VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ – TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA
HORNICKO-GEOLOGICKÁ FAKULTA
INSTITUT ENVIRONMENTÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

BIOREMEDIAČNÝ POTENCIÁL BAKTÉRIÍ V UVOĽŇOVANÍ ARZÉNU Z POCHOVANÝCH ELEKTRÁRENSKÝCH POPOLOV



KATARÍNA PEŤKOVÁ
ĽUBOMÍR JURKOVIČ
HANA VOJTKOVÁ

2016

BIOREMEDIAČNÝ POTENCIÁL BAKTÉRIÍ V UVOĽŇOVANÍ ARZÉNU Z POCHOVANÝCH ELEKTRÁRENSKÝCH POPOLOV

© Mgr. Katarína PEŤKOVÁ, PhD.
© RNDr. Ľubomír JURKOVIČ, PhD.
© Doc. Mgr. Hana VOJTKOVÁ, Ph.D.

Recenzenti:

prof. RNDr. Peter ANDRÁŠ, CSc.
Ing. Miroslav MINAŘÍK

Vydala:

VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ -TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA
Hornicko-geologická fakulta, Institut environmentálního inženýrství

Rukopis neprešiel jazykovou korektúrou.

Vydanie: prvé (2016)

ISBN 978-80-248-3999-8

OBSAH

ÚVOD 1

1. PÔVOD A CHARAKTER KONTAMINÁCIE PREDMETNÉHO ÚZEMIA 4

2. MODELOVÁ LOKALITA ZEMIANSKE KOSTOĽANY 8

2.1 Prírodné pomery regiónu 8
2.1.1 Geologická stavba 8
2.1.2 Hydrogeologická charakteristika 11
2.1.3 Pedologická charakteristika územia 12
2.1.4 Klimatické pomery 13
2.2 Tepelná elektráreň Nováky 14

3. GEOCHEMICKÁ CHARAKTERISTIKA UHLIA A ELEKTRÁRENSKÝCH POPOLOV 16

3.1 Chemické a minerálne zloženie uhlia 16
3.1.1 Zastúpenie a distribúcia arzénu v uhlí 16
3.2 Vplyv teploty na premenu minerálnych fáz počas spaľovania uhlia 21
3.2.1 Termodynamika arzénu počas spaľovania uhlia 22
3.3 Chemické zloženie a pôvod minerálnych fáz polietavého popola 23
3.3.1 Rozdelenie polietavých popolov do tried F a C 26
3.3.2 Minerálne zloženie polietavého popola 27
3.3.3 Potenciálne toxické prvky v polietavom popole 29
3.4 Podmienky vylúhovateľnosti prvkov z popolov 33
3.5 Chemické a minerálne zloženie čerstvého a pochovaného popola na lokalite Zemianske Kostoľany 34
3.5.1 Minerálne zloženie čerstvého a pochovaného popola 37
3.5.2 Elektrónová mikroanalýza amorfných skiel 39
3.5.3 Pevné fázy obohatené o arzén 42
3.6 Mineralógia pochovaných popolov v neporušených vzorkách 43

4. DIVERZITA BAKTÉRIÍ V POCHOVANÝCH ELEKTRÁRENSKÝCH POPOLOCH NA LOKALITE ZEMIANSKE KOSTOĽANY 46

5. ENVIRONMENTÁLNY VÝZNAM MIKROORGANIZMOV V PROCESOCH BIOTRANSFORMÁCIE POTENCIÁLNE TOXICKÝCH PRVKOV 56

5.1 Interakcie mikroorganizmov s potenciálne toxickými prvkami 57
5.1.1 Bunkové zložky a procesy ovplyvňujúce mobilitu a imobilitu PTP 58
5.1.2 Bunkové procesy využívané v remediácii kontaminovaného prostredia 62
5.2 Bioremediačný potenciál mikroorganizmov 81
5.2.1 Biolúhovanie As pôsobením autochtónnej mikroflóry a rodu *Pseudomonas* 84
5.2.2 Biolúhovanie As pôsobením autochtónnej mikroflóry a alochtónneho rodu *Rhodococcus* 100
5.2.3 Biostimulácia a bioaugmentácia autochtónnych mikroorganizmov – účinný nástroj bioremediácie technozemí kontaminovaných arzénom 112

6. ZÁVER 116

POUŽITÁ LITERATÚRA 118

ÚVOD

Problematika odstraňovania znečisťujúcich látok z prírodného prostredia a následného znižovania zaťaženia životného prostredia je v súčasnosti mimoriadne aktuálnou tématikou v rôznych vedeckých odboroch. Znečistené územia a s nimi súvisiace environmentálne záťaže si v posledných rokoch vyžiadali zvýšenú pozornosť celej vedeckej a odbornej spoločnosti, vzhľadom na zložitosť problematiky a potrebu komplexného prístupu ku exaktnému hodnoteniu znečistenia a následne aj pri realizácii nápravných opatrení. Výskum v oblasti inovatívnych sanačných technológií prináša zaujímavé výsledky z hľadiska potenciálnej realizácie účinných metód čistenia horninového prostredia a pevných materiálov prírodného alebo antropogénneho charakteru. Najmä kombinácia biologických postupov s klasickými fyzikálno-chemickými a mechanickými metódami sanácie vedie ku úspešnej remediácii kontaminovaných pôd, zemín a antropogénnych sedimentov.

Bioremediácia je prirodzený proces, ktorý sa opiera o schopnosti pôdnych mikroorganizmov (baktérie a huby) a vyšších rastlín meniť biologickú dostupnosť (polo)kovov. Vďaka ekologickému prístupu k životnému prostrediu má bioremediácia značný potenciál pri dekontaminácii pôd s vysokým obsahom toxických prvkov, vrátane As. Bioremediačný účinok môže byť zvýšený pridaním rôznych organických doplnkov (biostimulácia, bioaugmentácia), ktoré môžu podporiť metabolické aktivity mikroorganizmov v dekontaminácii prostredia (Alexander, 1999; Mrozik a Piotrowska-Seget, 2010).

Biologické metódy využívajú genetickú diverzitu a metabolickú mnohostrannosť mikroorganizmov na transformáciu kontaminantov na menej škodlivé alebo neškodné produkty následne integrované do prirodzených biogeochemických cyklov, prípadne napomáhajú ku ich postupnému odstraňovaniu z pôdneho profilu resp. z pevných substrátov sedimentov. Biologické technológie pre dekontamináciu zložiek životného prostredia sú založené na využívaní schopností mikroorganizmov spotrebovať kontaminujúce látky ako zdroje uhlíka na získavanie energie pre životné funkcie alebo ich transformácii na iné zlúčeniny v prítomnosti kosubstrátu. Pri aplikácii biologických postupov je však nevyhnutné čo najlepšie poznať schopnosti a vlastnosti mikroorganizmov, ako aj detailné vlastnosti prostredia, v ktorom sa znečistenie vyskytuje. Medzi mikroorganizmy, ktoré hrajú kľúčovú úlohu pri potenciálnom odstraňovaní kontaminantov zo zložiek životného prostredia, patria predovšetkým baktérie, aktinomycéty a mikroskopické huby. Pre úspešnú aplikáciu bioremediačných metód v rámci sanácií je nevyhnutná znalosť vlastností autochtónnych mikrobiálnych populácií, ich schopnosť

zúčastňovať sa rozkladu nežiadúcich látok v danom prostredí a zistenie podmienok potrebných pre optimalizáciu ich činnosti (Frankovská et al., 2010).

Medzi významné znečisťujúce materiály v životnom prostredí patria aj elektrárenské popoly, pričom ich detailné štúdium je v popredí záujmu z dôvodu hodnotenia ich negatívneho vplyvu na životné prostredie a rizík spojených s existenciou odkalísk na deponovanie popolov. Kľúčové riziko predstavujú vysoké koncentrácie potenciálne toxických prvkov v popoloch, ktoré predstavujú potenciálny zdroj kontaminácie zložiek životného prostredia. Pôsobením atmosférických zrážok alebo podzemnej vody dochádza k vylúhovaniu nebezpečných látok a prvkov z nestabilného odkaliskového materiálu do životného prostredia (EPRI, 2006). Uvoľnené prvky sa tak dostávajú do povrchových a podzemných vôd, odkiaľ následne prechádzajú do pôdy, kde redukujú počet mikro- a makro- organizmov, ovplyvňujú hodnoty pH pôdy, zasahujú do bilancie prístupných živín a do dynamiky početných fyzikálnych, chemických a biologických procesov v pôde. Zabudovaním do rastlinných pletív a plodov sa prvky stávajú súčasťou kolobehu látok v prírode. Na základe vyššie uvedených vplyvov sa deponované elektrárenské popoly považujú za vysoko rizikové antropogénne materiály.

