1 Úvod

Předkládaná diplomová práce se zabývá bakteriální aktivitou v geologických materiálech. Tématicky jsou v práci zastoupeny dvě oblasti. V první je vysvětlena problematika kontaminace geologických materiálů způsobená těžbou horninového materiálu obsahujícího sulfidické polohy, podíl bakteriální aktivity na této kontaminaci a popis zájmových lokalit.

Druhá oblast je praktická. Podává přehled o postupu analýz vzorků vod a půd z okolí těžených ložisek na lokalitách Okrouhlá Radouň, Zadní Chodov, Vítkov a Zlaté Hory. Popisuje testování vzorků na přítomnost železo a/nebo síru oxidujících bakterií a výsledky těchto analýz. Použity byly metody kultivace na tekutých a tuhých živných médiích a barvení dle Gramma s následnou mikroskopickou identifikací. U vybraných vzorků byla sledována rychlost biooxidace železa.

Geologické materiály spojené s hornickou činností jako jsou vlastní rudniny, důlní vody, kaly po extrahování rud a geologické materiály používané pro ukládání nebezpečných odpadů podléhají v povrchových podmínkách rozkladu. Jedním z důležitých faktorů, který ovlivňuje nestabilitu a rychlost jejich transformace je aktivita bakterií, která tyto procesy mnohonásobně urychluje. Během rozkladu sulfidických poloh dochází k uvolňování rizikových složek, jako jsou například těžké kovy, do přírodního prostředí.

Cílem diplomové práce je podat souhrnný přehled o bakteriální aktivitě v geologických substrátech a popis mechanismu jejich působení. Terénní a experimentální část práce se má týkat identifikace a hodnocením aktivity bakterií ve vybraných vzorcích geologických materiálů.

2 Přehled literárních údajů

2.1 Geologický materiál

Hlavním využitím geologického materiálu je těžební činnost. Během ní dochází k odhalení rudnin atmosférickým podmínkám, k přemístění rudniny za účelem zpracování a na konec k jejímu uložení v podobě odpadů. Tyto procesy mají za následek formování druhotných jevů, například kyselých důlních vod.

Nerosty, které představují hospodářsky hodnotné rudy, jsou v místě svého přirozeného výskytu chemicky stálé. Po jejich vyhloubení a vystavení atmosférickým podmínkám se stávají nestabilními a dochází k chemickému zvětrávání. Chemické zvětrávání představuje řadu geochemických a mikrobiologických reakcí, při kterých dochází k uvolňování kontaminantů z rud a důlních odpadů. V případě zvětrávání zájmových sulfidických minerálů je rizikovým uvolňování těžkých kovů. Po kontaktu s vodou se tyto produkty zvětrávání dostávají do hydrologického cyklu, kde se stávají mobilními a tak toxickými i širšímu okolí, nejen oblastem postižených těžební a zpracovatelskou činností.

2.1.1 Vliv těžby a zpracování geologického materiálu na kvalitu vod a půd

Voda obecně patří k nejzranitelnějším a také k nejvíce ovlivněným složkám životního prostředí po těžbě a zpracování nerostných surovin.

Povrchové vody jsou nejvíce ovlivňovány vodami důlními, a to v závislosti na existenci a účinnosti jejich čištění před vypouštěním. Okysličené povrchové i podzemní vody prosakují do dolu a urychlují zvětrávání zejména sulfidů a dalších minerálů ložisek a okolních hornin. Důlní vody se tak stávají kyselými, síranovými, značně mineralizovanými, s vysokým obsahem železa. Na většině rudných ložisek obsahují i významná množství těžkých kovů a dalších prvků, zvláště arzenu. Uran a radium jsou pak typickými kontaminanty z uranových ložisek.

Podzemní vody jsou kontaminovány průsaky z odvalů a především pak z odkališť. Průsakové technologické i atmosférické vody obsahují kovy, flotační činidla a další chemické a rozpuštěné látky závislé na složení těžených a upravovaných rud, které při spojení s podzemními vodami většinou negativně ovlivní jejich kvalitu.

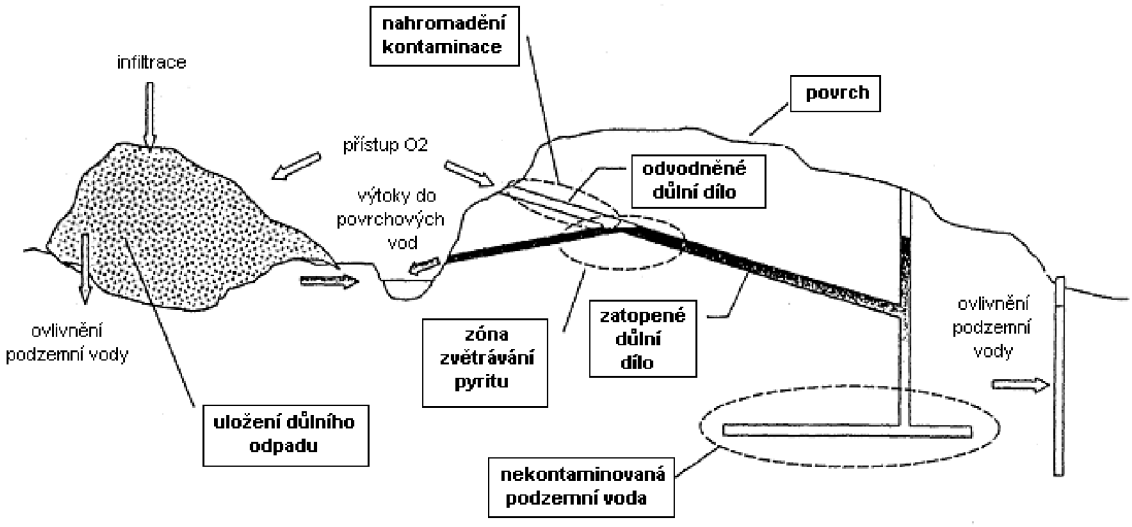
Ovlivnění půdy v důsledku hornické činnosti představuje především zábor zemědělské a lesní půdy spojené se zpřístupněním ložiska a výstavbou těžebních a úpravárenských kapacit, zakládáním odvalů či výsypek a odkališť. Kromě vlastního záboru zemědělské a lesní půdy

docházelo též částečně k její degradaci v důsledku emisí a různých kontaminací v provozních areálech i mimo ně. Příkladem jsou úniky různých technologických roztoků, spad prachu v okolí odkališť a dopravních tras nebo průsaky znečištěných povrchových vod z odvalů či odkališť. Kontaminaci půd, stejně jako podzemních vod, způsobuje například oxidace sulfidů, zvláště pyritu, pyrhotinu a arsenopyritu. Odvaly dolů uranových bývají pak obvykle zdrojem zvýšeného obsahu uranu, radia a ve vodách a ovzduší pak radonu. (zpracováno podle Kafka et al. 2003)

2.1.2 Zájmový materiál

Hlavní zájmovou oblastí této práce je horninový materiál, který obsahuje v menší či větší míře sulfidické polohy. Obecně jsou sulfidické minerály poměrně hojné, nejrozšířenějším sulfidickým minerálem doprovázející výskyty jiných žádaných materiálů je pyrit.

Na mnoha lokalitách s důlní činností tvoří sulfidy minoritní část z celkového množství těženého materiálu. I toto malé množství sulfidů znamená pro životní prostředí velkou zátěž, jejíž degradace trvá desetiletí až století.



Obr. 1 Schématické znázornění důlní činnosti znázorňující zdroje kontaminace a transportní cesty (Younger et al. 2002).

Na obr. 1 je znázorněn příklad těžební činnosti. Z důvodu zamezení přístupu kyslíku se důlní díla, po skončení těžební činnosti, zatápí vodou. Zatopení vodou však pouze zpomalí oxidaci, protože i ve vodě je kyslík rozpuštěný. Důlní vody nebo úložiště mohou obsahovat Fe^{3+}, který jako silný oxidant může další oxidaci materiálu urychlit. Voda ze zatopených děl může pak unikat a kontaminovat další vody a okolní půdu. Totéž platí i pro kontakt produktů

zvětrávání, které se uvolňují na úložišti důlního odpadu, se srážkovou vodou. Při kontaktu dojde k jejímu průchodu přes úložiště, dle doby setrvání se obohatí o produkty zvětrávání a následně může kontaminovat i podzemní vodu a samozřejmě půdu.

2.1.3 Vznik kontaminovaných vod

Vznik kontaminovaných vod souvisí s typem odpadů produkovaných těžební činností. Existují dva základní druhy důlních odpadů. Prvním z nich je skrývka, která byla jen přemístěna při povrchové těžbě a uložena na haldách, ale neprošla úpravárenskými procesy. Při hlubinné těžbě se stejný typ odpadů nazývá hlušina.

Dalším druhem důlních odpadů jsou úpravárenské odpady, které jsou produktem extrakce užitkové rudy flotací, aplikací kyanidů nebo jinou úpravárenskou technikou.

Zvláštním případem jsou kyselé důlní vody čerpané z dolů, kde k oxidaci sulfidů došlo při snížení hladiny podzemní vody spojeném s osušováním ložiska (Grmela 1995).

Mechanismus oxidace sulfidů je u všech těchto případů stejný, jen způsob transportu kyslíku se může lišit.

Procesem produkujícím kyselost je oxidace sulfidů jako je např. pyrit FeS_2. Ta má několik etap (obr. 2) (Stumm a Morgan 1996). Pyrit je nejprve oxidován atmosférickým kyslíkem za přítomnosti vody

$$FeS_2 + 7/2\ O_2 + H_2O \leftrightarrow Fe^{2+} + 2\ SO_4^{2-} + 2\ H^+$$

Dvojmocné železo je pak oxidováno na trojmocné

$$Fe^{2+} + ¼\ O_2 + H^+ \leftrightarrow Fe^{3+} + ½\ H_2O$$

Tato reakce je relativně rychlá při neutrálních hodnotách pH a zpomalí se, když pH poklesne. Její průběh však může být urychlen působením bakterií. Při pH > 3,0 pak dochází k vysrážení $Fe(OH)_3$

$$Fe^{3+} + 3\ H_2O \leftrightarrow Fe(OH)_3 + 3\ H^+$$

Oranžové povlaky tvořené $Fe(OH)_3$ je možno vidět v povrchových tocích drénujících důlní odpady. V případě, že hodnota pH je nižší než 3,0 se $Fe(OH)_3$ nevysráží a Fe^{3+} jako silný oxidant oxiduje další pyrit

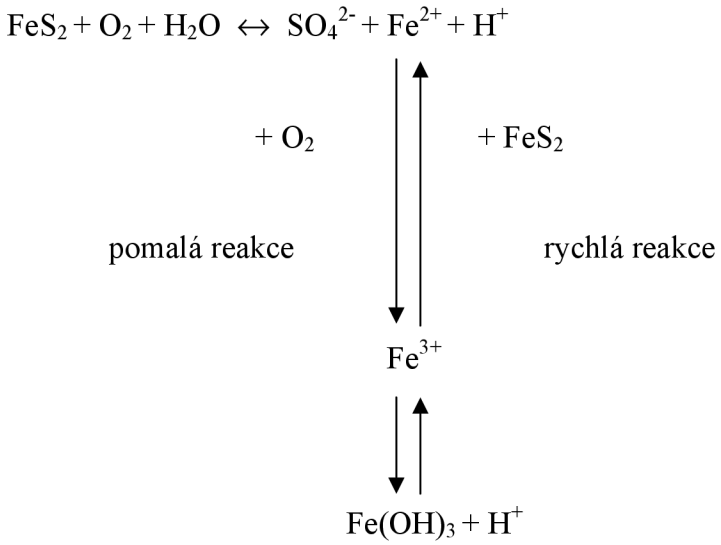
$$FeS_2 + 14\ Fe^{3+} + 8\ H_2O \leftrightarrow 15\ Fe^{2+} + 2\ SO_4^{2-} + 16\ H^+$$

Z této rovnice je patrné, že i když zamezíme přístupu kyslíku do důlních odpadů, které obsahují vysokou koncentraci Fe^{3+} v pórové vodě, bude po dlouhou dobu stále docházet k oxidaci pyritu.

