 20 % <i>Geomyces passorum</i> ; 10 % <i>Aspergillus candida</i>
SchuPl (2,30m)	30.000	100 % <i>Mucor hiemalis</i>

flüssigungsversuche aus der Fachliteratur mit Sediment aus der Braunkohleabraumkippe in Plessa durchgeführt.

Zunächst wurde vorhandenes Kernmaterial (PL11) und Schurfmaterial (SchuPl) aus Plessa auf Pilze untersucht. Die Ergebnisse der Anzuchtversuche sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Alle in den Sedimentproben detektierten Pilze werden zu den Schimmelpilzen gezählt. Die in den beiden ersten Proben bestimmten Keimzahlen entsprechen im Wesentlichen den in Sedimenten unserer Breiten Üblichen. Der in der Kohle-Probe nachgewiesene *Aspergillus candida* ist als ligninverwertender Pilz bekannt und könnte also in den Braunkohlekippen eine maßgebliche Bedeutung haben. In der Probe aus dem Schurf Plessa wurde die ca. 10fache Konzentration an Pilzen nachgewiesen. Zudem wurde hier wiederum eine andere Pilzart gefunden als in den ersten beiden Proben. Es zeigt sich dadurch die enorme Vielfalt an in Sedimenten auftretenden Schimmelpilzen.

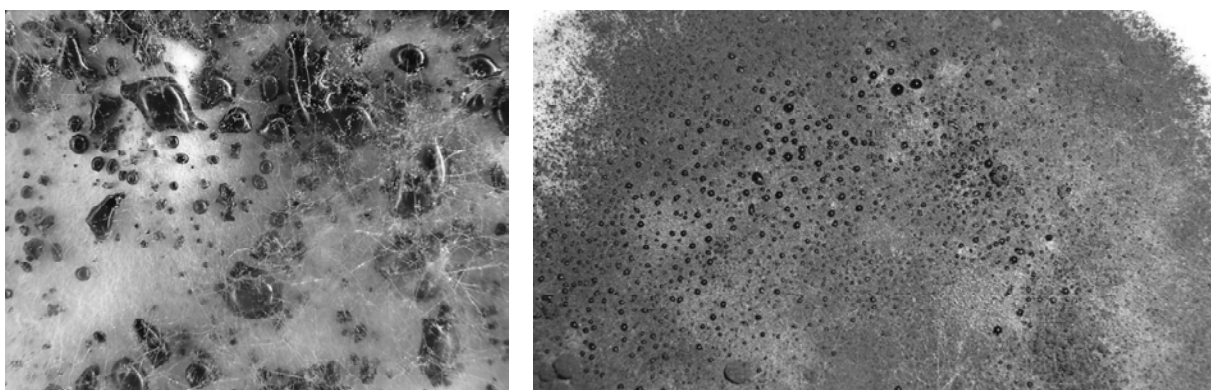
Im Anschluss an die Bestimmung der Pilzarten wurden die Verflüssigungstests in Anlehnung an die durch (SCOTT et al. 1986) beschriebenen Versuche geplant. Zunächst sollte aus dem in der Tabelle 4 zuletzt aufgeführten Sediment eine Reinkultur der Pilze angezogen werden. Hierfür wurden, wie für die Bestimmung, Petrischalen mit Agar ausgegossen und in das noch flüssige Agar das Sediment gebracht. Nachdem ein deutliches Wachstum der Pilze festgestellt werden

konnte, wurde eine Überimpfung der Pilzhyphen auf neue Sabouraud-Glucose-Agar-Platten vorgenommen. Die 20-tägige Bebrütung bei 20°C brachte jedoch nur mäßiges Wachstum. Mehrfaches Wiederholen dieser Überimpfungsversuche brachte keinen Erfolg, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Pilze Inhaltstoffe aus dem Sediment zur Realisierung ihres Stoffwechsels benötigen. Für die weiteren Tests wurden daher Platten verwendet, die mit Agar und Sediment ausgegossen wurden. Nachdem sich hier eine dichte Mycelmatte ausgebildet hatte, wurde feldfrisches bzw. getrocknetes, gemahlenes (< 200 µm) Sediment auf die Hyphen aufgebracht. Schon nach ca. 5 Tagen zeigten sich bei dem kohlehaltigen Sediment aus Plessa erste Verflüssigungsprodukte in Form von kleinen schwarzen Tröpfchen (Abbildung 4 – links feldfrisches Material; rechts getrocknetes, gemahlenes Material).