Vážnym environmentálnym problémom v rámci Slovenska je výskyt arzénu v elektrárenských popoloch deponovaných na viacerých lokalitách a najmä prítomnosť popolov s vysokými obsahmi As v pôdnom profile alúvia rieky Nitra ako dôsledok havárie odkaliska v Zemianskych Kostoľanoch. Odstránenie As z kontaminovaného prostredia je pomerne zložité, keďže As nie je možné chemicky ani biologicky degradovať a jeho toxicita v pôde predstavuje zdravotné riziko. Dôležitú úlohu v mnohých reakciách, ktoré ovplyvňujú špeciáciu As a od toho sa odvíjajúcu toxicitu a mobilitu, majú mikroorganizmy. Heterotrofné mikroorganizmy (predovšetkým vláknité huby a baktérie) sú čoraz častejšie využívané v biolúhovaní ako súčasť bioremediačných procesov. Je to hlavne vďaka tvorbe organických kyselín, aminokyselín a ďalších metabolitov, ktorými sú schopné okysľovať svoje prostredie a spôsobujú tak rozpustnosť a extrahovateľnosť prvkov (Bosecker, 1997; Krebs et al., 1997). Na rozdiel od väčšiny polokovov môže As vytvárať plynné zlúčeniny (Mahimairaja et al., 2005; Bolan et al., 2013) a biovolatilizácia zvyšuje potenciálnu mobilitu As v prostredí prostredníctvom enzymatickej premeny anorganických alebo organických foriem As na jeho prchavé deriváty (Michalke et al., 2000).

Elektrárenské popoly s vysokým obsahom arzénu na modelovej lokalite starej environmentálnej záťaže, ktoré sú predmetom štúdia v tejto monografii, boli skúmané pomocou širokého spektra mineralogických, geochemických a mikrobiologických metód. Výskum bol zameraný na detailné definovanie minerálneho zloženia čerstvých popolov a popolov pochovaných pod poľnohospodárskymi pôdami so zameraním na výskyt arzénu, a taktiež ich vplyv na biodiverzitu

pôdnych mikroorganizmov, ktorá sa rozvinula vplyvom dlhodobej expozície arzénom. Dôkazom vysokej adaptačnej schopnosti mikroorganizmov v skúmanom antropogénnom materiáli je aj izolácia a identifikácia niekoľkých nových bakteriálnych kmeňov, čo dáva predpoklad ich využitia v bioremediácii daného územia. Okrem charakterizácie elektrárenského popola a mikrobiologického štúdia pôdnej diverzity hodnotí táto komplexná štúdia aj bioremediačný potenciál autochtónnych mikroorganizmov odstraňovať kontamináciu spôsobenú prítomným arzénom. Účinnosť odstraňovania arzénu z reálnych vzoriek pôd pochádzajúcich z jednej z najviac kontaminovaných lokalít na území Slovenska bola experimentálne overená nielen aplikovaním selektívnych pôvodných bakteriálnych druhov, ale aj aplikáciou alochtónneho bakteriálneho druhu.

Výsledky prezentované v tejto monografii boli získané vďaka finančnej podpore grantových úloh: VEGA 1/0321/14 „Geochemické podmienky aplikácie autochtónnych druhov mikroorganizmov v remediačných procesoch biolúhovania kontaminovaných pôd arzénom (pilotná lokalita Zemianske Kostoľany)“ (odpovedný riešiteľ RNDr. Ľ. Jurkovič, PhD.), grant UK/26/2013 „Geochemické podmienky aplikácie autochtónnych druhov baktérií z kontaminovaných pôd v remediačných procesoch biolúhovania na modelovej lokalite Zemianske Kostoľany“ (zodpovedný riešiteľ Mgr. K. Peťková).

1. PÔVOD A CHARAKTER KONTAMINÁCIE PREDMETNÉHO ÚZEMIA

Región Horná Nitra patrí ku geogénno-antropogénne kontaminovaným regiónom, kde je kvalita životného prostredia ovplyvnená nielen geologickým prostredím (geogénna kontaminácia), ale taktiež antropogénnou kontamináciou v dôsledku využívania krajiny. Kombináciou geologických a antropogénnych zdrojov znečistenia sa daný región vyznačuje zvýšenou úrovňou kontaminácie všetkých zložiek životného prostredia. Dlhoročná ťažba hnedého uhlia má výrazný vplyv na kvalitu životného prostredia, keďže uhlie obsahuje vysoké obsahy potenciálne toxických prvkov (As, Cd, Hg, F a S), ktoré sú mobilizované a prenášané z prostredia ložiska do okolia vplyvom ťažby, úpravy a spracovania uhlia (Klukanová et al., 2005). Kontaminácia zložiek životného prostredia (vôd, pôd a sedimentov) súvisí hlavne s prítomnosťou arzénu. Z ďalších kontaminantov sa vo zvýšených obsahoch vyskytujú aj Cd a Pb, avšak ich úroveň kontaminácie je v porovnaní s As výrazne nižšia (Rapant et al., 2005).

V pilotnom území – Zemianske Kostoľany – je situované Pôvodné odkalisko, ktoré slúžilo na ukladanie naplavovaného elektrárenského popola zo spaľovania hnedého uhlia z prevádzky ENO Nováky. Primárne bolo odkalisko budované len na ukladanie škváry a popola. V roku 1963 sa rozhodlo o využívaní plochy odkaliska aj na ukladanie vápenného mlieka a chloridu vápenatého z Chemických závodov v Novákoch. V roku 1965 sa po intenzívnych dažďoch pretrhla základná hrádza Pôvodného odkaliska, na ktoré sa elektrárenský popol z ENO Nováky naplavoval. Do okolia sa v dôsledku stekutenia odkaliskového materiálu vylialo cca 3 milióny ton popola (obr. 1). Podľa dokumentu Týždeň vo filme z roku 1970 prišli v deň havárie o život traja ľudia. Voda zmiešaná s popolom unikala do doliny 5 dní, počas ktorých klesla hladina odkaliska o 3 metre. Primárnym dôvodom havárie bolo práve vytváranie nepriepustných vrstiev vápenných kalov, ktoré bránili odtoku vody smerom k drenážnemu systému (Slovenská energetika, 2011).



Obr. 1 Pohľad na rozplavený odkaliskový materiál po pretrhnutí hrádze

V pôdach a vodách regiónu Horná Nitra zanechala havária preukázateľné zmeny. Odhadovaná rozloha kontaminovanej, prevažne poľnohospodárskej pôdy, predstavuje približne 19 000 ha a rieka Nitra sa radí medzi najznečistenejšie rieky v strednej Európe. V rámci remediačných opatrení sa približne 1 m hrubá vrstva naplaveného popola (lokálne aj viac ako 2 m) prekryla cca 30 - 40 cm vrstvou zeminy (obr. 2, Veselská et al., 2013). Materiál s vysokým obsahom As bol riekou Nitra rozplavený až do vzdialenosti 100 km.



Pochované antropogénne sedimenty tvoria typ starých ekologických záťaží, ktoré možno definovať ako človekom vytvorené objekty v prírodnom prostredí s predpokladaným vplyvom na viaceré zložky životného prostredia. V súčasnosti sú antropogénne sedimenty podobného charakteru v obmedzenom rozsahu predmetom sledovania v rámci Čiastkového monitorovacieho systému, ktorý vykonáva Štátny geologický ústav Dionýza Štúra v Bratislave (ČMS, 2013).

Obr. 2 Modelový pôdny profil s pochovanými popolmi
(lokalita Zemianske Kostoľany, Veselská et al., 2013)