Vysrážení $Fe(OH)_3$ produkuje značné množství acidity (1 mol vysráženého $Fe(OH)_3$ 3 moly H^+), což znamená, že i voda s neutrálním pH a s vysokou koncentrací Fe^{2+}, způsobí později okyselení povrchových toků. V případě oxidace Fe^{2+} spojené s vysrážením $Fe(OH)_3$ platí rovnice

$$Fe^{2+} + ¼\ O_2 + 5/2\ H_2O \leftrightarrow Fe(OH)_3 + 2\ H^+$$

Nejpomalejším krokem při oxidaci pyritu je oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+}, která je limitujícím faktorem celého procesu. Jak již bylo uvedeno, může být katalyzována bakteriemi a tak některé metody prevence formování kyselých vod jsou založeny na aplikaci baktericidů v důlních odpadech (Kleinmann et al. 1981).(zpracováno podle Šráček et al. 2002)



Obr. 2 Mechanismus oxidace pyritu. Upraveno podle Stumm a Morgan (1996). Stechiometricky vyrovnané rovnice jsou v textu.

Zvětrávání ostatních sulfidů nemusí produkovat kyselost, ale budou se během něj uvolňovat kovové iony do roztoku.

Kyselost uvolněná během zvětrávání pyritu do roztoku způsobí pokles pH. Kritickým aspektem odhadu kontaminace důlních vod je, že rozpustnost a tedy pohyblivost a biodostupnost kovových ionů je silně závislá na pH. Všeobecně rozpustnost u kovových ionů stoupá s poklesem pH. (zpracováno podle Younger et al. 2002)

2.2 Bakteriální aktivita v materiálech produkovaných těžební činností

Mezi zájmové bakterie, které se podílejí na rozkladu geologického materiálu obsahujícího sulfidické polohy, jsou ty, které zodpovídají za produkci trojmocného železa a kyseliny sírové. Jsou to ty typy bakterií, které primárně oxidují sulfidy přítomné v horninách a dalších substrátech a tak uvolňují rizikové složky do prostředí. Jejich dalším negativním působením je to, že obnovují oxidační schopnost Fe^{3+}. Fe^{3+} je v přírodním prostředí druhým nejvýznamnějším oxidantem po atmosférickém a rozpuštěném kyslíku. Při oxidačním působení železa samo přechází na Fe^{2+}. Železo oxidující bakterie působí negativně tím, že jsou schopny i v kyselém prostředí rychle oxidovat vzniklé Fe^{2+} na Fe^{3+} a tím znovu obnovit jeho oxidační sílu. Dalším negativním důsledkem je, že při všech těchto reakcích způsobují bakterie silné okyselení prostředí a tak zvyšují migrační schopnost rizikových složek.

2.2.1 Druhy bakterií

Bakterií se schopností oxidovat železo a/nebo sirné sloučeniny je uváděno více druhů. Pro přehled jsou uvedeny v tab. 1. Bakterie jsou zde rozděleny podle složek, které oxidují a podle jejich teplotního optima.

Tab. 1 Přehled bakterií a archaebakterií oxidující sulfidické minerály (Johnson 2003).

	Oxidující železo	**Oxidující železo/síru**	**Oxidující síru**
Mesofilní	*Leptospirillum ferrooxidans* *Ferroplasma spp.* *„Ferrimicrobium acidophilum“*	*Acidithiobacillus ferrooxidans* *Thiobacillus prosperus* *„Sulfobacillus montserratensis“*	*Acidithiobacillus thiooxidans* *Thiomonas cuprina*
Mírně termofilní	*Acidimicrobium ferrooxidans* *Leptospirillum thermoferrooxidans*	*Sulfobacillus Thernosulfidooxidans* *Sulfobacillus acidophillus*	*Acidithiobacillus caldus*
Termofilní		*Acidianus spp.* *Sulfolobus matallicus* *Sulfurococcus yellowstonensis*	*Matallosphaera spp.*

Mezi zájmové druhy patří acidofilní bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* a *Leptospirillum ferrooxidans*. Všechny tyto druhy preferují kyselé podmínky, které jsou příznačné pro oblasti postižené těžbou horninového materiálu obsahujícího sulfidické minerály. Jsou to železité a/nebo sirné chemolithotrofní bakterie.

Bakterie jsou aerobní, pro optimální růst a vysokou aktivitu při oxidačních procesech je důležité dostatečné zásobování kyslíkem. Tyto autotrofní organismy fixují vzdušný CO_2 (Nagpal et al. 1993). Na rozdíl od většiny autotrofních organismů nevyužívají jako zdroj energie světelné záření, ale získávají energii z chemických sloučenin právě oxidací dvojmocného železa a/nebo sloučenin síry.

Acidithiobacillus ferrooxidans oxiduje jak sloučeniny síry tak i dvojmocné železo. Žije v prostředí o pH 0,5 - 6,0, její pH optimum je 2,0 – 2,5 při růstu na Fe^{2+} a okolo 4 při růst na redukovaných sirných sloučeninách (Rawlings 1997). Dále vykazuje aktivitu při teplotách 20 – 40°C. Teplotní optimum je 28 - 35°C (teplotní optimum je závislé na pH, s poklesem pH je patrný i pokles teplotního optima) (Barrett et al. 1993).

Acidithiobacillus thiooxidans se velmi podobá *At. ferrooxidans*, ale není schopen oxidovat železnaté ionty. Energii získává pouze oxidací redukovaných sloučenin síry. Je mezofilní bakterií s teplotním optimem pro růst 35 °C a je tolerantnější ke kyselejšímu prostředí (pH 0,05 – 5,5) (Rawlings 2002).

Leptospirillum ferrooxidans oxiduje dvojmocné železo a je snadno odlišitelný od tyčkovitého *At. ferrooxidans* spirálovitým tvarem.

2.2.2 Mechanismus biooxidace sulfidických minerálů

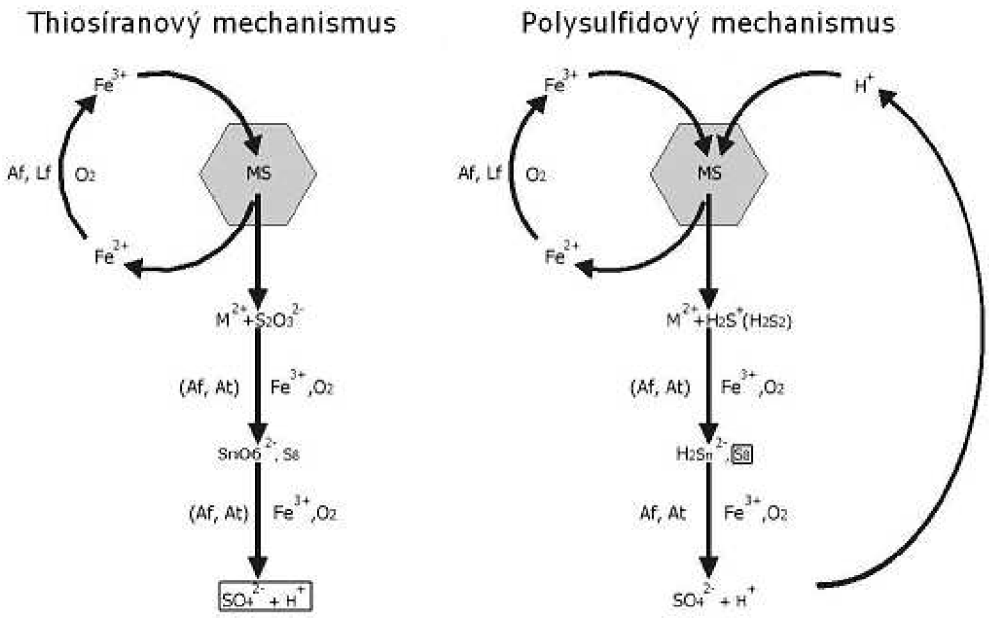
Obecně lze mechanismus oxidace sulfidů popsat již uvedenou rovnicí

$$FeS_2 + 8\ H_2O + 14\ Fe^{3+} \rightarrow 15\ Fe^{2+} + 2\ SO_4^{2-} + 16\ H^+$$

Dochází k působení Fe^{3+} na sulfidické minerály za vzniku rozpustných sulfátů a Fe^{2+}. Bakterie schopné oxidovat železo využívají vzniklé Fe^{2+} jako donor elektronů a dochází k jeho reoxidaci na Fe^{3+}, čímž dochází k obnově reaktantu.

Obr. 3 *Acidithiobacillus ferrooxidans* zvětšen 30 000 krát – vnitřní struktura (Ehrlich 1990).

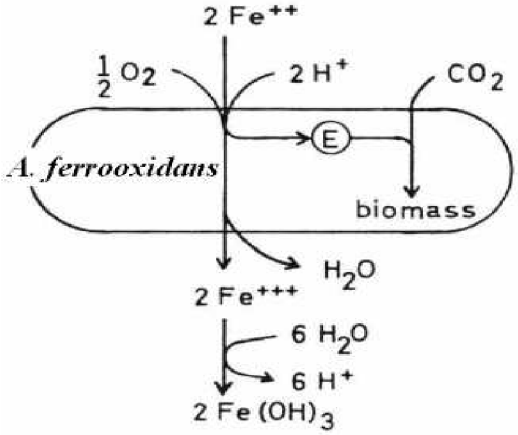
Lze se setkat i s případem, kdy jsou pro oxidaci sulfidů navrhovány dva mechanismy. Pro oba mechanismy je společně, že jako primární oxidant je využito Fe^{3+}, které vzniklo biooxidací Fe^{2+}. Další fáze se liší meziprodukty a rozlišujeme tedy proto mechanismus thiosíranový a polysulfidový. Jejich schématický průběh je znázorněn na obr. 4. Na obrázku je také vyznačeno, v které fázi jsou zapojeny jaké druhy bakterií. Konečným produktem je až kyselina sírová.



Af - *Acidithiobacillus ferrooxidans*, At - *Acidithiobacillus thiooxidans*, Lf - *Leptospirillum ferrooxidans*

Obr. 4 Schéma thiosíranového a polysulfidového mechanismu biooxidace sulfidů (Rohwerder et al. 2003).

Jak již bylo uvedeno, Fe^{3+} vzniká biooxidací Fe^{2+}. Tento proces je znázorněn na příkladu biooxidace bakterií *Acidithiobacillus ferrooxidans* na obr. 5. Vzniklé železité ionty mohou dále reagovat s vodou za vzniku hydroxidů.



Obr. 5 Schématické znázornění metabolismu železa u bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Näveke 1986).

