

WYKORZYSTANIE PROCESU BIOSOLUBILIZACJI DO POZYSKIWANIA KWASÓW HUMINOWYCH Z LIGNITU

THE USE OF BIOSOLUBILIZATION PROCESS FOR OBTAINING HUMIC ACIDS FROM LIGNITE

Justyna Sobolczyk-Bednarek¹, Anna Choińska-Pulić¹, Wojciech Łaba²

¹„Poltegor-Instytut” Instytut Górnictwa Odkrywkowego, Wrocław

²Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

DOI: 10.5604/01.3001.0055.5950

Streszczenie

Węgiel brunatny jest bogaty w związki organiczne i pierwiastki, a jego surowa lub przetworzona forma może być używana, jako nawóz stymulujący wzrost roślin i poprawiający właściwości gleby, głównie dzięki zawartości substancji humusowych (kwasów huminowych i fulwowych). Konieczna jest jednak modyfikacja węgla, by zwiększyć przyswajalność jego związków, a obróbka mikrobiologiczna jest efektywną i bezpieczną metodą degradacji makromolekularnej sieci węgla do prostszych, wartościowych produktów. Celem badania było przyjazne dla środowiska pozyskanie kwasów huminowych z węgla lignitowego z Kopalni Turów poprzez proces biosolubilizacji z wykorzystaniem wyizolowanego szczepu promieniowca. Z próbek węgla i wody z kopalni wyizolowano 10 szczepów mikroorganizmów zdolnych do rozkładu węgla brunatnego. Do dalszych badań wybrano izolat promieniowca oznaczony numerem 59, który wykazywał najbardziej intensywny wzrost na węglu, którego potencjał biosolubilizacyjny potwierdzono w hodowlach w podłożu płynnym i stałym z dodatkiem węgla brunatnego (wskaźnik humifikacji $E4/E6=6.4$). Uzyskane produkty upłynniania, głównie związki próchnicze (kwasy huminowe), wykazują potencjał do proekologicznego wykorzystania w rolnictwie, na przykład, jako składnik nawozów organiczno-mineralnych.

Słowa kluczowe: biosolubilizacja lignitu, promieniowce, kwasy huminowe, związki próchnicze

Abstract

Lignite is rich in organic compounds and elements, and its raw or processed form can be used as a fertilizer stimulating plant growth and improving soil properties, mainly due to the content of humic substances (humic and fulvic acids). However, modification of the coal is necessary to increase the bioavailability of its compounds, and microbiological processing is an effective and environmentally safe method for the degradation of the coal's macromolecular network into simpler, valuable products. The aim of the study was the environmentally friendly recovery of humic acids from lignite coal sourced from the Turów Mine through a biosolubilization process utilizing an isolated actinomycete strain. Ten strains of microorganisms capable of degrading lignite were isolated from coal and water samples from the mine. The actinomycete isolate numbered 59 was selected for further research, as it showed the most intensive growth on coal. Its biosolubilization potential was confirmed in cultures in both liquid and solid media with added lignite (humification index $E4/E6=6.4$). The resulting liquefaction products, mainly humic compounds (humic acids), show potential for pro-ecological use in agriculture, for example, as a component of organo-mineral fertilizers.

Keywords: lignite biosolubilization, actinomycetes, humic acids, humic compounds

Wprowadzenie

Węgiel brunatny, choć przynosi korzyści gospodarce państwa, wywiera również negatywny wpływ na środowisko naturalne. Jest to głównie rezultat jego spalania w celu pozyskania energii. Inne metody wykorzystania węgla, takie jak np. termiczne upłynnianie, charakteryzują się niestety wysokimi nakładami operacyjnymi i inwestycyjnymi, co czyni je nieatrakcyjnymi ekonomicznie. Z tego powodu, rozwój alternatywnych metod upłynniania węgla jest kluczowy zarówno z punktu widzenia gospodarki, jak i ochrony środowiska [1]. Jedną z obiecujących dróg jest solubilizacja z wykorzystaniem mikroorganizmów, zwana biosolubilizacją. Technologia ta jest uznawana za czystą i opłacalną metodę obróbki węgla, pozwalającą na wydobycie złożonych związków aromatycznych. Związki te mogą być następnie przekształcane w wartościowe produkty (np. wykorzystywane w biotechnologii lub rolnictwie). W świetle negatywnego wpływu spalania na środowisko, rozwój metod alternatywnego zagospodarowania węgla brunatnego, mającego potencjał do proekologicznych zastosowań, jest niezwykle istotny [2].