Viacerí autori sa z rôznych aspektov venovali hodnoteniu miery znečistenia predmetného územia Horná Nitra ovplyvneného energetickým priemyslom a banskou činnosťou (Keegan et al., 2002; Čurlík, 2003; Jurkovič et al., 2008, 2011 a i.). Taktiež mnoho vedeckých štúdií sa zaoberalo expozíciou obyvateľstva arzénom pochádzajúceho zo spaľovania uhlia v okrese Prievidza (napr. Wilhelm et al., 2005; Mikulková et al., 2007; Bencko et al., 2009). Zhodnotenie výskytu zvýšených koncentrácií arzénu ako potenciálneho faktora pre vznik nemelanómovej rakoviny kože popisuje štúdia Pesch et al. (2002). Komplexný medicínsko-geochemický výskum zaťaženého prostredia arzénom prezentuje aj štúdia Krčmová a Rapant (2007). Nosnou časťou týchto štúdií sú práve geochemické faktory, ktoré majú priamy vplyv na zdravotný stav obyvateľstva. Vplyv vybraných geologických faktorov na kvalitu života v regióne Horná Nitra je predmetom rozsiahlej štúdie Bodiš et al. (2006), kde v rámci geochemických prác boli odobraté a analyzované vzorky podzemných vôd, pôd, riečnych sedimentov a rastlinné vzorky. Z výsledkov výpočtu indexu environmentálneho rizika vyplýva, že plošne najrozsiahlejšou

kontaminovanou zložkou geologického prostredia Hornej Nitry z hľadiska prekročenia normovaných hodnôt sú povrchové vody, potom podzemné vody a najmenšie prekročenie je v prípade pôd, avšak pôdy a podzemná voda sú najdôležitejšie zložky z hľadiska zdravotného rizika. Zvýšené riziko vzniku chronických a rakovinových ochorení z kontaminácie arzénu bolo zistené hlavne v obciach Zemianske Kostoľany, Prievidza, Sebedražie, Bystričany, Oslany, Čereňany, Nováky a Malé Kršteňany (Rapant et al., 2005). Obsahy potenciálne toxických prvkov v povrchových vodách regiónu Horná Nitra sú približne rovnaké ako v podzemných vodách. Výrazné zvýšenie bolo pozorované len v prípade arzénu. Aj hlavné toky regiónu – Nitra, Handlovka a Nitrica odrážajú vysokú antropogénnu zaťaženosť regiónu Hornej Nitry. V profile rieky Nitry v odberovom mieste v obci Chalmová bol pozorovaný približne 2-násobný nárast rozpustených látok. Z anorganických makrokomponentov bol zistený vysoký nárast chloridov – až 10-násobný (Rapant et al., 2005). Priemerný obsah As v riečnom sedimente za obdobie 1996 až 2012 je 43,68 ± 33,57 $mg.kg^{-1}$. Dané odberové miesto má taktiež aj vysoký obsah Hg – v priemere 22,27 ± 32,39 $mg.kg^{-1}$ (ČMS, 2013). Podľa záverečnej správy ČMS za rok 2012, prekračuje lokalita Nitra – Chalmová limitné koncentrácie prvkov As a Hg kategórie B (indikujúc silné znečistenie), a to podľa Rozhodnutia MP SR č. 531/1994-540 pre neštandardizovaný sediment. V prípade Hg bola prekročená aj limitná koncentrácia kategórie C pre neštandardizovaný aj štandardizovaný sediment (ČMS, 2013). Znečistenie v lokalite Nitra - Chalmová má hneď niekoľko zdrojov. Riečne sedimenty ako aj povrchový tok sú ovplyvnené odkaliskami elektrárenských popolov z ENO v Zemianskych Kostoľanoch (Pôvodné a Dočasné odkalisko) a Definitívnym odkaliskom v Chalmovej, ale taktiež výrobou v Novákych chemických závodoch a banskou činnosťou. Dlhodobý monitoring riečnych sedimentov, ako aj kvalita povrchového toku na danom odberovom mieste v Chalmovej, poukazuje na výraznú a dlhodobú kontamináciu rieky Nitra, ktorá je zaťažená baníctvom a priemyselnou činnosťou (energetický a chemický priemysel).

Materiál riečnych sedimentov sa vyznačuje relatívne silnou sorpčnou schopnosťou a vysokou sorpčnou kapacitou. Vďaka tomu sú kontaminanty rôzneho druhu a genézy zachytené a pretrvávajú v nich. Keďže riečne sedimenty len v obmedzenej miere odrážajú náhodné a krátkodobé vplyvy, slúžia ako dlhodobý indikátor stupňa znečistenia geologickej zložky životného prostredia. Z hľadiska znečistenia však riečne sedimenty predstavujú zdroj kontaminácie zložiek životného prostredia, keďže pri zmene určitých podmienok môže dôjsť k uvoľneniu potenciálne toxických prvkov (PTP), ktoré sa v prostredí riečneho sedimentu akumulujú (Bodiš a Rapant, 1999; Singh et al., 2002; Hiller et al., 2009; Jankulár et al., 2009). Podľa štúdie Rapant et al. (2005) sa z hľadiska obsahov makroprvkov riečne sedimenty v oblasti Hornej Nitry vyznačujú obsahmi charakteristickými blízko priemeru pre Slovensko. Z hodnotených prvkov sú výrazne vyššie obsahy len v prípade As a Hg. Najvyššie obsahy As

v priemere boli zdokumentované v oblasti obcí Zemianske Kostoľany, Sebedražie a v Prievidzi (v priemere viac ako 100 $mg.kg^{-1}$). Maximálne obsahy As v jednotlivých vzorkách prevyšujú 500 $mg.kg^{-1}$, pri stanovenej maximálne koncentrácii arzénu 713 $mg.kg^{-1}$. Vysoké obsahy súvisia práve s haváriou odkaliska v roku 1965. Pažická a Ballová (2013) sledovali mieru mobility PTP z riečnych sedimentov z lokality Nitra – Chalmová. Extrakciou riečneho sedimentu s roztokom 1M HCl sa uvoľnilo 21,7 % Cu, 20,1 % As a 15,8 % Zn, pričom vyšší podiel prvkov sa do výluhu uvoľnil z celkovej frakcie ako z vyseparovanej ťažkej frakcie. Podiel uvoľneného Sb a Pb sa pohyboval do 14 %. Aj napriek použitiu silného extrakčného činidla nedošlo k vylúhovaniu veľkého podielu PTP, čo môže naznačovať, že vysoké celkové obsahy v riečnych sedimentoch nemusia predstavovať riziko pre ostatné zložky životného prostredia (Pažická et al., 2014). V prípade podzemných vôd sú obsahy makroprvkov, hodnoty celkovej mineralizácie aj obsahy PTP v oblasti Hornej Nitry celkovo blízke priemerným hodnotám SR, len v prípade As sú obsahy vyššie (Bystričany, Nitrica, Prievidza a Sebedražie) (Rapant et al., 2005). Najviac postihnutá oblasť po havárii Pôvodného odkaliska sa nachádza medzi obcami Zemianske Kostoľany, Čereňany a Malé Kršteňany, v ktorej miestne pestované poľnohospodárske plodiny vysoko prekračujú limitné hodnoty Potravinového kódexu SR, napr. pre Pb viac ako 10-násobne (Rapant et al., 2005).