Thiosíranový mechanismus je navrhován pro oxidaci v kyselině nerozpustných sulfidů kovů jako je pyrit (FeS_2), molybdenit (MoS_2) a tungstenit (WS_2). Rozpouštění minerálu (např. pyritu) se uskutečňuje přes železitý ion (jeho vznik vysvětlen výše), kde jako meziprodukt vzniká thiosíran a konečným produktem je síran.

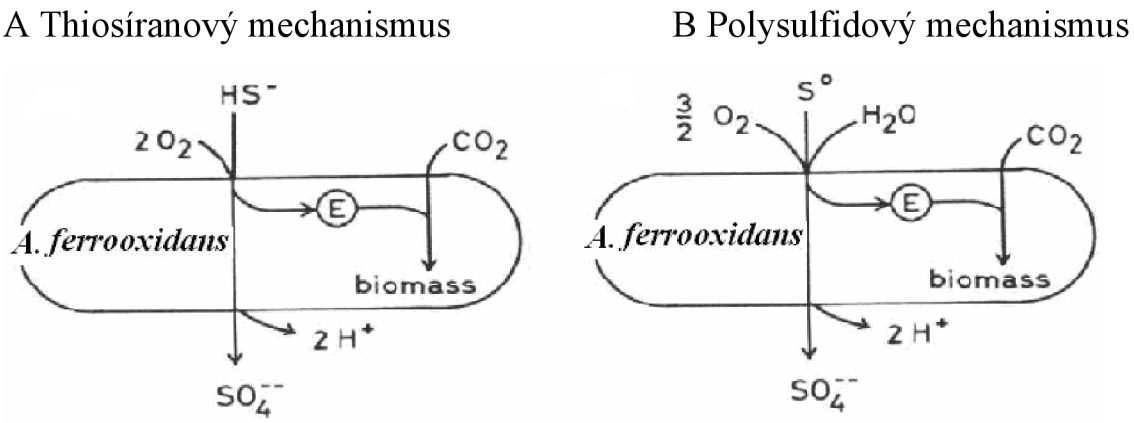
$$FeS_2 + 6Fe^{3+} + 3H_2O \rightarrow S_2O_3^{2-} + 7Fe^{2+} + 6H^+$$
$$S_2O_3^{2-} + 8Fe^{3+} + 5H_2O \rightarrow 2SO_4^{2-} + 8Fe^{2+} + 10H^+$$

Polysulfidový mechanismus je navrhován pro sulfidy rozpustné v kyselině, mezi něž je řazen sfalerit (ZnS), chalkopyrit ($CuFeS_2$) nebo galenit (PbS). V tomto případě se rozpouštění minerálu uskutečňuje přes železitý ion a proton, meziproduktem je elementární síra. Tato elementární síra je relativně stabilní, ale může být oxidována sirnými bakteriemi na síran. Dvojmocné železo, vytvořené během tohoto procesu, může být železitými bakteriemi opět reoxidováno na železo trojmocné (Rawlings 2002).

$$MS + Fe^{3+} + H^+ \rightarrow M^{2+} + 1/2H_2S_n + Fe^{2+} \ (n \geq 2)$$
$$1/2H_2S_n + Fe^{3+} \rightarrow 1/8S_8 + Fe^{2+} + H^+$$

Fe^{3+} může být nahrazeno kyslíkem O_2, který může následně síru oxidovat na síran (resp. kyselinu sírovou).

$$1/8\ S_8 + 3/2\ O_2 + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$$



Obr. 6 Schématické znázornění metabolismu sirných sloučenin u bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Näveke 1986).

2.2.3 Praktické využití biooxidačních procesů

Schopnosti bakterií rozkládat sulfidické minerály se využívá v biohydrometalurgii při získávání kovů z chudých rud. Tady je tento celý proces žádoucí. Působení bakterií se využívá k převedení nerozpustných sulfidů kovů na rozpustné sulfáty a dále k zpřístupnění struktury minerálu chemikáliím, aby mohly lépe proniknout do minerálu k získání požadovaného kovu. Rudami kovů proniká loužící roztok, jehož aktivní složkou jsou bakterie nebo jejich metabolické produkty v podobě kovových iontů a kyselin. Oproti tradičním metodám jsou tyto metody energeticky méně náročné. Jednou z nejlépe prostudovaných bakterií využívaných v biometalurgii je právě rod *Acidithiobacillus*, do kterého patří bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* a *Acidithiobacillus thiooxidans*. Tímto způsobem se získává například měď z kovelinu (CuS) a chalkocitu (Cu_2S). Dále pak uran, kobalt, zinek, nikl či vanad (Rawlings 2002). Atraktivní je bioextrakce zlata. Zlato se získává ze zlatonosných arsenopyritových rud (FeAsS). Zlato je uzavřené v krystalové mřížce nerostu a je inertní mikrobiálnímu působení. Použité bakterie musí být odolné k arsenu. Mikroorganismy tedy oxidují tyto rudy a narušují onu krystalovou mřížku. Biooxidace se tedy využívá k rozbití krystalové mřížky, čímž je umožněn lepší přístup kyanidu ke zlatu. Bez fáze biooxidace jsou výtěžky mnohem nižší (Beolchini et al 2005).

2.3 Popis zájmových lokalit

Vzorky pro studium bakteriální aktivity byly odebrány z lokalit Okrouhlá Radouň, Vítkov, Zadní Chodov a Zlaté Hory. Na všech těchto lokalitách docházelo k těžbě horninového materiálu obsahujícího sulfidické polohy. Lze zde tedy předpokládat zvýšenou aktivitu bakterií, které se mohou podílet na změnách složení vod a půd na těchto lokalitách.

2.3.1 Lokalita Okrouhlá Radouň

Těžené uranové zrudnění bylo na ložisku vázáno na centrální severo-jižní hlavní radouňskou zónu.

Hlavní těžená radouňská zóna vedle uranové mineralizace tvořené převážně coffinitem obsahovala dále vtroušenou mineralizaci pyritu, chalkopyritu, markazitu, galenitu, sfaleritu a bornitu.

Ložisko Okrouhlá Radouň bylo po průzkumných pracích v 60-tých a 70-tých letech těženo od roku 1972 do roku 1990.

Důlní vody po zatopení ložiska byly do roku 2006 udržovány na kótě 527,5 m, aby nedocházelo k volnému přelivu do dna Rešlova rybníka, případně nevytékaly volně větracím komínem pod odvalem a následně do rybníka. Nyní je ponechána nastoupaná volná hladina do úrovně 530 m n. m., přičemž voda evidentně nikde nevystupuje masivním výtokem do vodoteče, respektive jsou znatelné drobné výrony pod hrází rybníka. Při udržování hladiny čerpáním na kótě 527,5 bylo průměrně vypouštěno 74 000 m^3 ročně. Sledovány jsou také oplachové a průsakové vody z odvalu – plocha cca 75 962 m^2 , objem hlušiny 670 965 m^3 (Kafka et al. 2003).

2.3.2 Lokalita Vítkov

Ložisko Vítkov je situováno v centrální části západního exokontaktu borského masivu ve variských granitoidech.

Rudními minerály byl na této lokalitě coffinit s braneritem, smolincem v křemen-hematit-smolincové asociaci s nepatrným množstvím pyritu a magnetitu. Mladší mineralizace je pak karbonát-sulfidické formace s nepatrnou mineralizací sulfidů Fe, Cu, Pb, Zn. Charakteristickou zvláštností ložiska je vývin hydroxidů uranu (becquerelit + curit), silikátů uranu (uronofan) a fosfátů uranu (fosfuranylit + autunit) a to podél rudonosných zón až do hloubky 500 až 700 m.

Zvýšená koncentrace Fe^{3+} (hematitizace) je způsobena okysličením dvojmocného Fe při přechodu od metasomatitů do nepřeměněných granitoidů.

Dobývání ložiska bylo zahájeno v roce 1961. Těžba byla ukončena v roce 1990.

Bývalý důl byl založen v ohbí řeky Mže a po opuštění a zatopení ložiska byly problémy s výtoky důlních vod podél špatně zatamponovaných průzkumných vrtů. V roce 1995 bylo proto provedeno sanační opatření. Bylo zjištěno zamokření a evidentní průsaky důlních vod do lesního porostu. Množství vypouštěných důlních vod je 24 660 m^3 ročně (Kafka et al. 2003).

2.3.3 Lokalita Zadní Chodov

Ložisko se nachází v pestré sérii západočeského moldanubika, v severní části západního exokontaktu borského masivu. Uranové minerály jsou zastoupeny coffinitem, zřídka braneritem a jsou v asociaci s chloritem a menším množstvím pyritu. V porudní fázi mineralizace se objevuje další pyritová mineralizace a další sulfidy, lokálně byly nalezeny selkenidy Cu, Pb, Ag a arsenidy Ni, Co, Fe, ryzí Bi, Ag, bornit, dignit a hematit.

Ložisko bylo dobýváno od roku 1952 do roku 1992.

Důlní vody jsou jednak čerpány z dolu a pak je podchycen a na dekontaminační stanici odveden výron důlních vod v prostoru komína nad silnicí. Pod silnicí je pak volný výron a zamokření, ze kterého vody nejsou jímány a převáděny do systému nakládání s důlními vodami. Ročně je čerpáno a čištěno 509 600 m^3 důlních vod (Kafka et al. 2003).

2.3.4 Lokalita Zlaté Hory

Území zlatohorského rudního revíru se nachází v severo-východní části silezika. Primární ložisková struktura je součástí devonského vulkanosedimentárního komplexu epizonálně metamorfovaných hornin a je situována na jižním svahu variské akreční zóny s intenzivní granitizací na křížení dvou významných regionálních střižných struktur. Oblast obecně zahrnuje monometalická a polymetalická Cu, Pb, Zn, S, Ag a Au ložiska. Rudní mineralizace ložiska je tvořena sfaleritem, pyritem a chalkopyritem. Méně galenitem a pyrhotinem. Významná je přítomnost ryzího zlata.

Novodobá historie oblasti se datuje od roku 1952. Skončena byla těžba roku 1993.

Po skončení těžby došlo k zatopení důlních děl. Na povrchu spočívala likvidace v zajištění trvale ohrožených oblastí, v terénních úpravách a rekultivaci hald, v demontáži technologického zařízení a v rekultivaci odkaliště. V současnosti je vypouštěno kolem 50 l/s důlních vod, které jsou čištěny na čističce důlních vod (Kafka et al. 2003).

3 Použitá metodika

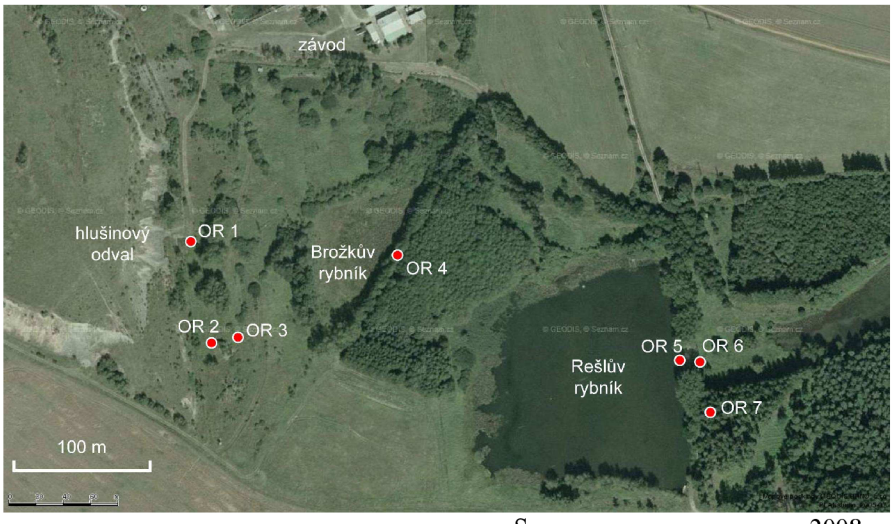
3.1 Terénní část

Vzorky vod a půd byly na všech lokalitách odebrány z míst možné kontaminace prostředí produkty zvětrávání sulfidických poloh přítomných v horninovém materiálu. Všechny vzorky byly analyzovány v laboratořích firmy AQUATEST a.s. a DIAMO, státní podnik.