Węgiel brunatny jest również znany ze swojego korzystnego wpływu na wzrost, rozwój, plonowanie i zdrowotność roślin uprawnych. Jego przydatność, jako środka nawozowego wynika zarówno ze składu substancji organicznej, jak i ze specyficznych właściwości fizycznych. Substancja organiczna w węglu brunatnym jest źródłem makro- i mikroelementów (m.in. wapnia, magnezu, żelaza, siarki, cynku, miedzi, manganu, molibdenu i boru). Dzięki silnie rozwiniętemu układowi porowatemu, surowiec ten ma zdolność do absorpcji wody, dwutlenku węgla i amoniaku. Materia organiczna z węgla brunatnego zwiększa współczynnik wykorzystania składników odżywczych przez rośliny, zwłaszcza potasu, miedzi, manganu, żelaza i sodu, jednocześnie ograniczając ich wymywanie do głębszych warstw gleby i wód gruntowych [3].

Niemniej jednak, modyfikacja węgla brunatnego jest konieczna, ponieważ wysoki stopień spolimeryzowania i skondensowania substancji organicznej ogranicza jego bezpośrednią przyswajalność. Obróbka mikrobiologiczna jest uznawana za efektywną ekonomicznie i bezpieczną dla środowiska metodę przetwarzania węgla. Polega ona na degradacji makromolekularnej sieci węgla do prostszych, niskocząsteczkowych produktów. Proces biouplynniania jest wynikiem złożonej reakcji między węglem, enzymami pochodzenia drobnoustrojowego oraz surfaktantami. Istotną rolę odgrywają również związki alkaliczne, hydrolazy i substancje chelatujące. Przyjmuje się, że grzyby podstawkowe wykorzystują głównie enzymy utleniające, podczas gdy bakterie i pleśnie posługują się chelatorami i związkami alkalicznymi [2, 4].

Węgiel brunatny o strukturze ligninowej, choć jest mało wydajnym źródłem paliwa, stanowi bogate źródło kwasu humusowego, który jest znanym stymulatorem wzrostu roślin [4]. Substancje humusowe (HS), będące głównym produktem biosolubilizacji węgla, stanowią wielocząsteczkowe, heterogeniczne kompleksy o dużej masie cząsteczkowej, w której skład wchodzi kwas huminowy, kwas fulwowy oraz huminy [5, 6]. Właściwości kwasów huminowych są zależne od wartości pH. Kwas huminowy wytrąca się

z kompleksów HS w kwaśnym pH, pozostawiając w roztworze kwas fulwowy [7].

Korzystne właściwości kwasów huminowych opisane w literaturze obejmują: poprawę właściwości fizycznych i wilgotnościowych gleby, wpływ na zawartość pierwiastków śladowych poprzez ich chelatację i reaktywację procesów biochemicznych zachodzących w glebie [8]. Przekształcony w procesie biosolubilizacji węgiel mógłby stanowić cenne źródło materii organicznej.

Celem niniejszego badania było zastosowanie biosolubilizacji umożliwiającej przyjazne dla środowiska wykorzystanie niskokalorycznego węgla brunatnego (lignitu) do efektywnego pozyskiwania kwasów huminowych.

Materiały i metody

Materiały

Próbki węgla brunatnego pobrane zostały na terenie Kopalni Turów. Probki transportowane były do laboratorium w przenośnej lodówce i do momentu użycia przechowywane były w temperaturze 4°C. Probki węgla zostały rozdrobnione do uziarnienia poniżej 0,2 mm, zhomogenizowane, a następnie przechowywano je w stanie powietrznie suchym.

Metody

Podłoża hodowlane i warunki hodowli

W badaniach podstawowym podłożem hodowlanym była pożywka o następującym składzie: YPG: ekstrakt drożdżowy 10,0 g/l, pepton 20,0 g/l, pH 7,1; podłoże mineralne: (NH₄)₂SO₄ 1,0 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,52 g/l, KH₂PO₄ 5,0 g/l, FeSO₄·7H₂O 0,0005 g/l, ZnSO₄ 0,0003 g/l.

Izolację i wstępną identyfikację mikroorganizmów prowadzono na zestalonym podłożu YPG.