2. MODELOVÁ LOKALITA ZEMIANSKE KOSTOĽANY

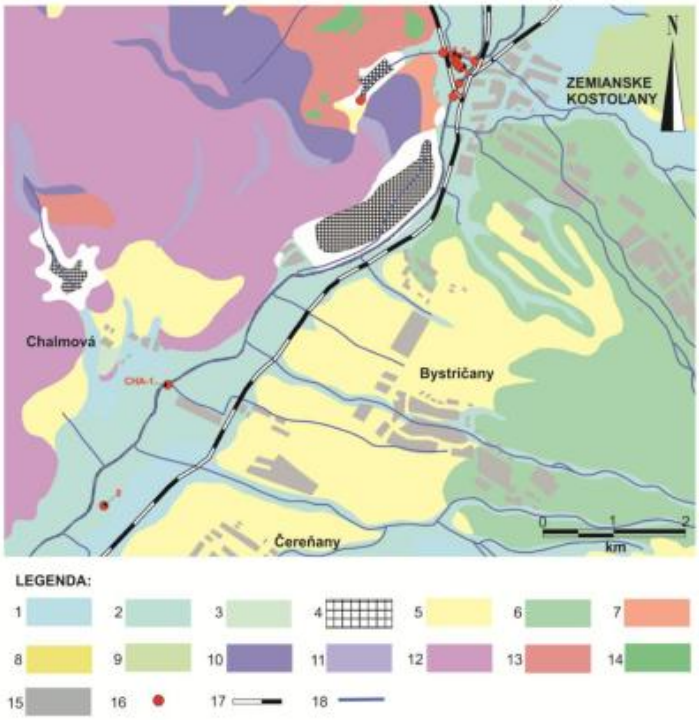
2.1 Prírodné pomery regiónu

2.1.1 Geologická stavba

Hornonitriansku kotlinu ohraničujú zo severu a západu pohoria Strážovské vrchy a Žiar, na juhovýchode vystupuje neovulkanické pohorie Vtáčnik a na východe sčasti aj Kremnické vrchy. Samotná kotlina sa rozdeľuje na Prievidzskú, Handlovskú, Rudniansku a Oslanskú kotlinu. Územie má pahorkatinný ráz, až rovinný charakter v poriečnej nive. Lemujúce pohoria majú vrchovinový charakter. Hornonitrianska kotlina predstavuje poklesovú megaštruktúru so zlomovou tektonikou. Západným okrajom prechádza zlomová línia SV-JZ smeru, ktorá sa tiahne pozdĺž jadrového pohoria Malá Magura a oddeľuje triasové vápence a dolomity od neogénnych sedimentov. Územie tvoria horniny kryštalinika, mezozoika, paleogénu, ale najmä neogénne vulkanity a molasové sedimenty neogénu a sedimenty kvartéru. Z hľadiska regionálneho geologického členenia Západných Karpát (Vass et al., 1988) do regiónu Hornej Nitry zasahujú nasledujúce jednotky: vulkanity Vtáčnika, Hornonitrianská kotlina, bojnický paleogén, Handlovská kotlina, vulkanity Kremnických vrchov, Žiar a Strážovské vrchy. Vulkanity Vtáčnika reprezentujú relikty sarmatského vtáčnického stratovulkánu, ktorý je v nadloží rozptýlených vulkanitov a vulkanicko-sedimentárnych súvrství bádenu až spodného sarmatu, nadväzujúcich na výplň Hornonitrianskej kotliny. Kryštalinikum sa vyskytuje na severnom okraji územia. Pestré neogénne sedimenty tvoria výplň kotliny. Svahové sedimenty a aluviálne náplavy riek predstavujú horniny kvartéru (Ženišová et al., 2005). Súčasný povrch kotliny je výsledkom erózno-denudačných procesov na štruktúrno-tektonických základoch koncom pliocénu a začiatkom pleistocénu. Pôvodné dno kotliny bolo rozčlenené povrchovými tokmi za vzniku nízkych chrbtov a plytkých dolín, ktoré tvoria kotlinovú pahorkatinu (Šimon, 1997).

Predmetné územie Zemianske Kostoľany sa nachádza v blízkosti styku dvoch orograficko-geologických celkov – masívu Magury a Hornonitrianskej kotliny. Na jej stavbe sa podieľajú nasledovné stratigraficko-litologické útvary (Tyleček et al., 1991):

– kvartér – fluviálno-deluviálne uloženiny,
– terciér – klastické sedimenty a íly,
– stredný trias – dolomity a vápence,
– spodný perm – melafýry a kremence.



Vysvetlivky: 1. proluviálne sedimenty - *kvartér*, 2. fluviálne sedimenty - *kvartér*, 3. fluviálne sedimenty (piesky, štrky) - *kvartér*, 4. antropogénne sedimenty (haldy, skládky, navážky) - *kvartér*, 5. deluviálne svahoviny a sutiny - *kvartér*, 6. proluviálne sedimenty - *kvartér*, 7. brekcie, zlepence, pieskovce - *paleogén* (terchovské vrstvy), 8. štrky, piesky, piesčité prachy, íly - *neogén* (lehotské súvrstvie), 9. epiklastiká - *neovulkanity*, 10. pieskovce, ílovito-piesčité bridlice - *trias* (benkovské súvrstvie), 11. vápence - *trias* (gutensteinské súvrstvie), 12. ramsauské dolomity - *trias*, 13. sedimenty (bridlice, pieskovce, zlepence) - *perm,* 14. nečlenené vulkanity (tholeitové bazalty a ich vulkanoklastiká) - *perm*, 15. sídla, 16. odbery vzoriek, 17. železničná trať, 18. vodný tok.

Obr. 3 Geologická stavba predmetného územia (podľa: www.mapserver.geology.sk)

Na obr. 3 je uvedená schematická geologická mapa širšieho okolia študovanej oblasti, pričom z hľadiska predmetnej štúdie sú najdôležitejšími geologickými jednotkami – kvartér (zahŕňajúci fluviálne sedimenty, vrátane pôd a antropogénne sedimenty) a uhoľné sloje handlovsko-nováckej panvy.

Kvartérne sedimenty

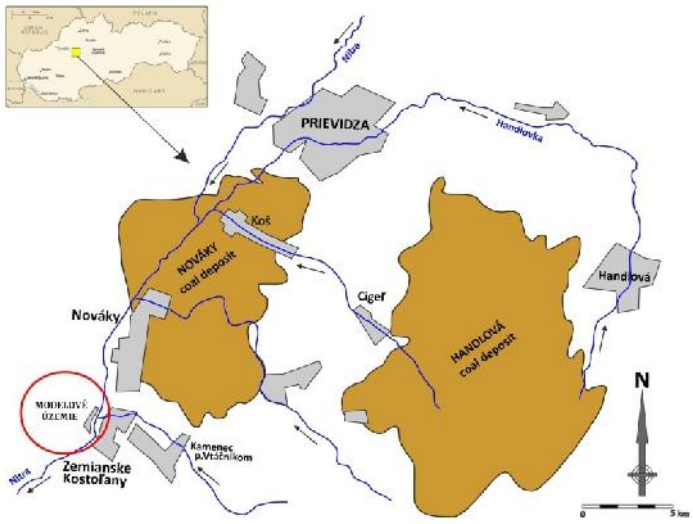
Kvartérne sedimenty v regióne Hornej Nitry sa zaraďujú do nečleneného kvartéru a do obdobia spodného, stredného a vrchného pleistocénu a holocénu. Rozsah a hrúbka kvartérnych sedimentov boli ovplyvnené eróznou a akumulačnou činnosťou rieky Nitry a najmä jej prítokov. Kvartérne sedimenty sú charakteristické výrazným prevládaním proluviálnych sedimentov náplavových kužeľov tvoriacich stupňovitý systém. Najvyššie položené časti dolín na úpätí Malej Magury, Vtáčnika a Hornonitrianskej kotliny zaberajú proluviálne kužele niekoľkých generácií. Proluviálne sedimenty spodného pleistocénu sú zastúpené náplavovými kužeľmi potokov Tužina, Chvojnica, Kanianka a Poruba. Najnižšiu pozíciu v doline rieky Nitry, Handlovky a ich prítokov predstavujú zvodnené fluviálne sedimenty dnovej akumulácie. Na báze dnovej akumulácie Nitry sa nachádzajú prevažne opracované štrky, ktoré smerom k nadloží prechádzajú do drobnejších štrkov. Obliakový materiál je dobre vytriedený, prevláda materiál z kremenca a kremeňa, hojné sú granodiority, pieskovce, andezity, občas karbonáty. Bazálne

vrstvy prechádzajú do hrubozrnných pieskov, na ktorých občas ležia zahlinené štrky mladších náplavových kužeľov (Šimon, 1997).

Kvartérne sedimenty v predmetnom území Zemianske Kostoľany sú zastúpené hlavne fluviálnymi a proluviálnymi sedimentami. Fluviálne sedimenty tvoria prevažne nivné humózne hliny alebo hlinito-piesčité až štrkovito-piesčité hliny dolinných nív. Proluviálne sedimenty predstavujú hlinité až hlinito-piesčité štrky s úlomkami hornín v náplavových kužeľoch bez pokryvu (mapserver.geology.sk).

Uhoľné sloje handlovsko-nováckej panvy

V Slovenskej republike patria ložiská handlovsko-nováckej panvy k najvýznamnejším zdrojom uhlia. Handlovsko-novácka panva má dve uhoľné produktívne súvrstvia – novácke a handlovské. Na obr. 4 je schematická mapa handlovsko-nováckej mapy s lokalizáciou študovaného územia. Ich detailnému geologickému vývoju sa venuje práca Čech a Petrík (1967). Novácke uhoľné ložisko predstavuje najdôležitejší zdroj kaustobiolitov v Slovenskej republike. Novácke súvrstvie bolo vyčlenené ako produktívne vrstvy nováckej uhoľnej panvy na zvýraznenie rozdielov v litologickom vývoji a veku v porovnaní s handlovským súvrstvím. Spodnú časť súvrstvia tvoria piesčito – ílovité a tufitické sedimenty s postupným prechodom do tmavosivých a sivočiernych ílov až ílovcov s uhoľnými slojmi (Šimon, 1997). Hlavný uhoľný sloj sa tiahne od obce Koš až po Kamenec pod Vtáčnikom. Hrúbka sloja je priemerne 8 – 10 m, ojedinele až 25 m. Produktívne súvrstvie dosahuje hrúbku až 50 m. Sloj vystupuje najplytšie k povrchu pri východnom okraji ložiska, kde sa v minulosti aj ťažil v povrchovej bani pri Lehote pod Vtáčnikom (Šimon, 1997). V roku 1990 – 1991 bol uskutočnený mineralogický výskum nováckeho uhoľného ložiska. Z minerálov boli v uhlí identifikované ílové minerály (kaolinit, illit, montmorillonit, halloyzit, hydrosľudy), karbonáty (kalcit, siderit, manganokalcit), oxidy (kremeň, magnetit, opál, limonit), sulfidy (pyrit, arzenopyrit, realgár, auripigment), fosforečnany (apatit, fosforit), sírany (sadrovec, anhydrit, melanterit) a silikáty (biotit, chlorit, amfiboly, muskovit, granáty, plagioklasy, K-živce, pyroxény) (Vrana et al., 1991).