3.1.1 Okrouhlá Radouň

Tab. 2 Popis odběrných míst a chemická charakteristika odebraných vzorků na lokalitě Okrouhlá Radouň.

vzorek	popis odběrného místa	pH	Eh [mV]	Fe^{2+} [mg/l]	Fe^{3+} [mg/l]	Mn [mg/l]	sírany [mg/l]	U [mg/l]
OR1 tekutý	voda z jímky pod hlušinovým odvalem	8,45	231	-	0,14	0,05	814	1,75
OR2 tekutý	komín výstupu důlních vod	7,55	90	-	2,47	2,23	199	0,53
OR3 tekutý	výron vod mezi komínem a Brožkovým rybníkem	8,09	173	-	0,43	0,15	191	0,38
OR4 tekutý	Brožkův rybník	7,61	104	-	0,23	0,13	222	0,34
OR5 tekutý	hladina Rešlova rybníka	7,8	136	-	1,26	0,74	218	0,17
OR6 tekutý i tuhý	výpusť Rešlova rybníka	6,9	86	2,766	1,844	1,34	-	0,1
OR7 tekutý i tuhý	průsaky pod hrází Rešlova rybníka	6,59	96	1,6	0,41	21,7	239	0,1



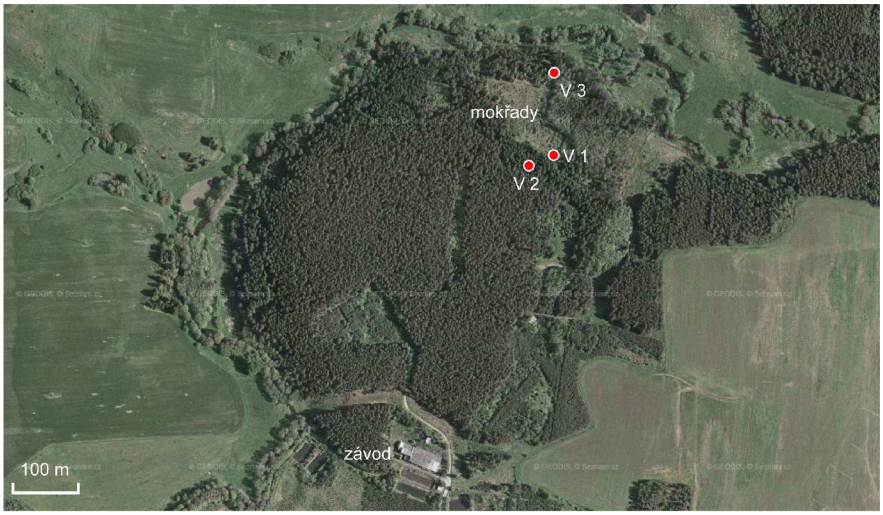
Seznam.cz, www.mapy.cz, 2008

Obr. 7 Letecký snímek lokality Okrouhlá Radouň.

3.1.2 Vítkov

Tab. 3 Popis odběrných míst a chemická charakteristika odebraných vzorků na lokalitě Vítkov.

vzorek	popis odběrného místa	pH	Eh [mV]	Fe^{2+} [mg/l]	Fe^{3+} [mg/l]	Mn [mg/l]	sírany [mg/l]	U [mg/l]
V1 tekutý i tuhý	vstup důlních vod do rýhy	7,14	311	-	3,0	4,61	6,7	0,1
V2 tekutý i tuhý	lesní výron důlních vod	7,12	138	9,02	60,38	3,23	2,0	0,1
V3 tekutý	výstup vod z mokřadu pod V2	7,46	295	-	3,03	3,92	2,0	0,1



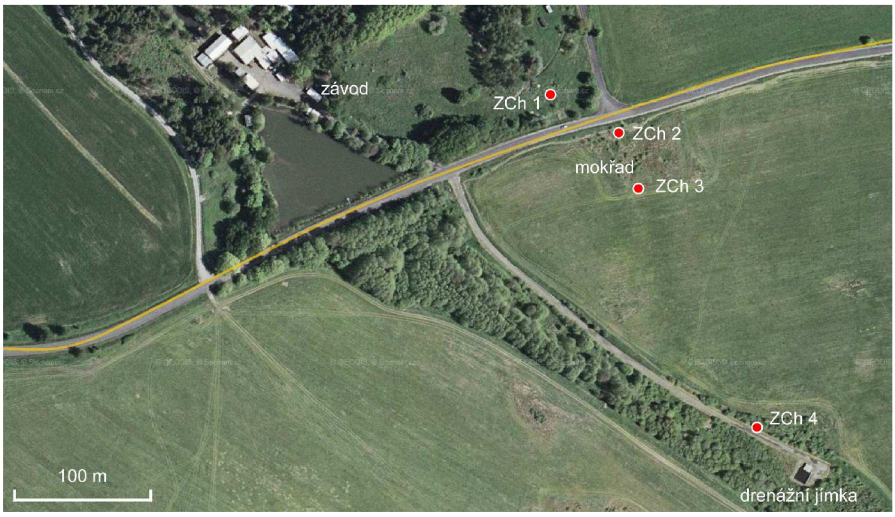
Seznam.cz, www.mapy.cz, 2008

Obr. 8 Letecký snímek lokality Vítkov.

3.1.3 Zadní Chodov

Tab. 4 Popis odběrných míst a chemická charakteristika odebraných vzorků na lokalitě Zadní Chodov.

vzorek	popis odběrného místa	pH	Eh [mV]	Fe^{2+} [mg/l]	Fe^{3+} [mg/l]	Mn [mg/l]	sírany [mg/l]	U [mg/l]
ZCH1 tekutý	jezírko – zasypaný komín	7,62	138	0,57	1,32	2,5	24,3	0,52
ZCH2 tekutý i tuhý	výron vod pod silnicí do mokřadu	7,65	311	-	1,8	0,98	37,3	0,05
ZCH3 tekutý i tuhý	výstup vod z mokřadu	8,5	348	-	7,26	0,16	8,6	1,43
ZCH4 tekutý	průsak vod z pole nad drenážní jímkou	7,96	347	-	1,25	0,52	32,8	1,15



Seznam.cz, www.mapy.cz, 2008

Obr. 9 Letecký snímek lokality Zadní Chodov.

3.1.4 Zlaté Hory

Tab. 5 Popis odběrných míst a chemická charakteristika odebraných vzorků na lokalitě Zlaté Hory.

vzorek	popis odběrného místa	pH	Eh [mV]	Fe^{2+} [mg/l]	Fe^{3+} [mg/l]	Mn [mg/l]	sírany [mg/l]	U [mg/l]
ZH1 tuhý	odkaliště							
ZH2 tekutý i tuhý	výtok z odkaliště	6,47	175	25,2	-	8,49	-	-

Seznam.cz, www.mapy.cz, 2008

Obr. 10 Letecký snímek lokality Zlaté Hory.

Všechny vzorky odebrané pro bakteriální výzkum byly převezeny k laboratorním testům. Během odběru i transportu se dbá na maximální zabránění kontaminace vzorků okolním prostředím. Po převozu byly vzorky umístěny do chladícího zařízení.

3.2 Laboratorní část

Přítomnost železo a/nebo síru oxidujících bakterií lze prokázat různými metodami. V této práci byla použita metoda kultivace na tuhém a tekutém sirném a železnatém živném médiu. Vyrostlé bakterie byly barveny dle Gramma pro mikroskopické sledování.

3.2.1 Kultivace na tekutých živných médiích

Bylo připraveno médium 9K a sirné médium (obr. 11).

3.2.1.1 Příprava média 9K

Příprava složky A: Na 1 litr kultivačního média bylo rozpuštěno v 700 ml redestilované vody postupně 3 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 g KCl, 0,725 g K_2HPO_4 . $3H_2O$ a 0,5 g $MgSO_4$. $7H_2O$; pH roztoku se neupravuje.

Příprava složky B: Na 1 litr kultivačního media bylo rozpuštěno v 300 ml redestilované vody 44,2 g $FeSO_4$. $7H_2O$. Hodnota pH byla upravena koncentrovanou H_2SO_4 na 1,3.

Příprava složky C: Ve 100 ml redestilované vody bylo rozpuštěno 0,288 g $Ca(NO_3)_2$. $4H_2O$ (do 1 litru kultivačního media bylo pak použito pouze 5 ml).

Všechny tři složky byly sterilizovány varem, po vychladnutí byly nejprve slity dohromady složky A a B, nakonec byla za stálého míchání přidána po kapkách složka C.

3.2.1.2 Příprava základního roztoku pro sirné médium

V 1000 ml redestilované vody bylo postupně rozpuštěno: 0,2 g $(NH_4)_2SO_4$, 3 g KH_2PO_4, 0,5 g $MgSO_4$. $7H_2O$ a 0,127 g $CaCl_2$. Médium bylo sterilizováno varem a uskladněno v chladicím boxu.

foto: Ivana Antošová, 2008

Obr. 11 Ukázka použitého materiálu, nádobek a zařízení.

3.2.1.3 Kultivace

Všechny vzorky byly vloženy jak do média 9K tak do sirného média. Během kultivace bylo pH měřeno pH-metrem PHM 93 REFERENCE pH METER RADIOMETER, COPENHAGEN, kalibrovaným na pufry o pH 4 a 7.

3.2.1.3.1 Kultivace na sirném médiu

Pro kultivaci sirných bakterií bylo do 500 ml baňky dávkováno 50 ml sirného média s 0,5 g síry a sterilizováno varem. Po zchladnutí bylo sterilně přidáno 10 g pevného a 20 ml kapalného vzorku a změřeno pH. Tyto hodntoty pH se pohybovaly mezi 5,8 a 7,5. Pro optimální pH kultivace se pH upravilo kyselinou sírovou na 3 až 4,5. Baňky byly uzavřeny pro vzduch propustnými zátkami. Kultivace probíhala v temperované místnosti při 28 °C na rotační třepačce (obr. 12). U roztoků bylo průběžně měřeno pH. Jeho pokles indikuje bakteriální tvorbu kyseliny sírové. Rychlý pokles pH může signalizovat vyšší množství bakterií. U roztoků, u kterých pH neklesá, se nepředpokládá přítomnost bakterií schopných oxidace síry (resp. redukovaných anorganických sirných látek).

foto: Ivana Antošová, 2008

Obr. 12 Baňky obsahující sirné médium a vzorky na rotační třepačce.