Wstępny skrining mikroorganizmów prowadzono na podłożu stałym w postaci węgla brunatnego zwilżanego sterylną wodą.

Hodowle w podłożu stałym prowadzono na płytkach Petriego z podłożem YPG i powierzchniowo rozsypanym węglem w ilości 0,5g/płytke, przez 3 tygodnie w temperaturze 30°C. Produkty rozkładu tego substratu oznaczano spektrofotometrycznie, w tzw. czarnym płynie, uwalnianym w trakcie procesu.

Hodowle płynne prowadzone były w kolbach o pojemności 250cm³, zawierających po 100 ml podłoża hodowlanego (YPG lub podłoża mineralnego) i 5% dodatkiem węgla, zaszczerpione 1 ml inokulum (1 x 10⁸ jtk/ml), które stanowiła 3-dobowa hodowla izolatu 59 w podłożu YPG. Hodowle wstrząsane (170 obr./min) prowadzono przez 3 tygodnie w temperaturze 30°C.

Wzrost izolatu promieniowca oznaczano w podłożu płynnym YPG z dodatkiem węgla (5% w/v). Liczebność mikroorganizmów oznaczano metodą płytkową Kocha na podłożu zestalonym YPG. Węgiel brunatny o wymiarach ziarna około 0,2 mm, sterylizowano w autoklawie w 121°C przez 60 minut i dodawano w ilości 5% w/v. Składniki podłoża rozpuszczano w wodzie dejonizowanej. Podłoża stałe zawierały agar (15 g/l). Wszystkie pożywki sterylizowano w autoklawie w 121°C przez 20 min.

Izolacja i wstępna identyfikacja

Mikroorganizmy izolowano z próbek węgla brunatnego wytrąsanego przez 20 minut w temperaturze 30°C w soli fizjologicznej (NaCl 0,9%), które następnie posiewano powierzchniowo na zestalone podłoże YPG. Płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 7 dni. Uzyskane kolonie pasażowano na czyste podłoża w celu pozyskania czystych kultur. Morfologia kolonii była obserwowana pod mikroskopem (OptaTech) przy powiększeniu 40-krotnym.

Skrining izolatów

Uzyskane szczepy bakterii i promieniowców poddano skriningowi na podłożu stałym w postaci węgla brunatnego zwilżanego sterylną wodą. Hodowle inokulowano 1ml hodowli płynnymi bakterii (1 doba)/promieniowców (3 doby) w podłożu YPG i prowadzono je przez 2 tygodnie w temperaturze 30°C. Mikroorganizm wykazujący zdolność wzrostu w tych warunkach wytypowano do dalszych badań. Wyizolowane szczepy przechowywano na skosach agarowych na podłożu stałym YPG.

Analiza płynu pohodowlanego

W czasie hodowli pobierano płyn pohodowlany, z którego wykonywano posiew na podłoża stałe a następnie wirowano go (5000 obr./min, 15min) i sączone przez bibułę filtracyjną Whatman nr 1. W tak przygotowanej próbce oznaczano obecność produktów biosolubilizacji. Widma spektralne wykonywano w płynie pohodowlanym uzyskanym z ostatniej doby wybranej hodowli oraz w abiotycznej kontroli.

Metody analityczne

Spektrofotometrycznie oznaczano następujące produkty rozkładu węgla brunatnego (produkty biosolubilizacji): przy długości fali 450 nm: kwasy huminowe; przy długości fali 650 nm: kwasy fulwowe [2]. Analizę E4/E6 oznaczono poprzez obliczenie stosunku absorbancji przy długości fali 450 i 650 nm. Produkty biopłynnienia węgla zebrane z hodowli na podłożu stałym i płynnym poddano skanowaniu UV-Vis w zakresie 200-1000 nm. Zdjęcia mikroskopowe wykonywano przy pomocy mikroskopu optycznego OptaTech przy 40x powiększeniu.