Obr. 4 Schematická mapa handlovsko-nováckej mapy s lokalizáciou študovaného územia (Bolanz et al., 2012)

Handlovské uhoľné ložisko tvorí východnú časť handlovsko-nováckej panvy a je situované hlavne pod centrálnou časťou pohoria Vtáčnik. Nachádzajú sa tu dva dobývacie priestory (DP) – DP Handlová (východná časť ložiska) a DP Cígeľ (západná časť ložiska). Hlbšie podložie tvoria horniny veporika (vápence, sliene a dolomity križňanského príkrovu), ktoré sú takmer na celom ložisku pokryté hronikom reprezentovaným malužinským súvrstvím melafýrových hornín. Paleogén je zastúpený ílovcami, piesčitými slieňmi a slienitými ílmi s polohami pieskovcov (Machajová et al., 2000). Handlovské súvrstvie (produktívne vrstvy) bolo vyčlenené ako ílovcovo – tufitické súvrstvie s uhoľnými slojmi v handlovskej uhoľnej panve (Šimon, 1997). Súvrstvie je rozšírené v oblasti handlovského a cígeľského uhoľného ložiska. Jeho spodná hranica s kamenským súvrstvím je neostrá, tvorená je postupným zjemňovaním tufitov, prítomnosťou tufitických a postupne uhoľných ílov. Vrchná hranica je daná povrchom vrchného uhoľného sloja (Šimon, 1997). Uhlie po uhľopetrografickej stránke patrí k hnedouhoľným humitom s nízkym obsahom popolovín (Machajová et al., 2000). Hrúbka uhoľného sloja je premenlivá (2,5 – 16 m). Kvalita uhoľného sloja vyjadrená výhrevnosťou je v SZ časti 10 až 15 $MJ.kg^{-1}$ a v JV časti 13 až 25 $MJ.kg^{-1}$ (Machajová et al., 2000). Nadložie uhoľného sloja tvoria sivé pelitické sedimenty („nadložné íly“), ktoré predstavujú košianske súvrstvie. Vyššie nadložie tvorí detriticko-vulkanická formácia – lehotské súvrstvie, tvorené preplavenými ílmi, tufitickými ílmi a polohami zlepencov. Vzácne sa vyskytujú tenké polohy andezitových brekcií. Nad týmto súvrstvím sa nachádzajú andezity a ich pyroklastiká – vtáčnická formácia (Machajová et al., 2000). Z mineralogického hľadiska tvorí hlavnú minerálnu prímes uhoľného sloja ílový a tufogénny materiál, pyrit, markazit, realgár, auripigment a rôzne modifikácie kremeňa a sadrovca (Machajová et al., 2000).

2.1.2 Hydrogeologická charakteristika

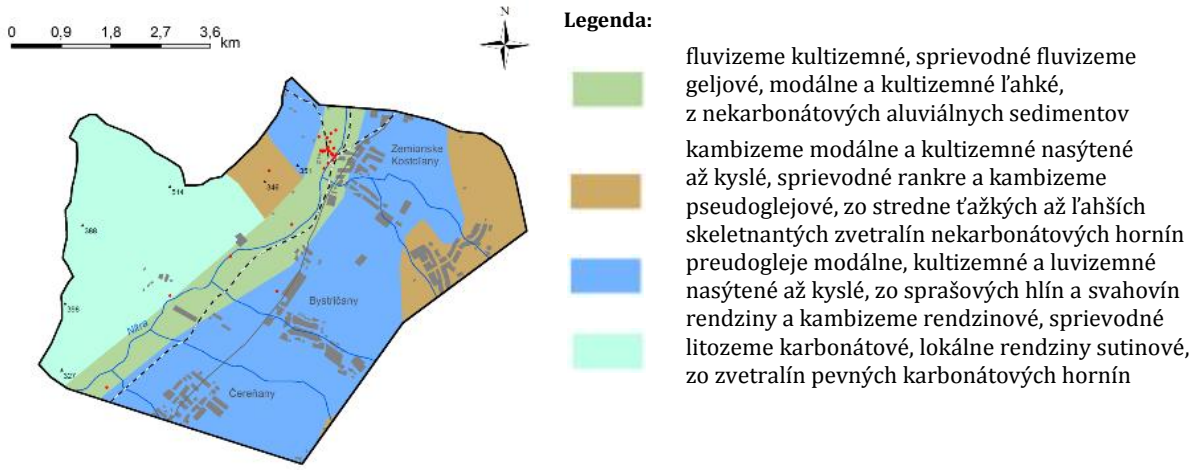
Región Horná Nitra patrí do vrchovinovo nížinnej až strednohorskej oblasti. Režim odtoku je charakterizovaný ako dažďovo – snehový až snehovo-dažďový. Najvyšší prietok dosahujú toky v období jarných mesiacov od marca do mája. Minimálne prietoky sú hlavne v septembri. Podzemná voda v súvrství je priamo dotovaná z atmosférických zrážok, ale najmä z povrchových vôd rieky Handlovka, ktorá je vyššie položená ako rieka Nitra. Antropogénnou činnosťou sú najviac ovplyvnené toky Nitra, Handlovka a Nitrica.

Lokalita Zemianske Kostoľany sa nachádza na rozhraní dvoch hydrogeologických rajónov. Prvým je „neogén a kvartér Hornonitrianskej kotliny“, ktorý je budovaný dvoma základnými komplexami: sedimenty pliocénu dosahujú hrúbku 300 m a sú zastúpené pestrými fáciami kontinentálneho vývoja (ílovce, íly a šlíry) a detriticko-vulkanická formácia s prevahou ílov a štrkov. Druhý rajón predstavuje „mezozoikum a paleogén južnej časti Strážovských vrchov“.

Kvartér je v severnej časti tvorený kamenito-hlinitou suťou a v južnej časti územia sú to piesčité štrky, ktoré v kvartéri predstavujú kolektor podzemnej vody. Obe fácie sú prekryté piesčitými hlinami rozdielnych hrúbok. Z hydrologického hľadiska patrí územie do povodia rieky Nitry. Z hornej a strednej časti do nej priteká mnoho menších tokov. Z východnej strany ohraničuje oblasť prítok Handlovka. Z hľadiska hydrogeologickej rajonizácie vrchný úsek rieky Nitry patrí do mezozoika Lúčanskej Fatry, stredný úsek rieky Nitry a spodný úsek riek Nitry, Tužinej, Chvojnice a Handlovky patrí do neogénu a kvartéru Hornonitrianskej kotliny (s medzizrnovou priepustnosťou). Na území sa nachádzajú zvodnené pleistocénne a holocénne sedimenty, ktoré reprezentujú dnové akumulácie štrkov, pieskov, zahlinených štrkov a hlín nív riek Nitry a Handlovky (Vaškovský, 1973 in ČMS, 2011; Tyleček et al., 1991; Atlas krajiny SR, 2002; Ženišová et al., 2005; Bodiš et al., 2006).

2.1.3 Pedologická charakteristika územia

V regióne Horná Nitra majú najväčšie zastúpenie kambizeme, luvizeme a rendziny (obr. 5). Stav a kvalita humusu závisí od hydrotermického režimu pôd, ktorého nižší obsah a kvalita je výsledkom aktuálnych erózno-akumulačných procesov. Na andezitovom podklade dominujú kambizeme (hnedé pôdy) s rôzne svetlým humusovým horizontom. V pohoriach a na svahoch sa vytvorili podzoly so silne kyslou reakciou a akumuláciou železa a hliníka. Hnedozeme s tenkým humusovým horizontom s obsahom skeletu sa vyskytujú na sprašiach alebo sprašných hlinách. V okolí Sebedražia a Koša sa vyskytuje aj čiernica, vyvinutá na proluviálnych hlinách. Na území sa vyskytujú tri skupiny chránených poľnohospodárskych pôd – fluvizemné pôdy (typické a glejové), luvizemné pôdy a pseudogleje typické (Bodiš et al., 2006).



Obr. 5 Schematická mapa rozšírenia pôdnych typov v predmetnej oblasti (zdroje: www.geoportal.sk, www.enviroportal.sk, www.eea.europa.eu, Šály a Šurina, 2002 upravené podľa Veselská, 2013)

V záujmovom území Zemianske Kostoľany sa v blízkosti rieky Nitry nachádzajú hlavne fluvizeme kultizemné, ktoré sa vyvinuli z nekarbonátových aluviálnych sedimentov. Sprievodne sa môžu vyskytovať aj fluvizeme glejové, modálne a kultizemné ľahké. Východnú časť lokality tvoria pseudogleje modálne, kultizemné a luvizemné nasýtené až kyslé, ktoré sa vytvorili zo sprašových hlín a svahovín. Do predmetného územia zasahujú aj kambizeme modálne a kultizemné nasýtené až kyslé, ktoré pochádzajú zo stredne ťažkých až ľahších skeletnatých zvetralín nekarbonátových hornín. Sprievodne sa v oblasti môžu nachádzať rankre a kambizeme pseudoglejové. Západnú časť územia tvoria rendziny a kambizeme rendzinové zo zvetralín pevných karbonátových hornín. Sprievodnými pôdami sú litozeme modálne karbonátové a lokálne sa vyskytujú aj rendziny sutinové (Hraško et al., 1993). Po havárií odkaliska však došlo k prekrytiu pôd rozplaveným popolovým materiálom. V súčasnosti sa tieto pôdy označujú ako technozem iniciálna (Societas Pedologica Slovaca, 2014, Faragó et al., 2014).