Anhand der Abbildung wird erkennbar, dass sowohl feldfeuchtes als auch getrocknetes Material verflüssigt wird. Das gleichmäßige Aufmahlen des getrockneten Sedimentes auf eine Korngröße von <200 µm führt zu einer homogeneren Verteilung der Tröpfchen.

Nach 13 Versuchstagen wurden die gebildeten Tröpfchen von den „Plessa-Platten“ abgenommen und einer DOC-Summenanalytik und einer Einzelstoffanalytik zugeführt.

Die DOC-Bestimmung mittels Shimadzu-TOC-Analyzer ergab einen Gehalt an gelöstem organischem Kohlenstoff von 19 g/L. Zudem wurde

**Abb. 4: Verflüssigungsprodukte auf Pilzhyphen.**

festgestellt, dass es sich bei dem Produkt um eine wasserlösliche / wasserverdünnbare Substanz handelt. Für die Einzelstoffanalytik wurde das verflüssigte Produkt in Methanol aufgenommen und extrahiert. Im Chromatogramm wurden deutlich abgegrenzte Peaks erhalten. Hierbei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um aromatische Verbindungen mit einem oder mehreren Ringen (bis zu 4) und anhängenden Ketten, was auf carbonylische und carboxylische Gruppen hindeutet, die als Substrate für sulfatreduzierende Mikroorganismen gelten (Chromatogramme siehe Abbildung 5). In der Abbildung ist vergleichend das Chromatogramm der Methanol-Extraktion von mikrobiell unbeeinflusster Kohle dargestellt, in dem sich die deutlichen Peaks des Verflüssigungsproduktes nicht wiederfinden.

4 Zusammenfassung

Der Pool an organischem Kohlenstoff in Braunkohleabraumkippen ist durch die verbleibende kohlige Substanz und organische Kohlebegleitstoffe sehr hoch, jedoch aufgrund der hohen Molekularität für die Mikroorganismen zumeist unangreifbar und damit nicht zur Energiegewinnung verwertbar. Auf der Grundlage der Kohleverflüssigungsverforschung der Achtziger und Neunziger Jahre wurde untersucht, ob im Kippengebiet Plessa Prozesse zu etablieren sind, die für die Bereitstellung von verfügbaren C-Quellen geeignet sind.

Es konnten im untersuchten Sediment der Kippe Plessa zahlreiche Pilzgattungen in zum Teil sehr hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Die identifizierten und angezogenen autochthonen Schimmelpilze des Plessa-Schurf-Sedimentes (*Mucor hiemalis*) konnten mit den beschriebenen Kohleverflüssigungsversuchen als kohleverwertend eingestuft werden.

Das von den Pilzen produzierte wasserlösliche Verflüssigungsprodukt enthält eine sehr hohe Konzentration an löslichem DOC. Durch HPLC-Einzelstoffanalytik konnten bisher carboxylische und carbonylische Strukturen nachgewiesen werden. Diese sind als Sulfatreduzierer-Substrat bekannt.

5 Danksagung

Wir danken dem BMBF und der LMBV für die Förderung des Forschungsprojektes: „Bedeutung von NA-Prozessen für die Beschaffenheitsentwicklung in Braunkohleabraumkippen“ (FKZ 02WN0505), in dem die beschriebene Arbeiten ausgeführt wurden. Besonderer Dank gilt an dieser Stelle Frau Dr. Bleul vom Labor für Mikrobiologie und Hygiene, Hoyerswerda, die für uns die Pilzidentifikation und die Pilzanzucht realisiert hat.

Herrn André Simon von der TU Bergakademie Freiberg sei für die Herstellung des Schurfes in Plessa und damit für die Gewinnung der Sedimentproben gedankt.