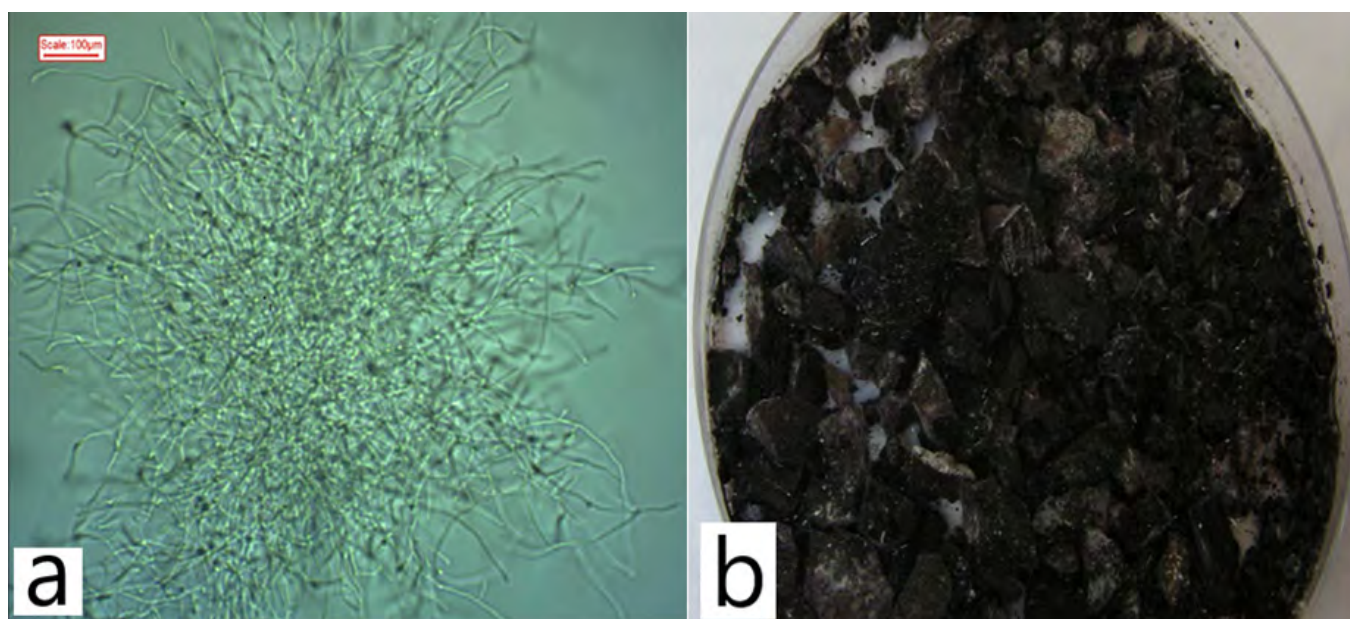
Wyniki

Izolacja i wstępna identyfikacja

Z węgla brunatnego pochodzącego z kopalni Turów oraz z wody wypływającej z tamtejszego złoża wyizolowano 3 szczepy bakterii i 7 szczepów promieniowców. Wstępna identyfikacja izolatów, opis cech morfologicznych komórek oraz wygląd tworzonych przez nie kolonii przedstawiony jest w Tabeli 1. Wszystkie badane mikroorganizmy rosły w podłożu mineralnym, w którym jedynym źródłem węgla był węgiel brunatny, co wskazywało na ich uzdolnienia w kierunku rozkładu tego substratu. W dalszym etapie badań przeprowadzono hodowle 10 szczepów na węglu brunatnym, bez dodatkowej suplementacji składnikami odżywczymi. Jedynym szczepem zdolnym do wzrostu w tych warunkach był izolat promieniowca 59 (Rys. 1) i dlatego wybrano go do dalszych badań obejmujących hodowlę w podłożu zestalonym i płynnym (mineralnym i YPG) z dodatkiem węgla.

Tab. 1. Izolacja i wstępna identyfikacja szczepów uzyskanych z węgla brunatnego i z wody wypływającej ze złoża zlokalizowanego w kopalni Turów
Tab. 1. Isolation and preliminary identification of strains obtained from lignite and from water flowing from the deposit located in the Turów mine