2.1.4 Klimatické pomery

Hornonitriansku kotlinu charakterizuje mierne teplé až mierne chladné podnebie. Nižšia časť kotliny patrí do teplej klimatickej oblasti, stráne pohorí do mierne teplej a najvyššie polohy do chladnej klimatickej oblasti. Priemerná ročná teplota sa pohybuje v rozpätí 7 – 8 °C. Priemerné mesačné teploty v letných mesiacoch sa pohybujú od 16,9 °C do 18,0 °C a v zimných mesiacoch od -3,2 °C do 4,2 °C. Ročný úhrn zrážok sa pohybuje v rozpätí 700 – 850 mm. Mesiacmi s najvyšším priemerným mesačným množstvom zrážok sú mesiace jún, júl a august. V kotline sa prejavuje typická koncentrická zonálnosť zrážok – v strede kotliny je úhrn zrážok najnižší (Nováky – 607 mm) a k okrajom kotliny a okolitým pohoriam vzrastá (vo vrcholových oblastiach Strážovských vrchov dosahujú 1100 – 1380 mm, vo vysočinových oblastiach Vtáčnika až 1400 mm). Snehová pokrývka v Hornonitrianskej kotline trvá 45 - 70 dní, vo vrcholových častiach pohorí 110 – 125 dní. Prúdenie vzduchu v regióne Horná Nitra je značne ovplyvnené orografiou a orientáciou kotliny. Dominuje prúdenie vetrov zo severného a severovýchodného smeru. Nízka hodnota priemernej ročnej rýchlosti vetra (2,3 $m.s^{-1}$) poukazuje na nevhodné podmienky pre rozptyl a prenos exhalátov. Energetika, menšie zdroje chemického priemyslu a lokálne kúreniská predstavujú hlavné zdroje znečistenia ovzdušia. Veľký podiel na vysokej úrovni znečistenia má nízka kvalita palivovo-energetických zdrojov (Kernátsová et al., 2005; Bodiš et al., 2006; SHMÚ, 2014).

2.2 Tepelná elektráreň Nováky

Väčšina vyťaženého uhlia zo slovenských uhoľných baní (hlavne však z regiónu Horná Nitra) sa spotrebuje na výrobu elektrickej energie v Slovenských elektrárňach, a.s.. Elektráreň Nováky (ENO) v Zemianskych Kostoľanoch, okres Prievidza, ktorá svoju prevádzku začala v roku 1953, svojím výkonom 518 MWe predstavujé približne 9 % inštalovaného výkonu Slovenských elektrární (www.seas.sk).

Technológia spaľovania ENO

Hlavné výrobné zariadenie prevádzky – ENO B (výstavba 1959 – 1976) pozostáva zo štyroch blokov po 110 MW. Elektrárenský blok predstavuje samostatnú výrobnú jednotku skladajúcu sa z kotla, turbíny, generátora a ich príslušenstva. Súčasťou bloku sú odlučovače polietavého popola z dymových plynov, chladiaca veža, blokový transformátor, odsírovacie zariadenie a systém na redukciu oxidov dusíka. Súčasťou závodu je aj prevádzka ENO A (výstavba 1949 – 1957) s elektrickým výkonom 178,8 MW. V súčasnosti sú v ENO A inštalované dva granulačné kotly 2 x 110 t/h a fluidný kotol FK1 125 t/h pary (SE, a.s., 2010, www.javys.sk).

Spaľovanie uhlia v práškových granulačných kotloch a vo fluidnom kotle generuje paru s vysokými parametrami. Vyrobená para je privádzaná na lopatky turbín, kde odovzdá svoju pohybovú energiu a roztáča ich. Spojenie turbíny s generátorom prenáša rotáciu na generátor, v ktorom sa mechanická energia mení na elektrickú energiu a cez transformátor sa vyvádza do elektrickej siete (SE, a.s., 2010). Okrem výroby elektriny zabezpečuje tepelná elektráreň aj dodávky tepla vo forme pary pre susediace priemyselné podniky a vo forme horúcej vody, predovšetkým pre mesto Prievidza. V rámci technológie nakladania s odpadmi sa vyprodukovaný popol mieša s vodou a potrubím naplavuje na Pôvodné odkalisko. K ďalším využívaným odkaliskám patrí Dočasné odkalisko Zemianske Kostoľany (ukladajú sa tu jemné frakcie metódou solidifikácie) a Definitívne odkalisko Chalmová, na ktorom sa taktiež naplavuje (Frankovská et al., 2008). Hoci v súčasnosti odkaliská predstavujú veľké skládky nevyužiteľného a nebezpečného materiálu, v budúcnosti môžu byť surovinovými základňami veľkého významu.

Pôvodné odkalisko ENO (vodohospodárska kategória: II., Zemianske Kostoľany)

Odkalisko hnedouhoľných popolov (tab. 1) je v prevádzke od polovice 50.-tych rokov 20. stor. V rokoch 1970 – 1980 prebehla rekonštrukcia a od r. 1982 obnovenie plavenia popola. Podľa STN 753310 ide o odkalisko s obehovým systémom dopravnej vody, čiastočne pretekané povrchovými vodami, údolného typu, so základnou hrádzou sypanou z miestnych zemín, nadvyšovanie popolovými hrádzami (metódou plavenia „proti vode“), uloženie popolového sedimentu je trvalé (ČMS, 2011). Údolie tvoria bridlice, pieskovce a kremence s melafýrmi a v JZ až SZ okraji sa oblúkovito tiahne pás dolomitov a vápencov. Vrstvy ílov, drte a úlomkov

melafýrov (mocnosť 1 – 12 m) sa striedajú s polohami jemnozrnného až prachovitého piesku. V údolí dominujú fluviálne a deluviálne sedimenty. Aluviálne náplavy rieky Nitry tvoria štrky piesčité až hlinité do 5 m, ktoré sú prekryté náplavovými hlinami. Deluviálne sedimenty majú charakter hlinitokamenitej sute (ČMS, 2011).

Definitívne odkalisko ENO (vodohospodárska kategória: II., Bystričany – Chalmová)

Odkalisko hnedouhoľných popolov (tab. 1), ktoré norma STN 753310 definuje ako odkalisko s obehovým využívaním dopravnej vody, čiastočne pretekané povrchovými vodami, údolné, morfologicky výhodné, so základnou hrádzou v zúženom profile (päta hrádze cca 240 m n. m., výška 20 m) z miestnych zemín, nadvyšovacie hrádze popolové, s trvalým uložením popolového sedimentu (ČMS, 2011). Podložie je tvorené dobre priepustnými karbonátmi pokrytými nesúvislými polohami hlín. Prítomné je pásmo veľmi porušených dolomitov a vápencov s puklinami vyplnenými dolomitickými „múčkami“, ktorými je odvádzané značné množstvo podzemných vôd. Podložie na dne údolia je prekryté vrstvou eluviálnych sedimentov tvorených zahlinenými suťami alebo hlinami. Na svahoch sú prítomné hlinito-kamenité sute (ČMS, 2011).

Tab. 1 Vybrané vlastnosti odkalísk ENO Nováky (ČMS, 2011)

Názov	Zrnitostné zloženie	Objemová hmotnosť (kg.m^{-3})		Vlhkosť (%)
		ρd	ρn	
Pôvodné odkalisko	S-F, SC	507 - 926	796 - 1165	20,5 - 58,5
Charakteristika	Deponovanie jemnozrnných a kyprých popolov v okrajový častiach nadvyšovacích kaziet s nízkymi hodnotami mechanických parametrov, s malou objem. hmotnosťou = nežiadúce vlastnosti z hľadiska stability.			
Definitívne odkalisko	S-F, SC, CS	455 - 931	898 - 1195	22 - 58
Charakteristika	Deponovanie jemnozrnných a kyprých popolov, ktoré v čase od ich zabudovania nepatrne zlepšujú svoje mechanické vlastnosti resp. si ich udržujú. Horniny v podloží majú rozdielny charakter. Pod okrajovým svahom úložiska smerom do údolia rieky Nitra sú sedimenty s vysokým podielom jemnozrnných frakcií (ílu), pri väčšom nasýtení popola vodou mohlo viesť k nestabilite okrajového násypu odkaliska.			