3.2.1.3.2 Kultivace na médiu 9K

Pro kultivaci železnatých bakterií bylo do 100 ml baňky dávkováno 20 ml železnatého média 9K. Do média se dávkuje 10 g pevného vzorku a 15 ml kapalného vzorku. Poté bylo změřeno pH. Hodnoty pH na počátku kultivace se pohybovaly kolem 2, což je pro růst bakterií v železnatém médiu optimální. Baňky byly uzavřeny pro vzduch propustnými zátkami a umístěny do temperované místnosti (28 °C).

Biooxidace Fe^{2+} se projevuje typickou barvou vznikajícího Fe^{3+}. „Rezavění“ média 9K tak bylo základním znakem pro přítomnost bakterií oxidujících železo. Chemická oxidace Fe^{2+} sice rovněž probíhá i v kyselém prostředí, ale ve srovnání s aktivními bakteriemi zanedbatelnou rychlostí. Výrazné zbarvení kultivačního roztoku během krátké doby značí vyšší počet bakterií.

foto: Ivana Antošová, 2008

Obr. 13 Baňky obsahující železnaté médium a vzorky umístěné v temperované místnosti.

Vzorky i vyrostlé kultury izolované ze vzorků, byly následně uloženy do chladicího zařízení pro případné další využití.

3.2.2 Kultivace na tuhém živném médiu

Tuhé a tekuté vzorky, ve kterých se při kultivaci na sirném a/nebo železnatém médiu prokázala přítomnost bakterií, byly aplikovány na tuhé živné médium, kde byl sledován růst kolonií zájmových bakterií.

3.2.2.1 Příprava vzorků

Tuhé vzorky se nejdříve vyluhují ve sterilní kyselé vodě (pH = 1,7). Luhují se 2 g v 10 ml kyselé vody. 0,1 ml vyluhovaného vzorku se aplikuje na povrch Petriho misky obsahující tuhé živné médium. 0,1 ml tekutého vzorku se dávkuje přímo na tuhé živné médium.

3.2.2.2 Příprava tuhého živného média

Na kultivaci je nutná příprava 400 ml živného tuhého média FeTeTo. Živné médium se skládá z pěti složek.

Příprava složky A: 40 ml základních solí (1 l H_2O + 12,5 g $(NH_4)_2SO_4$ a 5 g $MgSO_4$. $7H_2O$ - M 132,11, pH bylo upraveno kyselinou sírovou na hodnotu 3 a sterilizováno varem) + 0,1 g TSB (trypton soya broth) + 235 ml H_2O + 0,4 ml stopových prvků; následně úprava pH kyselinou sírovou na hodnotu 2,5 a sterilizováno varem.

Příprava složky B: 2 g agarosy rozpuštěny ve 100 ml vody; sterilizováno varem.

Příprava složky C: 10 ml roztoku 1 M $FeSO_4$ o pH 1,8 (1 M $FeSO_4$ + 100 ml kyselé vody pH 1,7 + 27,8 g $FeSO_4$. $7H_2O$ - M 278,01; úprava na výsledné pH 1,8, sterilizace filtrací filtry Millipore).

Příprava složky D: 10 ml roztoku 0,1 M $K_2S_4O_6$ (0,1 M $K_2S_4O_6$ + 10 ml vody + 0,302 g $K_2S_4O_6$ M ($K_2S_4O_6$) = 302,42; sterilizace filtrací filtry Millipore).

Příprava složky E: 0,4 ml $Ca(NO_3)_2$. 4 H_2O (roztok $Ca(NO_3)_2$. 4 H_2O + 10 ml H_2O + 0,1 g $Ca(NO_3)_2$. 4 H_2O; sterilizováno varem).

Složky A a B byly po převaření smíchány a při teplotě 45 °C byla přidána složka C a smíchané složky D a E. 400 ml směsi se rozdělilo na poloviny. Do prvních 200 ml směsi bylo přidáno 5 ml SJH preinkubovaného v tekutém preinkubačním médiu.

Tekuté preinkubační médium je použito pro adaptaci SJH na železo a tetrathionan. Na celkový objem 100 ml tohoto média se použijí následující tři složky.

Příprava složky A: 10 ml H_2O + 0,180 g galaktosy; filtrace filtry Millipore.

Příprava složky B: 80 ml H_2O + 0,025 g TSB + 0,695 g $FeSO_4$. $7H_2O$ + 0,076 g $K_2S_4O_6$.

Příprava složky C: 10 ml roztoku základních solí (1 l H_2O + 12,5 g $(NH_4)_2SO_4$ a 5 g $MgSO_4$. $7H_2O$ - M 132,11; pH upraveno kyselinou sírovou na hodnotu 3; sterilizováno varem).

Složky A, B a C smíchány dohromady. Výsledné pH je upraveno na hodnotu v rozmezí 2-2,5.

První polovina (200 ml média a 5 ml preinkubovaného SJH) je aplikována na Petriho misky jako spodní vrstva. Druhá polovina je aplikována jako horní vrstva. Vrstvy se nechaly do

dalšího dne ztuhnout. Na ztuhlé médium se pak přímo aplikuje kapalný vzorek (tuhý vzorek po vyluhování).

Petriho misky se umístí do temperované místnosti (28°C). Sleduje se vývoj kolonií bakterií. Sirné bakterie tvoří bílé kolonie. Bakterie oxidující železo tvoří kolonie „rezavě“ zbarvené.

3.2.3 Barvení dle Gramma

Vzorky, ve kterých se při kultivaci na sirném a/nebo železnatém médiu prokázala přítomnost bakterií, byly přímo ze sirného a železnatého média naneseny na podložní sklíčko. Vzorek na sklíčku se nechal do dalšího dne zaschnout a probíhalo jeho barvení.

3.2.3.1 Postup barvení

Při barvení se vychází z poznatku, že grammnegativní bakterie, mezi které patří zkoumané druhy, se zabarví tímto způsobem fialově. Vzorek na sklíčku se postupně barvil čtyřmi složkami. Po aplikaci každé složky se sklíčko se vzorkem oplachovalo destilovanou vodou.

Gramm I – genciánová violeť. Vzorek byl přelit tímto barvivem, barva se nechala 30 s působit.

Gramm II – Lugolův roztok.

Gramm III – líh.

Gramm IV – carbolfuchsin. Nechal se 30 s působit.

Sklíčka se vzorky se nechaly do dalšího dne oschnout. Po uschnutí se sleduje přítomnost bakterií v imersním objektivu mikroskopu (celkové zvětšení 1000×). Použit byl mikroskop Olympus BX 50.

3.2.4 Určení železo oxidující aktivity bakterií

Izoláty bakterií, které prokázaly schopnost oxidace Fe^{2+} během kultivace v tekutém médiu, byly dále kultivovány na tuhém médiu, čímž byly získány jednotlivé kolonie. Vybrané kolonie byly přeneseny do tekutého média 9K. Vyrostlé homogenní kultury byly přeočkovány do média 9K a byla stanovována tvorba Fe^{3+} absorpcí Fe^{3+} v UV oblasti (Mandl a Nováková, 1993). Z důvodu lineární tvorby Fe^{3+} v čase v aktivní fázi oxidace určuje směrnice této lineární závislosti rychlost oxidace Fe^{2+} (Mandl, 1984).

4 Výsledky a jejich diskuse

4.1 Výsledky kultivace na tekutých živných médiích

4.1.1 Výsledky kultivace na sirném médiu

4.1.1.1 Okrouhlá Radouň

Tab. 6 Výsledky kultivace sirných bakterií ve vzorcích z lokality Okrouhlá Radouň. Dle vývoje změn pH se vyhodnocuje přítomnost bakterií. Značka + znamená identifikované bakterie, – znamená, že síru oxidující bakterie nejsou přítomny.

vzorek	původní pH	úprava	2.	3.	4.	5.	6.	bakterie
OR1 tekutý	5,126		4,898	3,986	3,909	3,496	3,485	-
OR2 tekutý	6,612	3,515	3,258	3,265	3,209	3,067		-
OR3 tekutý	6,110	2,904	2,817	2,820	2,751	2,612	1,955	-
OR4 tekutý	6,074	2,952	2,387	2,315	2,218	2,029		-
OR5 tekutý	6,218	2,768	2,670	1,199	1,140			+
OR6 tekutý	6,316	2,808	2,562	1,302	1,228	0,997		+
OR6 tuhý	6,070	2,573	1,742	0,929	0,722			+
OR7 tekutý	5,867	2,718	2,763	2,667	2,662	2,562		-
OR7 tuhý	6,231	3,675	2,422	1,547	1,497	1,454	1,494	+

Jako pozitivní na přítomnost síru oxidujících bakterií byly vyhodnoceny vzorky OR5, OR6 v případě tekutého i tuhého vzorku a OR7 tuhý. U ostatních se bakteriální přítomnost neprokázala.

4.1.1.2 Vítkov

Tab. 7 Výsledky kultivace sirných bakterií ve vzorcích z lokality Vítkov. Dle vývoje změn pH se vyhodnocuje přítomnost bakterií. Značka + znamená identifikované bakterie, – znamená, že síru oxidující bakterie nejsou přítomny.

vzorek	původní pH	úprava	2.	3.	4.	5.	6.	bakterie
V1 tekutý	6,166	1,979	2,024	1,920	1,843	1,575	1,481	+

V1 tuhý	5,965	2,492	2,343	2,547	2,581	2,373		-
V2 tekutý	6,451	2,173	2,118	2,140	2,056	1,845	1,861	-
V2 tuhý	7,466	4,680	2,889	2,575	2,325	1,481	0,943	+
V3 tekutý	6,268	2,749	2,727	2,676	2,617	2,338	2,343	-

Jako pozitivní na přítomnost síru oxidujících bakterií byly vyhodnoceny vzorky V1 tekutý a V2 tuhý. U ostatních se bakteriální přítomnost neprokázala.

4.1.1.3 Zadní Chodov

Tab. 8 Výsledky kultivace sirných bakterií ve vzorcích z lokality Zadní Chodov. Dle vývoje změn pH se vyhodnocuje přítomnost bakterií. Značka + znamená identifikované bakterie, – znamená, že síru oxidující bakterie nejsou přítomny.

vzorek	původní pH	úprava	2.	3.	4.	5.	6.	bakterie
ZCH1 tekutý	6,469	2,976	2,894	2,895	2,849	2,729		-
ZCH2 tekutý	6,196	2,710	2,700	2,695	2,591	2,375	2,350	-
ZCH2 tuhý	6,051	2,718	2,320	1,622	1,453	1,163		+
ZCH3 tekutý	6,392	2,805	2,744	2,727	2,623	2,409	2,339	-
ZCH3 tuhý	5,915	2,794	3,645	3,028	2,950	2,924		-

Jako pozitivní na přítomnost síru oxidujících bakterií byl vyhodnocen pouze vzorek ZCH2 tuhý. U ostatních se bakteriální přítomnost neprokázala.

4.1.1.4 Zlaté Hory

Tab. 9 Výsledky kultivace sirných bakterií ve vzorcích z lokality Zlaté Hory. Dle vývoje změn pH se vyhodnocuje přítomnost bakterií. Značka + znamená identifikované bakterie, – znamená, že síru oxidující bakterie nejsou přítomny.

vzorek	původní pH	úprava	2.	3.	4.	5.	6.	bakterie
ZH1 tuhý	2,757	-	1,155	0,875				+
ZH2 tekutý	4,787	-	1,261	0,979				+
ZH2 tuhý	6,960	-	1,425	1,350				+

Jako pozitivní na přítomnost síru oxidujících bakterií byly vyhodnoceny všechny vzorky.