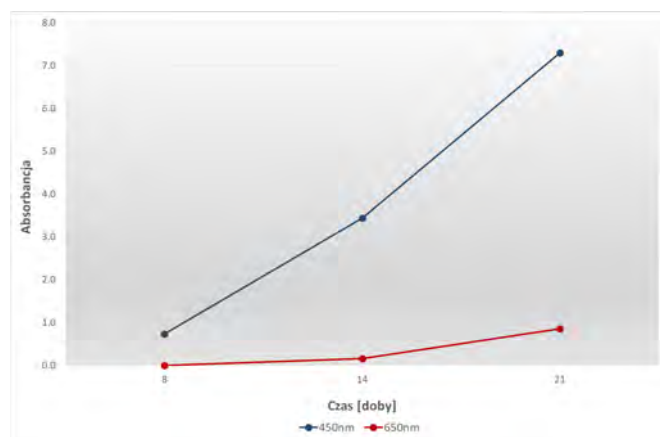
Nr szczepu	Typ	Pochodzenie izolatu	Morfologia komórek
52	Bakterie	Węgiel	ruchliwe, kuliste
53	Bakterie	Woda	ruchliwe, elipsoidalne
54	Promieniowce	Węgiel	rozgałęzione, wydłużone komórki
55	Promieniowce	Węgiel	rozgałęzione, wydłużone komórki, kuliste konidia
56	Promieniowce	Węgiel	rozgałęzione, wydłużone komórki, wydłużone, elipsoidalne konidia
57	Promieniowce	Woda	ruchliwe, kuliste
58	Bakterie	Woda	ruchliwe, kuliste
59	Promieniowce	Węgiel	rozgałęzione, wydłużone komórki, kuliste konidia
60	Promieniowce	Węgiel	rozgałęzione, wydłużone komórki
61	Promieniowce	Węgiel	rozgałęzione, wydłużone komórki, kuliste konidia



Rys. 1. Obraz mikroskopowy przy powiększeniu 40x (a) oraz zdjęcie hodowli izolatu promieniowca 59 (b) na podłożu stałym w postaci surowego węgla brunatnego
Fig. 1. Microscopic image at 40x (a) magnification and a photograph of a culture of actinomycete isolate 59 (b) on a solid medium in the form of raw brown coal

Hodowle w podłożu stałym z dodatkiem węgla brunatnego

Potencjał biosolubilizacyjny izolatu promieniowca 59 potwierdziły czarne krople cieczy (ang. black liquid) obecne na powierzchni sproszkowanego węgla. Wyniki biosolubilizacji węgla brunatnego widoczne były po dwóch tygodniach hodowli, kiedy w czarnym płynie oznaczono pośrednio duże zawartości produktów rozkładu węgla: kwasy huminowe przy długości fali $\lambda_{450}=3,4$ i kwasy fulwowe przy długości fali $\lambda_{650}=0,16$ (Rys. 2). W 21 dobie ilość kwasów huminowych wzrosła dwukrotnie, a kwasów fulwowych pięciokrotnie. Obecność tych produktów stanowi potwierdzenie uzdolnień badanego szczepu promieniowca w kierunku biosolubilizacji węgla brunatnego [7].



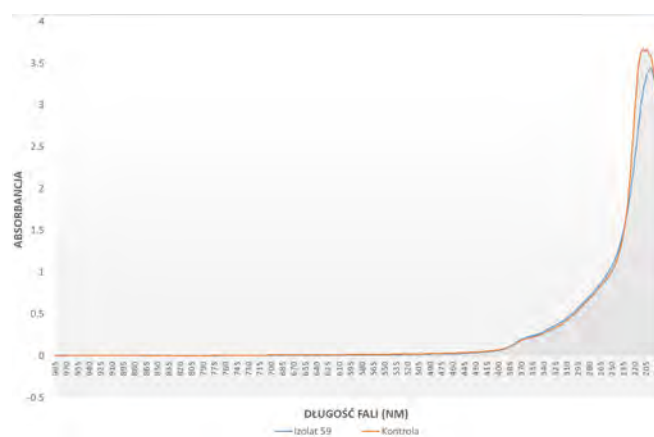
Rys. 2. Produkty biosolubilizacji uzyskane w hodowli izolatu promieniowca 59 na podłożu stałym z dodatkiem węgla (black liquid)

Fig. 2. Biosolubilization products obtained in the cultivation of actinomycete isolate 59 on a solid medium with the addition of carbon (black liquid)

Hodowle w podłożu mineralnym z dodatkiem węgla

Spektroskopia w zakresie ultrafioletu i widzialnym (UV/Vis) umożliwia detekcję biosolubilizacji węgla w czasie rzeczywistym w wodnych środowiskach reakcji

[10, 11]. Produkty biouplynnienia węgla zebrano i poddano skanowaniu UV-Vis w zakresie 200–1000 nm. Uzyskane widma wskazują na brak postępu procesu biosolubilizacji w hodowli izolatu 59 w podłożu mineralnym z dodatkiem węgla, gdzie uzyskana seria danych pokrywa się z wynikami uzyskanymi w abiotycznej kontroli (Rys. 3). Prawdopodobnie efekt ten wynika z braku łatwo dostępnych źródeł węgla i azotu w podłożu hodowlanym, które okazały się niezbędne do zainicjowania procesu biosolubilizacji węgla.