Dočasné odkalisko ENO (vodohospodárska kategória: I., Zemianske Kostoľany)

Odkalisko hnedouhoľných popolov a stabilizátu, ktoré norma STN 753310 definuje ako: Odkalisko s obehovým využívaním dopravnej vody, čiastočne pretekané povrchovými vodami, rovinné svahové so základnou hrádzou budovanou čiastočne z hlín a čiastočne zo škváry a popola, nadvyšovacie hrádze popolové, trvalé uloženie sedimentu (~30 až 34 m nad pôvodným povrchom terénu, ~218 až 226 m n.m., v súčasnosti sa ukladá inertný geomateriál (stabilizát) na skládky č. 1 a č. 2. (ČMS, 2011).

3. GEOCHEMICKÁ CHARAKTERISTIKA UHLIA A ELEKTRÁRENSKÝCH POPOLOV

3.1 Chemické a minerálne zloženie uhlia

Uhlie je horľavá hornina, ktorá vznikla ako výsledok komplexu anaeróbnych biochemických reakcií za pôsobenia teploty, tlaku a času v podzemných vrstvách rastlinného odpadu (Jandačka a Mikulík, 2008). Jednotlivé druhy uhlia sa od seba odlišujú výhrevnosťou, obsahom síry a ďalších nečistôt, mechanickou pevnosťou, obsahom vlhkosti, fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami. Okrem uhlíka, obsahuje uhlie vodík, kyslík, dusík a rôzny obsah síry. Nízko kvalitné uhlie má nízky obsah uhlíka, ale vysoký obsah vodíka a kyslíka (www.coal.ca).

Na základe stupňa transformácie pôvodného rastlinného materiálu a uhlíka, je uhlie klasifikované do 4 hlavných kategórií: lignit, hnedé uhlie, čierne uhlie, antracit. Najstaršie čierne uhlie a antracit vznikli iba pôsobením silného tektonického tlaku a vysokej teploty. Antracit predstavuje uhlie s najvyšším obsahom uhlíka (94 %) a najmenším podielom prchavých látok (Jandačka a Mikulík, 2008). Čierne uhlie sa používa predovšetkým na výrobu elektriny a koksu pre oceliarsky priemysel a obsah uhlíka sa pohybuje od 75 do 95 % (Jandačka a Mikulík, 2008). Obsah uhlíka v hnedom uhlí je v rozmedzí 60 – 75 % (Jandačka a Mikulík, 2008). Hoci má nižšiu výhrevnosť, má aj nižší obsah síry v porovnaní s ostatnými druhmi uhlia (www.ket.org) a na rozdiel od čierneho uhlia je ľahšie a obsahuje viac vlhkosti (www.coal.ca). Minerálne zloženie anorganickej hmoty hnedého uhlia (Pernik, Bobov Dol) a čierneho uhlia (Balkan) skúmali Vassileva a Vassilev (2006). Uhlie postupne ohrievali od 100 °C k 1400 – 1600 °C cez 100 °C intervaly. Skúmali pôvodné minerály ako aj novovytvorené anorganické fázy v produktoch spaľovania. Popísaných bolo 33 minerálov a fáz, a aj ich správanie. Niektoré minerály identifikované v uhlí uvádza tab. 2.

Lignit je geologicky mladé uhlie, s najnižším obsahom uhlíka (40 – 60 %) (Jandačka a Mikulík, 2008) a patrí k najmenej kvalitným a najmladším z druhov uhlia. Používa sa predovšetkým na výrobu elektrickej energie (www.ket.org).

3.1.1 Zastúpenie a distribúcia arzénu v uhlí

Na svoju prevádzku ENO Nováky používajú ako palivo hnedé uhlie a lignit z hornonitrianskych baní, ktoré majú obsah síry 1,35 až 1,99 % a obsah arzénu 6,2 až 590 $mg.kg^{-1}$ (Nováky) (Špaldon a Turčániová, 1998). Detailnejšej geochemicko-ekologickej charakteristike nováckeho uhlia sa venoval Vrana et al. (1991).

Arzén je v nováckom uhlí viazaný najmä na realgár (AsS) a auripigment (As_2S_3), ktoré sa vyskytujú ako červené, oranžové a žlté povlaky na puklinách a vrstevných plochách, resp. impregnujú preplástky a uhoľnú hmotu (Verbich, 1998). Čiastočne je As viazaný aj na arzenopyrit (FeAsS), ktorý sa tu vyskytuje zriedkavo (Mecháček a Petrík, 1967).

Tab. 2 Prehľad niektorých minerálov identifikovaných v rôznych typoch uhlia

Zdroj		Vassilev et al., 2005a	Querol et al., 1995	Vassileva a Vassilev, 2006	Vassilev et al., 2003	Mukhopa-dhyay et al., 1996
Minerály	**Vzorec**	HU	HU	HU, ČU	ČU, SA, A	ČU
Sulfidy						
pyrit	FeS_2	x	x	x	x	x
markazit	FeS_2		x	x	x	
sfalerit	ZnS					x
Sírany						
szomolnokit	$FeSO_4.H_2O$		x			
rozenit	$FeSO_4.4H_2O$		x			
melanterit	$FeSO_4.7H_2O$		x			
jarozit	$(Na,K)Fe_3(SO_4)_2(OH)_6$		x	x	x	
sadrovec	$CaSO_4.2H_2O$	x	x	x	x	x
anhydrit	$CaSO_4$			x		
Karbonáty						
kalcit	$CaCO_3$	x	x	x	x	
dolomit	$CaMg(CO_3)_2$	x		x	x	x
ankerit	$Ca(Mg,Fe)(CO_3)_2$	x		x	x	x
siderit	$FeCO_3$	x		x	x	x
Silikáty						
kremeň	SiO_2	x	x	x	x	x
opál	$SiO_2.nH_2O$	x				
kaolinit	$Al_2Si_2O_5(OH)_4$	x	x	x	x	x
illit	$(KH_2O)Al_2(AlSi)Si_3O_{10}(OH)_2$	x	x	x	x	x
muskovit	$KAl_2AlSi_3O_{10}(OH)_2$	x		x	x	
montmorillonit	$(Na,Ca)_{0,3}(AlMgFe)_2Si_4O_{10}(OH)_2.xH_2O$	x		x	x	
mikroklín	$KAlSi_3O_8$,		x			
chlorit	$(MgFe)_5Al_2Si_3O_{10}(OH)_8$	x		x	x	
plagioklas	$NaAlSi_3O_8$-$CaAl_2Si_2O_8$	x		x	x	
K-živce	$KAlSi_3O_8$	x	x	x	x	x
Oxidy a hydroxidy						
hematit	Fe_2O_3			x		x
goethit	α-FeOOH			x		
Iné						
vulkanické sklo		x				
Ca-Mg-Na-K fázy		x				
anorganická amorfná hmota		x				

*__HU__ – hnedé uhlie, __ČU__ – čierne uhlie, __SA__ – semi-antracit, __A__ – antracit

Akumulácia arzénu v uhlí je kontrolovaná mnohými geologickými faktormi počas procesu formovania uhlia, zahŕňajúc rozklad rastlín, sedimentačné prostredie a epigenetickú hydrotermálnu aktivitu. Distribúcia arzénu v uhlí je ovplyvnená obsahom popola a síry, menej

petrografiou uhlia a pozíciou vzorky v uhoľnom sloji (Yudovich a Ketris, 2005). V uhlí sa vyskytujú tri dominantné formy arzénu: pyritická, organická a arzeničnanová. Okrem uvedených foriem výskytu môže arzén vystupovať naviazaný aj na ílové minerály (Pandey et al., 2011). Formy As_{pyr}, As_{org} a malé zrná ďalších minerálov arzénu majú tendenciu sa počas spaľovania vyparovať, kým As_{fly} inklinujú viac k popolu z dna (bottom ash) (Kizilstein et al., 1989 in Yudovich a Ketris, 2005). Ak As_{pyr} dominuje, je pozorovaná akumulácia arzénu v ťažkej frakcii (alebo vo vysoko popolnatom uhlí). Ak dominuje As_{org}, arzén je obohatený vo frakcii so strednou hustotou (alebo v nízko a stredne popolnatom uhlí) (Yudovich a Ketris, 2005).