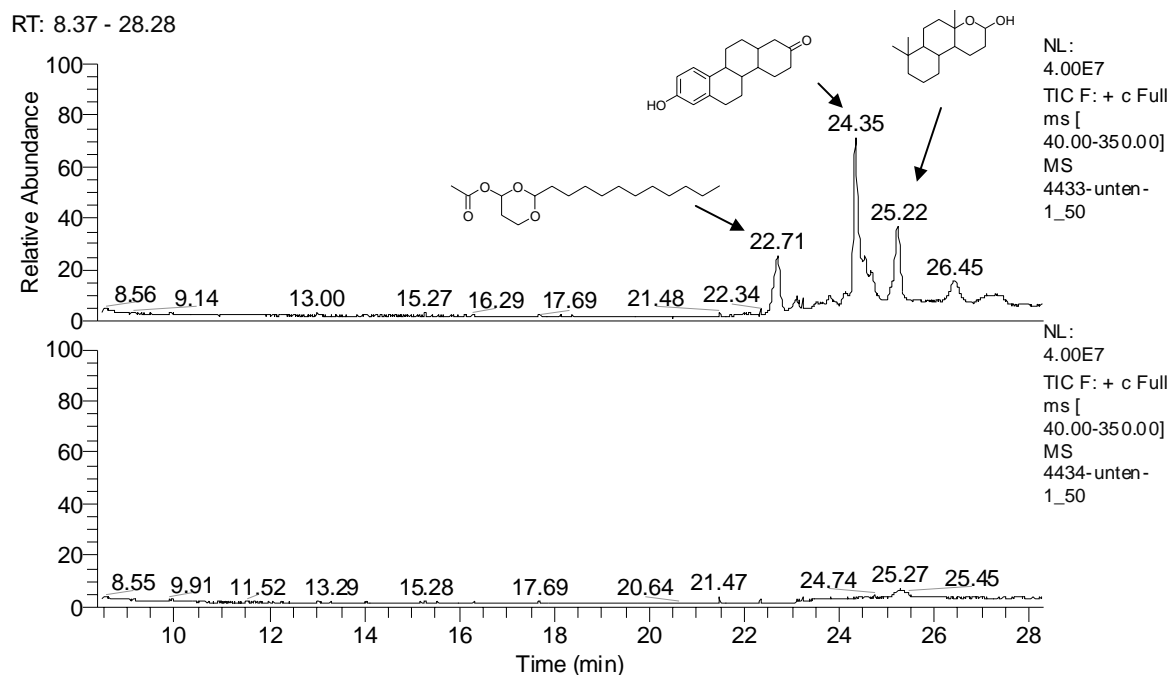


Abb. 5: Chromatogramm Methanol-Extrakte Verflüssigungsprodukt (oben) - Kohle (unten).

6 Literatur

- WIDDEL, F. (1988): Microbiology and Ecology of Sulfate- and Sulfur-reducing Bacteria. - In: ZEHNDER, A. J. (Hrsg.): Biology of anaerobic microorganisms, Wiley and sons New York, 1988
- COHEN, M.S. & GABRIELE, P.D. (1982): Degradation of Coal by the Fungi Polyporus versicolor and Poria monticola. - Applied and Environmental Microbiology, Vol. 44, No. 1
- SCOTT, C.D., STRANDBERG, G.W., LEWIS, S.N. (1986): Microbial Solubilization of Coal. – Biotechnology Processes Vol. 2, No. 3
- FAKOUSSA, R.M. (1992): Mikroorganismen erschließen Kohle-Ressourcen. BioEngineering 4/92
- WARD, B. (1985): Lignite-degrading Fungi Isolated from a Weathered Outcrop. System. Appl. Microbiol. 6
- SIMON, A. & HOTH, N. (2007): KORA-Methodenkatalog. Gelchromatographische Charakterisierung der DOC-Zusammensetzung
- SCHMALZ, L.; ROSSNER, U.; GRUPE S., (2002): Analysis of Alkylphenols in Contaminated Sites by Liquid Chromatography. Vom Wasser Vol. 99.
- TRÖGER, K.; KNÖLLER, K.; STORCH, A.; HOTH, N. (2007): Nachweis reduktiver Prozesse in versauerten Altkippen des Braunkohlebergbaus. 58. BHT 2007, Freiberg.