Rys. 3. Widma UV/Vis uzyskane z hodowli izolatu 59 w podłożu mineralnym z dodatkiem węgla oraz abiotycznej kontroli

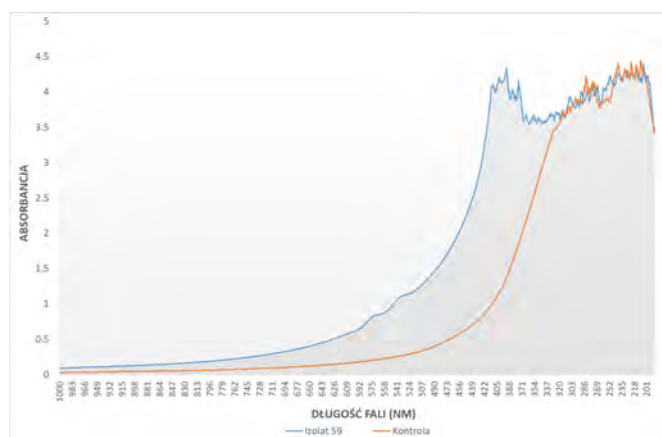
Fig. 3. UV/Vis spectra obtained from the cultivation of 59 isolate in mineral medium with added carbon and abiotic control

Hodowla w podłożu YPG z dodatkiem węgla

Widma UV/Vis produktów biosolubilizacji

W kolejnym etapie badań zastosowano w hodowli badanego szczepu promieniowca podłoże płynne pełne (YPG) z dodatkiem węgla. Uzyskane produkty biosolubilizacji λ_{max} w zakresie 200–250 nm oraz 380–440 nm natomiast abiotyczna kontrola wykazywała λ_{max} w zakresie 220–250 nm oraz 300–320 nm (Rys. 4). W pracy Shi i wsp. (2013)

[11] przedstawiono porównanie widma UV/Vis kwasu huminowego i węgla biosolubilizowanego. Zaobserwowano, że miały one podobny układ w odniesieniu do długości fal UV/Vis. Ich absorbancja UV/Vis najpierw wzrosła i osiągnęła szczyty przy około 230 nm, a następnie spadła przy wyższych długościach fali. Silna absorbancja w zakresie 210–250 nm i 250–300 nm wskazywała, że kwas huminowy i węgiel biosolubilizowany zawierały sprzężone wiązania podwójne i struktury pierścieni aromatycznych. Podobne wartości uzyskano dla produktu biosolubilizacji węgla przy udziale izolatu promieniowca 59 i w niezaszczepianej kontroli. Te podobne tendencje wskazują, że kwas huminowy i węgiel biosolubilizowany mają podobne struktury chemiczne. Natomiast według Shin i wsp. (1995) [12] najlepsza długość fali, dla pomiaru produktów biosolubilizacji powinna mieścić się w zakresie od 400 do 500 nm (optymalna 450 nm). Produkty biosolubilizacji w tym zakresie uzyskano tylko w przypadku próby biosolubilizowanej, natomiast w abiotycznej kontroli absorbancja przy tym zakresie długości fal była bardzo niska.



Rys. 4. Widma UV/Vis hodowli izolatu 59 w podłożu YPG z dodatkiem węgla oraz abiotycznej kontroli

Fig. 4. UV/Vis spectra of 59 isolate culture in YPG medium with carbon supplementation and abiotic control

Uwalnianie kwasów huminowych ($\lambda = 450 \text{ nm}$) i fulwowych ($\lambda = 650 \text{ nm}$)