4.1.2 Výsledky kultivace na železnatém médiu

4.1.2.1 Okrouhlá Radouň

Tab. 10 Výsledky kultivace železooxidujících bakterií ve vzorcích z lokality Okrouhlá Radouň. Dle intenzity zabarvení se vyhodnocuje přítomnost bakterií. Značka + znamená identifikované bakterie, – znamená, že železo oxidující bakterie nejsou přítomny.

vzorek	pH	1.	2.	3.	bakterie
OR1 tekutý	1,915	-	-	-	-
OR2 tekutý	2,014	-	-	-	-
OR3 tekutý	1,995	-	-	-	-
OR4 tekutý	1,978	-	-	-	-
OR5 tekutý	1,979	-	-	-	-
OR6 tekutý	1,998	-	+	+	+
OR6 tuhý	2,006	+	+	+	+
OR7 tekutý	1,987	-	-	-	-
OR7 tuhý	2,160	-	-	-	-

Jako pozitivní na přítomnost železo oxidujících bakterií byl vyhodnocen pouze vzorek OR6 tekutý a tuhý. U ostatních se bakteriální přítomnost neprokázala.

4.1.2.2 Vítkov

Tab. 11 Výsledky kultivace železooxidujících bakterií ve vzorcích z lokality Vítkov. Dle intenzity zabarvení se vyhodnocuje přítomnost bakterií. Značka + znamená identifikované bakterie, – znamená, že železo oxidující bakterie nejsou přítomny.

vzorek	pH	1.	2.	3.	bakterie
V1 tekutý	1,995	-	-	-	-
V1 tuhý	1,896	-	-	-	-
V2 tekutý	2,015	-	-	-	-
V2 tuhý	2,115	-	-	-	-
V3 tekutý	2,007	-	-	-	-

U žádného ze vzorků se neprokázala přítomnost železo oxidujících bakterií.

4.1.2.3 Zadní Chodov

Tab. 12 Výsledky kultivace železooxidujících bakterií ve vzorcích z lokality Zadní Chodov. Dle intenzity zabarvení se vyhodnocuje přítomnost bakterií. Značka + znamená identifikované bakterie, – znamená, že železo oxidující bakterie nejsou přítomny.

vzorek	pH	1.	2.	3.	bakterie
ZCH1 tekutý	1,981	-	-	-	-
ZCH2 tekutý	2,011	-	-	-	-
ZCH2 tuhý	2,047	-	+	+	+
ZCH3 tekutý	1,954	-	-	-	-
ZCH3 tuhý	2,148	-	-	-	-
ZCH4 tekutý	1,976	-	-	-	-

Jako pozitivní na přítomnost železo oxidujících bakterií byl vyhodnocen pouze vzorek ZCH2 tuhý. U ostatních se bakteriální přítomnost neprokázala.

4.1.2.4 Zlaté Hory

Tab. 13 Výsledky kultivace železooxidujících bakterií ve vzorcích z lokality Zlaté Hory. Dle intenzity zabarvení se vyhodnocuje přítomnost bakterií. Značka + znamená identifikované bakterie, – znamená, že železo oxidující bakterie nejsou přítomny.

vzorek	pH	1.	2.	3.	bakterie
ZH1 tuhý	1,871	+	+	+	+
ZH2 tekutý	1,785	+	+	+	+
ZH2 tuhý	1,974	+	+	+	+

Jako pozitivní na přítomnost železo oxidujících bakterií byly vyhodnoceny všechny vzorky.

4.1.3 Souhrnné zhodnocení přítomnosti železo a síru oxidujících bakterií

4.1.3.1 Okrouhlá Radouň

Tab. 14 Souhrnné výsledky kultivace železo a/nebo síruoxidujících bakterií ve vzorcích z lokality Okrouhlá Radouň.

vzorek	S oxidující bakterie	Fe oxidující bakterie
OR1 tekutý	-	-
OR2 tekutý	-	-
OR3 tekutý	-	-
OR4 tekutý	-	-
OR5 tekutý	+	-
OR6 tekutý	+	+
OR6 tuhý	+	+
OR7 tekutý	-	-
OR7 tuhý	+	-

Všechny odebrané vzorky vod je možné dle koncentrací železa, manganu a síranů vyhodnotit jako vody blízké svým složením důlním vodám. Ve všech byla tedy předpokládána bakteriální přítomnost. Bakterie byly však identifikovány až na výstupu z areálu (OR5 – hladina Rešlova rybníka, OR6 – výpusť Rešlova rybníka a OR7 – průsaky pod hrází Rešlova rybníka), kde dochází k druhotné redukci železa, manganu a síranů v důsledku poklesu oxidačně-redukčních podmínek rozkladem bioty. Tyto vzniklé redukované precipitáty pak slouží jako substrát pro jejich metabolickou aktivitu. V ostatních vzorcích nebyla bakteriální přítomnost prokázána. I přes podobnou chemickou charakteristiku vzorku OR2 (komín výstupu důlních vod) a OR4 (Brožkův rybník) se vzorky odebranými na výstupu z areálu se neprokázala žádná bakteriální přítomnost. V případě vzorku OR5 byla prokázána přítomnost pouze síru oxidujících bakterií, jde tedy pravděpodobně o bakterii *Acidithiobacillus thiooxidans*. U vzorku OR6 byly prokázány bakterie železo i síru oxidující jedná se tedy pravděpodobně o bakterii *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Jejich přítomnost se prokázala jak v tekutém tak i tuhém vzorku. V případě vzorků OR7 byly identifikovány pouze bakterie síru oxidující a v tuhém nikoli v tekutém. V tomto případě jde tedy také pravděpodobně o bakterii

Acidithiobacillus thiooxidans. I přesto, že v tomto vzorku byla zjištěna přítomnost Fe^{2+}, nebyla prokázána přítomnost železo oxidujících bakterií.

Bakterie se tedy na uvolňování rizikových složek na této lokalitě nepodílejí. Mobilizace rizikových složek z hlušinového odvalu i ložiskových hornin v podzemí je způsobena čistě anorganickými procesy. V žádném případě se také neprokázala přítomnost pouze železo oxidujících bakterií *Leptospirillum ferrooxidans*.

4.1.3.2 Vítkov

Tab. 15 Souhrnné výsledky kultivace železo a/nebo síruoxidujících bakterií ve vzorcích z lokality Vítkov.

vzorek	S oxidující bakterie	Fe oxidující bakterie
V1 tekutý	+	-
V1 tuhý	-	-
V2 tekutý	-	-
V2 tuhý	+	-
V3 tekutý	-	-

Všechny vzorky vod mají charakter mělkých podzemních vod, které už ztratily charakter důlních vod, o jejich původu však svědčí vyšší obsahy železa a manganu. Přítomnost bakterií byla prokázána pouze v tekutém vzorku V1 (vstup důlních vod do rýhy) a v tuhém vzorku V2 (lesní výrony důlních vod). V ostatních případech se bakteriální přítomnost kultivací na tekutých živných médiích neprokázala. V případě vzorku V1 je patrná přítomnost pouze síru oxidujících bakterií. Lze tedy soudit, že se jedná o bakterii *Acidithiobacillus thiooxidans*. Na této lokalitě lze tedy předpokládat bakteriální podíl na rozkladu původního zdrojového materiálu a mobilizaci rizikových složek, které jsou nejméně o řád vyšší než je charakteristické pro čistě anorganickou cestu. Bakteriální přítomnost však nebyla prokázána v tuhém vzorku. V případě vzorku V2 dochází k druhotné redukci železa, manganu a síranů v důsledku poklesu oxidačně-redukčních podmínek rozkladem bioty. Tyto vzniklé redukované precipitáty pak mohou sloužit jako substrát pro jejich metabolickou aktivitu. Byly zde však prokázány pouze bakterie síru oxidující, pravděpodobně tedy bakterie *Acidithiobacillus thiooxidans*. Bakterie byly ovšem prokázány pouze v tuhém nikoli tekutém vzorku. I přes přítomnost Fe^{2+} nebyla prokázána přítomnost železo oxidujících bakterií.

U žádného vzorku se neprokázala přítomnost bakterií oxidujících jak železo, tak i síru, ani přítomnost pouze železo oxidujících bakterií. Nelze tedy předpokládat přítomnost bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* ani *Leptospirillum ferrooxidans*.

4.1.3.3 Zadní Chodov

Tab. 16 Souhrnné výsledky kultivace železo a/nebo síruoxidujících bakterií ve vzorcích z lokality Zadní Chodov.

vzorek	S oxidující bakterie	Fe oxidující bakterie
ZCH1 tekutý	-	-
ZCH2 tekutý	-	-
ZCH2 tuhý	+	+
ZCH3 tekutý	-	-
ZCH3 tuhý	-	-
ZCH4 tekutý	-	-

Vyvěrající podzemní vody na této lokalitě mají charakter silně degradovaných důlních vod. O jejich důlním původu svědčí opět pouze vyšší obsahy rozpuštěného železa, manganu a uranu. Na této lokalitě nebyla zjištěna téměř žádná bakteriální přítomnost. Bakterie nebyly identifikovány ani v případě vzorku ZCH1, ve kterém byla zjištěna přítomnost Fe^{2+}. Bakterie se tedy na uvolňování rizikových složek na této lokalitě nepodílejí. Mobilizace rizikových složek z hlušinového odvalu i ložiskových hornin v podzemí je způsobena čistě anorganickými procesy. Bakteriální přítomnost byla zjištěna pouze v případě tuhého vzorku ZCH2 (výron pod silnicí). Nebyly však prokázány v tekutém. U vzorku ZCH2 tuhého se prokázala přítomnost bakterií oxidujících jak železo, tak i síru. Jde tedy pravděpodobně o bakterii *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

4.1.3.4 Zlaté Hory

Tab. 17 Souhrnné výsledky kultivace železo a/nebo síruoxidujících bakterií ve vzorcích z lokality Zlaté Hory.

vzorek	S oxidující bakterie	Fe oxidující bakterie
ZH1 tuhý	+	+

ZH2 tekutý	+	+
ZH2 tuhý	+	+

U vzorků ZH1 a ZH2 tekutého i tuhého se prokázala přítomnost bakterií oxidujících jak železo, tak i síru. Jde tedy pravděpodobně o bakterii *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Na této lokalitě lze předpokládat bakteriální podíl na rozkladu původního zdrojového materiálu a mobilizaci rizikových složek, které jsou nejméně o řád vyšší než je charakteristické pro čistě anorganickou cestu. V žádném případě se neprokázala přítomnost pouze železo nebo pouze síru oxidujících bakterií. Nelze tedy předpokládat přítomnost bakterie *Leptospirillum ferrooxidans* a *Acidithiobacillus thiooxidans*.