Zbadano zależności między absorbancją przy 450 nm i przy 650 nm, które są szeroko stosowane w literaturze do wykrywania produktów biosolubilizacji węgla. Stosunek E4/E6 jest znany, jako wskaźnik humifikacji. W tabeli 2 zestawiono stosunek kwasów huminowych do kwasów fulwowych, których to wartość wzrasta wraz z obniżaniem się masy molowej, zawartości skondensowanych pierścieni aromatycznych oraz wraz ze wzrostem zawartości tlenu [13]. W prowadzonym doświadczeniu stosunek omawianych kwasów w hodowli inokulowanej badanym szczepem wzrastał wraz z postępem procesu, uzyskując wartości od 2,4 do 6,8. W szacunkach spektroskopowych przedstawionych w pracy Li i wsp. (2021) [14] wskaźnik humifikacji był również wyższy dla produktów biosolubilizacji lignitu (E4/E6=6) przy udziale szczepu grzyba *Penicillium ortum* MJ51 (CFF) w porównaniu z abiotyczną kontrolą. Ponadto Rehman i wsp. (2022) [7] w swojej pracy opisującej proces biosolubilizacji węgla z udziałem szczepu grzyba wykazał,

że dla próbki B-1 indeks humifikacji wynosił A4/A6=6,18 i był wyższy, niż wartość A4/A6 =4,27 uzyskana dla dostępnego komercyjnie standardowego kwasu huminowego. Wskazywało to na zmniejszenie masy cząsteczkowej i aromatyczności oraz wzrost bioaktywności grzybowych produktów solubilizowanych. Wynik ten, podobnie jak w przypadku badań własnych, wskazuje na to, że wybrany czynnik biologiczny atakuje strukturę aromatyczną węgla i zmniejsza masę cząsteczkową kwasów huminowych.

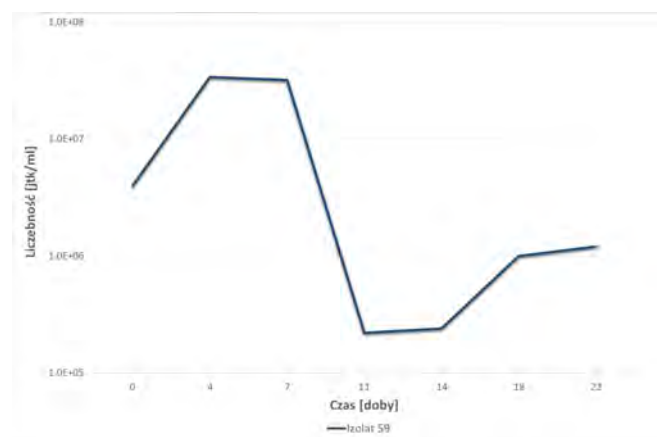
Tab. 2. Zestawienie stosunku absorbancji kwasów huminowych do kwasów fulwowych (E4/E6)

Tab. 2. Summary of the absorbance ratio of humic acids to fulvic acids (E4/E6)

Doby	Izolat 59	Kontrola
4	2,4	2,4
7	2,4	3,9
11	6,8	4,2
14	5,7	1,1
18	5,5	4,6
22	6,4	2,9

Wzrost izolatu promieniowca w podłożu płynnym YPG z dodatkiem węgla

Wyjściowo liczebność izolatu promieniowca wynosiła 4×10^6 jtk/ml, a w kolejnych czterech dobach wzrosła o rząd logarytmiczny (Rys. 5). Od doby 7 ilość mikroorganizmów obniżyła się o dwa rzędy logarytmiczne. W pierwszym etapie hodowli mikroorganizmy wykorzystywały składniki odżywcze dostępne w podłożu YPG, co powodowało intensywny ich wzrost. W kolejnych dobach nie następował wzrost, co mogło być związane z wydzielaniem alkalicznych metabolitów, prowadzących rozkład związków węgla brunatnego, co pokryło się ze wzrostem wskaźnika humifikacji odnotowanym w 11 dobie (Tab. 2).



Rys. 5. Populacja promieniowców w hodowli YPG z dodatkiem węgla

Fig. 5. Population of actinomycetes in YPG culture with added carbon

Podsumowanie

Przeprowadzone badania potwierdziły uzdolnienia izolatu promieniowca 59 w kierunku biosolubilizacji węgla brunatnego. Podłoże mineralne z dodatkiem węgla okazało się zbyt deficytowe aby doszło do zainicjowania procesu biosolubilizacji, natomiast proces ten zachodził bardzo efektywnie w podłożu pełnym (YPG) (E4/E6=6,4).

Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań w zakresie biosolubilizacji węgla, które powinny obejmować: dobór optymalnego podłoża do hodowli drobnoustrojów, powiększenie skali procesu (np. w bioreaktorach) oraz prowadzenie go w warunkach hodowli solid-state,

z dodatkiem surowców odpadowych. Produkty upłynniania lignitu, w tym głównie związki próchnicze, mogą znaleźć zastosowanie w rolnictwie. Węgiel brunatny poddany obróbce mikrobiologicznej może być wykorzystany jako składnik nawozów organiczno-mineralnych.

Literatura

- [1] Shi, K., Tao, X., Yin, S., Du, Y., Lv, Z. 2009. *Bio-liquefaction of Fushun lignite: characterization of newly isolated lignite liquefying fungus and liquefaction products*. Procedia Earth and Planetary Science, 1, 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.proeps.2009.09.099>
- [2] Sas Paszt, L., Głuszek, S., Grzyb, Z. S. 2013. Instytut Ogrodnictwa. EkoTechProdukt Newsletter, 16.
- [3] Miszkiewicz, H., Bielecki, S., Kadłubowski, S. 2016. *Biouplynnianie polskiego chemicznie utlenionego węgla brunatnego*. Inżynieria i Ochrona Środowiska, 19(1), 97–108. <https://doi.org/10.17512/ios.2016.1.8>
- [4] Jiang, F., Zhaohu, Li., Zhiwei, Lv., Tongguo, G., Jinshui, Y., Zhaohai, Q., Hongli, Y. 2013. *The biosolubilization of lignite by Bacillus sp. Y7 and characterization of the soluble products*. Fuel, 103, 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.08.030>
- [5] Akimbekov, N., Digel, I., Abdieva, G., Ualieva, P., Tastambek, K. 2021. *Lignite biosolubilization and bioconversion by Bacillus sp.: the collation of analytical data*. Biofuels, 12(3), 247–258. <https://doi.org/10.1080/17597269.2020.1753936>
- [6] Klučáková, M. 2018. *Conductometric study of the dissociation behavior of humic and fulvic acids*. Reactive and Functional Polymers, 128, 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.04.017>
- [7] Rehman, M., Akhtar, K., Khan, A.N., Tahir, M.A., Khaliq, S., Akhtar, N., Ragauskas, A.J. 2022. *Bioconversion and quantification of humic substances from low rank coals using indigenous fungal isolates*. Journal of Cleaner Production, 376. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134102>
- [8] Balasubramanian, A. 2016. *Biosolubilization of lignite by marine soil microbes*. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, 3(1), 38–46. <http://s-o-i.org/1.15/ijarbs-2016-3-1-6>
- [9] Romanowska, I., Strzelecki, B., Bielecki, S. 2015. *Biosolubilization of Polish Brown coal by Gordonina alkanivorans S7 and Bacillus mycoides NS1020*. Fuel Processing Technology, 131, 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2014.12.019>
- [10] Laborda, F., Fernández, M., Luna, N., and Monistrol, I. F. 1997. *Study of the mechanisms by which microorganisms solubilize and/or liquefy Spanish coals*. Fuel Processing Technology, 52, 95–107. [https://doi.org/10.1016/S0378-3820\(97\)00019-2](https://doi.org/10.1016/S0378-3820(97)00019-2)
- [11] Shi, Kai-yi & Yin, S. & Tao, X. & Du, Ying & He, Huan & Lv, Zuopeng & Xu, Ning. 2013. *Quantitative Measurement of Coal Bio-solubilization by Ultraviolet-visible Spectroscopy*. Energy Sources. 35. <https://doi.org/10.1080/15567036.2010.521800>
- [12] Shin, H.-J., Lee, H.-H., and Yang, J.-W. 1995. *Quantitative assay of biosolubilized coal by UV-spectrophotometry*. Biotechnology Techniques, 9, 329–332. <https://doi.org/10.1007/BF00638865>
- [13] Ghani, M. J., Akhtar, K., Khaliq, S., Akhtar, N., Ghauri, M. A. 2021. *Characterization of humic acids produced from fungal liquefaction of low-grade Thar coal*. Process Biochemistry, 107, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.003>
- [14] Li, S., Tan, J., Wang, Y., Li, P., Hu, D., Shi, Q., Yue, Y., Li, F., Han, Y. 2021. *Extraction optimization and quality evaluation of humic acids from lignite using the cell-free filtrate of Penicillium ortum MJ51*. RSC Advances, 12(1), 528–539. <https://doi.org/10.1039/d1ra08019a>