4.2 Výsledky kultivace na tuhém živném médiu

Tab. 14 Výsledky kultivace bakterií na tekutém a tuhém živném médiu. Vzorky s vyrostlými koloniemi S a/nebo Fe oxidujících bakterií jsou označeny +, - znamená nepřítomnost kolonií bakterií.

vzorek	kultivace na tekutém S médiu	tvorba kolonií S oxidujících bakterií	kultivace na tekutém Fe médiu	tvorba kolonií Fe oxidujících bakterií
OR5 tekutý	+	+	-	-
OR6 tekutý	+	-	+	-
OR6 tuhý	+	+	+	+
OR7 tuhý	+	+	-	-
V1 tekutý	+	-	-	-
V2 tuhý	+	-	-	-
ZCH2 tuhý	+	+	+	+
ZH1 tuhý	+	-	+	+
ZH2 tekutý	+	+	+	+
ZH2 tuhý	+	-	+	+

Během kultivace na tuhém médiu se nepotvrdila ve vzorku OR6 tekutém přítomnost železo a síru oxidujících bakterií, přestože při kultivaci v tekutém médiu tyto bakterie prokázány byly. Tato miska byla ovšem kontaminována plísní, což mohlo bránit úspěšnému rozvoji

bakteriálních kolonií. Nelze ani vyloučit jejich přítomnost, která ale pod těmito plísněmi nemusela být dobře makroskopicky patrná.

U vzorků V1 tekutého a V2 tuhého nedošlo k růstu kolonií síru oxidujících bakterií, které však v tekutém médiu potvrzeny byly. V případě vzorku V1 nedošlo k žádné makroskopické změně povrchu pevného média, je možné tedy předpokládat špatné uchycení vzorku na pevné médium. U vzorku V2 pevného byly patrné na půdě lehké povlaky, které doprovázely výskyt kolonií v případě jiných pozitivních vzorků, ale klasické kolonie pozorovány nebyly. Důvod může být shodný jako u vzorku V1 tekutého.

Vzorky ZH1 a ZH3, které jsou vyhodnoceny jako negativní v případě tvorby kolonií sirných bakterií na tuhém médiu, se dá uvažovat situace, kdy pravděpodobně přítomná bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* preferuje pro svůj růst z tohoto tuhého živného média raději železnatou složku.

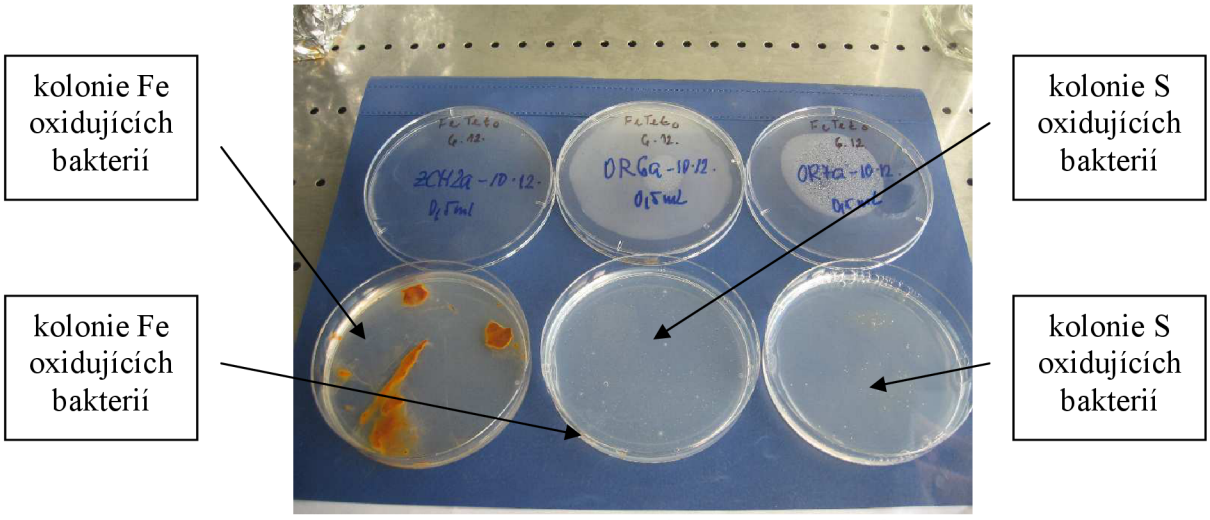


foto: Ivana Antošová, 2008

Obr. 14 Petriho misky s ukázkou vyrostlých síru a/nebo železo oxidujících bakterií.

4.3 Výsledky barvení dle Gramma

Tab. 15 Výsledky Grammova barvení. Vzorky s v mikroskopu viditelnými síru a/nebo železo oxidujícími bakteriemi jsou označeny + s , - znamená nepřítomnost bakterií.

vzorek	mikroskopicky pozorované bakterie
OR5 tekutý – S	+
OR6 tekutý –S	+
OR6 tekutý – Fe	+

OR6 tuhý – S	+
OR6 tuhý – Fe	+
OR7 tuhý – S	+
V1 tekutý – S	-
V2 tuhý – S	+
ZCH2 tuhý – S	+
ZCH2 tuhý – Fe	+
ZH1 tuhý – S	+
ZH1 tuhý – Fe	+
ZH2 tekutý – S	+
ZH2 tekutý – Fe	+
ZH2 tuhý – S	+
ZH2 tuhý – Fe	+

V téměř všech případech došlo mikroskopickým pozorováním k potvrzení přítomnosti grammnegativních bakterií do něhož patří zájmové druhy. Ve všech případech byly viditelné pouze tyčinkovité bakterie. Lze tedy vyloučit přítomnost bakterie *Leptospirillum ferrooxidans*. Rozlišit zda jde o bakterie druhu *Acidithiobacillus ferrooxidans* nebo *Acidithiobacillus thiooxidans* by umožnily genetické analýzy.

U vzorku V1 nebyly bakterie pozorovány. Pravděpodobně došlo ke špatnému obarvení vzorku.

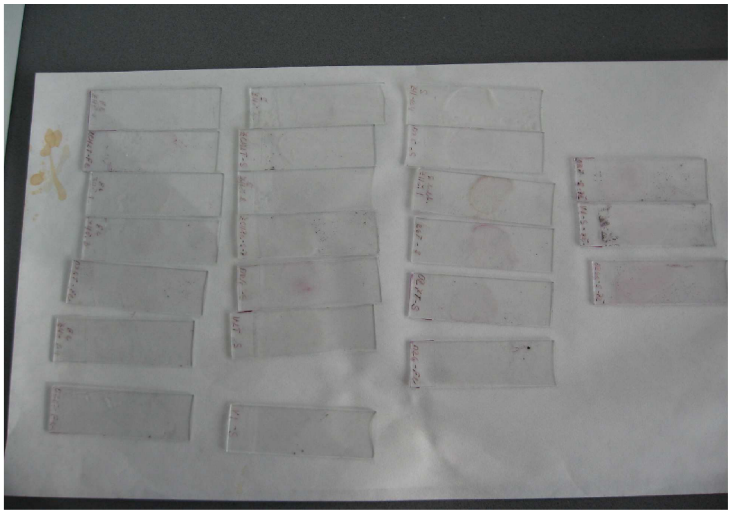


foto: Ivana Antošová, 2008

Obr. 15 Sklíčka s obarvenými vzorky.

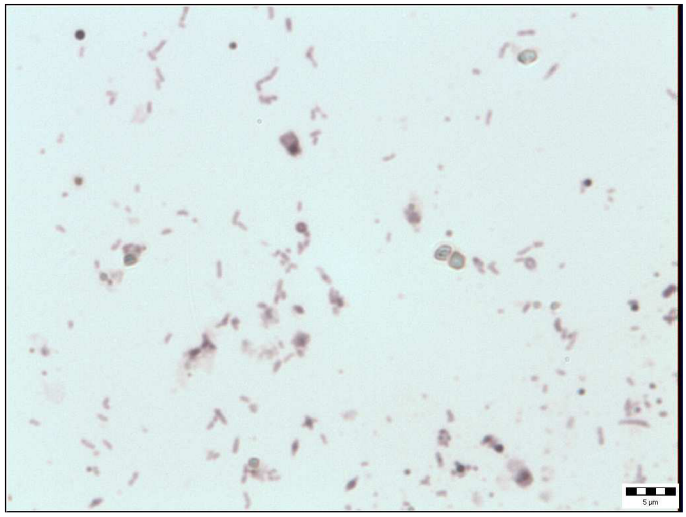


foto: Ivana Antošová, 2008

Obr. 16 Sklíčka s obarvenými vzorky pod mikroskopem. Jde nejpravděpodobněji o tyčinky *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidující Fe^{2+} a síru.

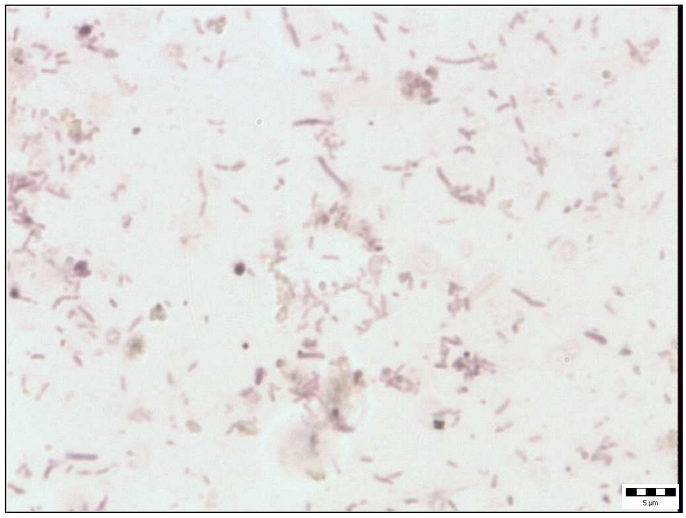


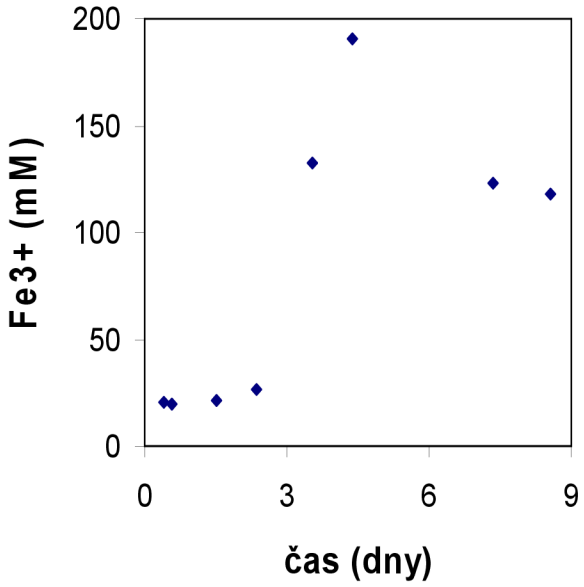
foto: Ivana Antošová, 2008

Obr. 17 Sklíčka s obarvenými vzorky pod mikroskopem. Jde nejpravděpodobněji o tyčinky *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidující Fe^{2+} a síru.

4.4 Výsledky určení železo oxidující aktivity bakterií

Pro určení železo oxidující aktivity bakterií byly použity tři kultury, které nejen prokázaly schopnost oxidace Fe^{2+}, ale jejichž kolonie byly úspěšně přeneseny do tekutého média 9K. U tekutých kultur byla srovnávána rychlost oxidace Fe^{2+} pomocí detekce tvorby Fe^{3+}. Z průběhu procesu byla pro vyhodnocení použita pouze lineární část, která představuje vlastní aktivní fázi biooxidace Fe^{2+}.

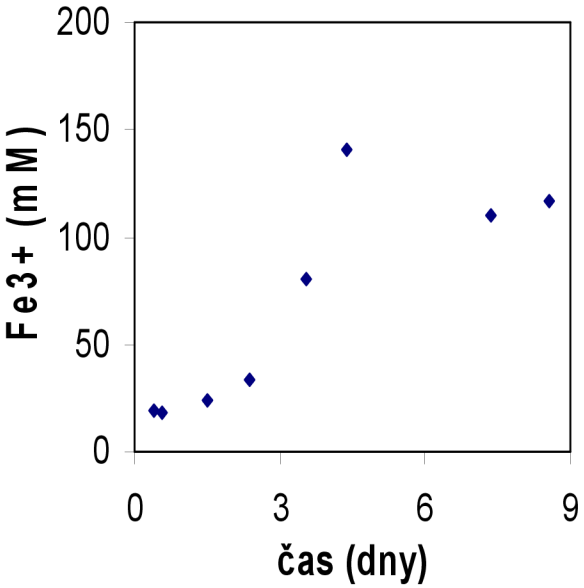
ZH1



Obr. 18 Graficky znázorněn vývoj vznikajícího Fe^{3+} v čase u vzorku ze Zlatých hor z odkaliště.

Z analýzy vzorku ZH1 došlo ke zjištění rychlosti biooxidace asi 82 mmol $l^{-1}d^{-1}$.

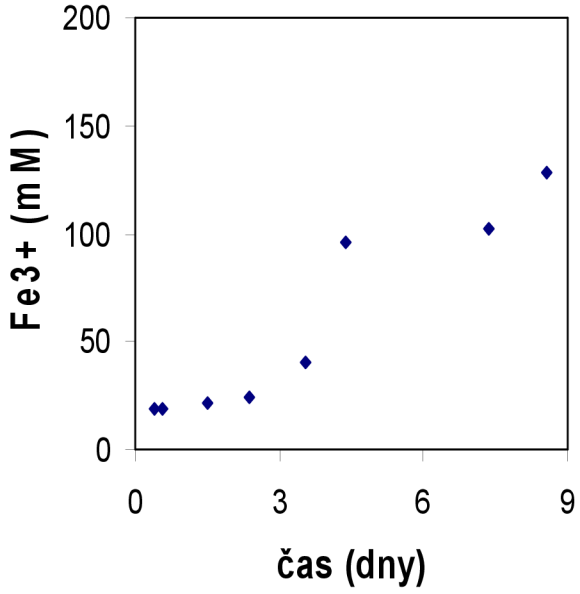
ZH2



Obr. 19 Graficky znázorněn vývoj vznikajícího Fe^{3+} v čase u vzorku ze Zlatých Hor z výtoků z odkaliště.

Z analýzy vzorku ZH2 došlo ke zjištění rychlosti biooxidace asi 71 mmol $l^{-1}d^{-1}$.

OR6



Obr. 20 Graficky znázorněn vývoj vznikajícího Fe^{3+} v čase u vzorku z Okrouhlé Radouně z výpusti Rešlova rybníka.

Z analýzy vzorku OR6 došlo ke zjištění rychlosti biooxidace asi 66 mmol $l^{-1}d^{-1}$.

Protože jde o pokus s cílem naznačit, zda existují rozdíly ve schopnosti oxidace Fe^{2+}, z průběhu procesu byla pro vyhodnocení použita pouze lineární část, která představuje vlastní aktivní fázi biooxidace Fe^{2+} (lineární tvorba produktu je důsledek limitace CO_2). Pro další sledování rychlosti biooxidace Fe^{2+} je nutné získat více bodů v aktivní oxidační fázi. Výsledky však naznačují, že se oxidační rychlosti významně neliší, proto se dá předpokládat jejich blízká podoba se skutečným stavem.

Rychlosti biooxidace ve vzorcích ze Zlatých Hor se mezi sebou významně neliší, 82 ± 6 mmol $l^{-1}d^{-1}$ (průměr ± směr. odchylka) a 71 mmol l^{-1} d^{-1}. Jedná se o místně tentýž bakteriální kmen. Biooxidace u vzorku z Okrouhlé Radouně má zjevně rychlost velmi podobnou, 66 mmol $l^{-1}d^{-1}$, přitom lze těžko předpokládat, že jde o stejný kmen (to by zjistila až genetická analýza). Přestože tento vzorek pochází ze zcela odlišné geografické oblasti, kde se kromě pyritu nachází uranové minerály, schopnost oxidace železa je víceméně stejná.

5 Závěry

Dle výsledků kultivace na tekutých železnatých a sirných živných médiích lze jen na lokalitách Vítkov a Zlaté Hory předpokládat bakteriální podíl na rozkladu původního zdrojového materiálu a mobilizaci rizikových složek, které jsou nejméně o řád vyšší než je charakteristické pro čistě anorganickou cestu. Na ostatních lokalitách nebyl tento bakteriální podíl zjištěn a mobilizace rizikových složek z hlušinového odvalu i ložiskových hornin v podzemí je tedy způsobena čistě anorganickými procesy.

V případě lokality Okrouhlá Radouň a Vítkov byla bakteriální přítomnost potvrzena, bakterie však jako svůj živný substrát nevyužívaly zdrojový materiál, ale až druhotně vzniklé redukované sloučeniny, vzniklé z důvodu poklesu oxidačně-redukčního potenciálu v důsledku rozkladu bioty.

V jednom případě na lokalitě Okrouhlá Radouň a Zadní Chodov byly bakterie potvrzeny na místě odběru vzorku tekutého i tuhého pouze v tuhém a nikoli tekutém.

V jednom případě na lokalitě Vítkov a Zadní Chodov nebyla potvrzena přítomnost železo oxidujících bakterií a to i přes přítomnost Fe^{2+}, kde by se jejich přítomnost dala očekávat.

Obecně lze také předpokládat, že působení menšího počtu bakterií na lokalitách Okrouhlá Radouň, Vítkov a Zadní Chodov je způsobeno vyššími hodnotami pH prostředí než je ideální pro bakteriální rozvoj.

Lepší představu o bakteriálním působení by poskytly detailnější chemické analýzy.

Mikroskopická pozorování prokázala pouze grammnegativní tyčinky, odpovídající v daných podmínkách nejpravděpodobněji druhům *Acidithiobacillus ferrooxidans* a *Acidithiobacillus thiooxidans*. Z oblastí Okrouhlá Radouň, Zadní Chodov a Zlaté Hory byly zjištěny jak železo, tak i síru oxidující bakterie. Jde pravděpodobně o bakterii *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Dále ve dvou případech na lokalitě Okrouhlá Radouň a ve všech pozitivních případech na lokalitě Vítkov byla potvrzena přítomnost síru oxidujících bakterií, pravděpodobně tedy *Acidithiobacillus thiooxidans*. V žádném případě se nepotvrdila kultivací na tekutých médiích ani mikroskopickým pozorováním přítomnost bakterie *Leptospirillum ferrooxidans*.

Vzorky, které byly vyhodnoceny během kultivace jako pozitivní na přítomnost železo a/nebo síru oxidujících bakterií, byly testovány na tuhém živném médiu. Až na malé výjimky se růst na pevných médiích prokázal. Komplikovaná fyziologie daných bakterií je zřejmě důvodem, že ne vždy tekuté sirné kultury oxidovaly sirné látky na pevné půdě (přednostně

využívaly železo). Při dalších pokusech by bylo dobré testovat odděleně oxidaci železa nebo síry na tuhém médiu obsahujícím pouze jeden nebo druhý substrát.

Vybrané tři vzorky, dva ze Zlatých Hor, jeden z Okrouhlé Radouně byly testovány na rychlost oxidace Fe^{2+} pro srovnání oxidačních rychlostí. Přestože vzorek z Okrouhlé Radouně pochází ze zcela jiné lokality a mohl by být ovlivněn uranovou příměsí v hornině, rychlosti biooxidace Fe^{2+} se zásadně neliší od vzorků ze Zlatých Hor. Protože v abiotických podmínkách kyselého prostředí je rychlost oxidace Fe^{2+} zanedbatelná oproti výše zmíněným bakteriálním procesům, poukazuje to na vysoký potenciál bakterií v oxidaci sulfidů železa, vyúsťující v tvorbu železitých minerálů a kyseliny sírové.

6 Použitá literatura

Barrett J.- Hughes M. N.- Karavaiko G. I. & Spencer P. A. (1993): Metal extraction by bacterial oxidation of minerals. — Ellis Horwood, New York 1993.

Beolchini F.- Pagnanelli F.- Ubaldini S.- Massidda R.- Laneia A.- Torol & Veglio F. (2005): Biooxidation of gold-bearing sulphide ores: Gold recovery by two leaching treatments. Proceeding of the 16th International Biohydrometallurgy Symposium, Section 2, 219-226.

Ehrlich L. (1990): Geomicrobiology. — 2nd edition, New York, Marcel Dekker. In: Breiterman Ch. (ed.): Considering the Earth as an Open System, http:// jesse.usra.edu/archive/jesse01-400-05/breiterminfinal.html, 20.12.2005.

Grmela A. (1995): Černé uhlí – Česká část hornoslezské pánve: Vliv důlní činnosti na vody a horninové prostředí v oblasti ostravské dílčí pánve – likvidovaný důl Heřmanovice v Ostravě Heřmanovicích — Zpráva grantu aqua test-stavební geologie, a.s. Praha, grant č. 41950320, str. 1-50.

Johnson D.B. (2003): Chemical and microbiological characteristics of mineral spoils and drainage waters at abandoned coal and metal mines. — Water, Air, and Spoil Pollution 3, p. 47-66.

Kafka J. (ed.) (2003): Rudné a uranové hornictví České republiky, ANAGRAM.

Kleinmann R.I.P.- Crerar D.A. & Pacelli R.R. (1981): Biogeochemistry of acid mine drainage and a method to control acid formation. — Mining Eng., p. 300-305, March 1981.

Mandl M. (1984): Growth and respiration kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* limited by CO_2 and O_2. — Biologia 39, 429-434.

Mandl M. & Nováková O. (1993): An ultraviolet method for the determination of oxidation of iron sulphide minerals by bacteria. — Biotechnol. Tech. 7, 573-574.

Nagpal S.- Dahlstrom D. & Oolman, T. (1993): Effect of carbon dioxide concentration on the bioleaching of a pyrite arsenopyrite ore concentrate. — Biotechnol. Bioeng. 41, 459-464. John Wiley&Sons, Inc.

Näveke R. (1986): Bacterial leaching of ores and other materiále. - Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig, Fed. Rep. Germany.

Rawlings D.E. (1997): Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes. — Springer Berlin.

Rawlings D.E.(2002): Heavy metal mining microbes. - Annual Review of Mikrobiology 56, 65-91.

Rawlings D.E.(2005): Characteristics and adaptability of iron- and sulfur- oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerále and their concentrates. Microbial cell Factories, 1475 – 2859.

Rohwerder T.- Gehrke T. & Sand W. (2003): Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. - Appl. Microbiol. Biotechnik., 63, 239-248.

Stumm W. & Morgan J.J. (1996): Aquatic chemistry, — 3rd edition, New York: Wiley-interscience.

Šráček O.- Datel J. & Mls J. (2002): Kontaminační hydrogeologie. — 2. upravené vydání. Univerzita Karlova v Praze. Karolinum. Praha.

Younger P.L.- Banwart S.A. & Hedin R.S. (2002): Mine Water: Hydrology, Pollution, Remediation. — In: Alloway B.J., Trevors J.T. (editors): Environmental pollution, Vol. 5. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht. p. 65-70.