Priemerné koncentrácie arzénu vo svete (klark As v uhlí) pre čierne uhlie je 9,0 ± 0,8 $mg.kg^{-1}$ a pre lignit 7,4 ± 1,4 $mg.kg^{-1}$. V prípade popolov sú obsahy As vyššie: popol z čierneho uhlia obsahuje 50 ± 5 $mg.kg^{-1}$ arzénu, popol z lignitu 49 ± 8 $mg.kg^{-1}$ arzénu. Obsah arzénu sa so zvyšujúcou kvalitou uhlia znižuje (Yudovich a Ketris, 2005). V práci Wang et al. (2006) sa obsah arzénu v uhlí znižoval v rade hnedé uhlie > antracit > čierne uhlie.

Arzén v prírode tvorí viac ako 200 minerálov a jeho najčastejšie sa vyskytujúcim minerálom je arzenopyrit (Gomez-Caminero et al., 2001; Mandal a Suzuki, 2002). Arzén sa nachádza v mineráloch ako realgár (AsS), auripigment (As_2S_3), ale taktiež sa vyskytuje v asociácii so sulfidmi Cu, Pb a Zn a s minerálmi ako je chalkopyrit a sfalerit (Mandal a Suzuki, 2002; Baur a Onishi, 1969 in Smedley a Kinniburgh, 2002). V čiernom uhlí je sulfidická forma arzénu dominantná a vedľajšou formou je arzén v iónovo-vymeniteľnej forme. V hnedom uhlí je arzén jednotne distribuovaný skôr medzi karbonáty, sulfidy a organickú hmotu (Yudovich a Ketris, 2005). Zhang et al. (2002) identifikovali vysoké obsahy arzénu v kalcite a v pyrite. Výskyt a obsah arzénu v rôznych typoch uhlia v niektorých štátoch uvádza tab. 3.

Práca Belkin et al. (1997 in Yudovich a Ketris, 2005) poukazuje na ešte väčšiu rozmanitosť foriem arzénu s ďalšími detekovanými fázami viažúcimi arzén:

- As-viažúci pyrit vo forme framboidov, idiomorfných kryštálov a zŕn nepravidelných tvarov. Zmena obsahu arzénu v pyrite je najväčšia blízko arzenopyritových zŕn.
- Arzenopyrit s veľkosťou zŕn 0,15 – 0,25 mm, obsahuje prímes Se (0,15 – 0,20 hm. %).
- As-viažúce fosforečnany, s pomerom P/As okolo 4.
- As-viažúci jarozit (obsahujúci niekoľko % As).
- Skorodit, fáza Fe - As s pomerom Fe/As okolo 1.
- As-viažúce oxidy Fe, pravdepodobne hematit.

Tab. 3 Výskyt a obsah arzénu (mg.kg^{-1}) v uhlí a v popole

(BA (*bottom ash*) – popol z dna kotlov, FA (*fly ash*) – polietavý popol).

Štát, oblasť, mesto, ložisko	Typ uhlia	Počet vzoriek	Obsah As (mg.kg^{-1}), výskyt	Zdroj
Čína, juhozápadný Guizhou	Antracit a čierne uhlie	144	väčšina vzoriek obsahovala menej ako 30 mg.kg^{-1} As, 37 vzoriek viac ako 30 mg.kg^{-1} As, 16 vzoriek viac ako 100 mg.kg^{-1}As, niekoľko vzoriek viac ako 1000 mg.kg^{-1}As	Zhao et al. (2008)
Česká republika, Poříčí	Čierne uhlie		uhlie: 7,1 mg.kg^{-1}As BA: 9,4 mg.kg^{-1}As FA: 29 mg.kg^{-1}As	Bartoňová et al. (2007)
Česká republika, Tisová	Lignit		uhlie: 14 mg.kg^{-1}As BA: 24 mg.kg^{-1}As FA: 28 mg.kg^{-1}As	
USA, Ohio	Čierne uhlie (vysoký obsah síry: 3,9 %)		BA: 4,5 - 4,8 mg.kg^{-1}As FA: 51,2 - 58,2 mg.kg^{-1}As	Jones et al. (2012)
USA Nové Mexico	Uhlie s nízkym obsahom síry: 0,76 %		BA: 3,0 - 3,5 mg.kg^{-1}As FA: 11,0 - 11,4 mg.kg^{-1}As	
Čína (28 miest a provincií)	Čierne uhlie, antracit, lignit	4763	od 1,75 do 25,38 mg.kg^{-1}As (priemerné hodnoty), As hlavne v pyrite a sulfidických mineráloch, ale aj v organickej hmote	Kang et al. (2011)
Čína (26 provincií)	Hnedé uhlie, čierne uhlie, antracit	297	0,24 - 71 mg.kg^{-1}As, priemer: 6,4 ± 0,5 mg.kg^{1}As, geometrický priemer: 4,0 ± 8,5 mg.kg^{-1}As	Wang et al. (2006)
USA, Danville	Čierne uhlie	33	0,5 - 43 mg.kg^{-1}As, priemer: 12,7 mg.kg^{-1}, As v pyrite	Mastalerz a Drobniak (2007)
USA, Springfield,	Čierne uhlie	64	1 - 50 mg.kg^{-1}As, priemer: 9,4 mg.kg^{-1}As, As v pyrite	
Turecko, Gediz	Čierne uhlie (vysoký obsah síry: 4,5 - 11,5 %)	45	170 - 3854 mg.kg^{-1}As, priemer: 833 mg.kg^{-1}As, As asociácia s epigenetickým antimonitom (v prizmatických kryštáloch, menej v radiálnych) a asociácia so sulfidmi Fe (pyrit, markazit)	Karayigit et al. (2000)
Čína Yunnan, Yima, Datong		3	Yunnan: 350,2 mg.kg^{-1}As, As v pyrite, Yima : 40,3 mg.kg^{-1}As, Datong: 7,9 mg.kg^{-1}As	Guo et al. (2004)
Záp. Venezuela (14 baní)	Čierne uhlie (obsah S 1 - 6 %)	16	uhlie: < 0,004 - 71,3 mg.kg^{1}, As asociuje so sulfidmi	Hackley et al. (2005)

USA, Elkhorn/Hazard	Čierne uhlie	1	As: 4,75 mg.kg^{-1}As, As v pyrite	Kolker et al. (2000)
USA Pittsburgh	Čierne uhlie	1	5,12 mg.kg^{-1}As, As v pyrite	
USA Illinois no.6	Čierne uhlie	1	3,09 mg.kg^{-1}As, As v pyrite	
USA Wyodak	Hnedé uhlie	1	1,58 mg.kg^{-1}As, As v organickej hmote ako As^{3+} alebo arzeničnany	
Bulharsko (14 uhoľných ložísk)	Lignit, čierne a hnedé uhlie	400	priemer : 2 - 58 mg.kg^{-1}As, max. 4011 mg.kg^{-1}As, priemer: lignit: 11 mg.kg^{1}As, hnedé uhlie: 19 mg.kg^{-1}As, čierne uhlie: 37 mg.kg^{-1}As, As hlavne v pyrite, predpoklad aj v organike, v uhoľnom popole: 8 - 575 mg.kg^{-1}As	Eskenazy (1995)
Západná Kanada			BA: 1,6 mg.kg^{-1}As, FA: 17,5 mg.kg^{-1}As, As ako arzenitan, arzeničnan	Goodarzi a Huggins (2001)
USA Illinois no.6			2,7 mg.kg^{-1}As, As v pyrite	Seames a Wendt (2000)
USA Pittsburgh	Zmes		4,1 mg.kg^{-1}As, As v pyrite	
USA Ohio	Sloj		19 mg.kg^{-1}As, As v pyrite	
USA Wyodak	Hnedé uhlie		1,4 mg.kg^{-1}As, As v pyrite, v organickej hmote	
USA Severná Dakota	Lignit		8,1 mg.kg^{-1}As, As v pyrite	
India (5 elektrární)			uhlie: 1,14 - 2,2 mg.kg^{1}As, FA: 0,19 - 0,35 mg.kg^{-1}As, BA: 0,1 - 0,29 mg.kg^{-1}As	Bhangare et al. (2011)
Kanada, Alberta	Nízko kvalitné čierne uhlie	53	uhlie: 0,4 - 140 mg.kg^{-1}As, obsah síry < 0,6 hm.%	Gentzis a Goodarzi, 1997
Severný Irán, Alborz	Čierne uhlie	4	uhlie: 1,3 - 5,9 mg.kg^{-1}As, obsah síry: 0,35 - 0,7 hm.%, S viazaná v organickej forme	Goodarzi et al. (2006)
Západná Kanada	Hnedé uhlie		uhlie: 1.štúdia: 2,55 mg.kg^{-1}As, 2.štúdia : 1,60 mg.kg^{-1}As, BA: 1.štúdia: 2,07 mg.kg^{1}As, 2.štúdia: 1,60 mg.kg^{-1}As, FA: 1.štúdia: 29,23 mg.kg^{1}As, 2.štúdia: 18 mg.kg^{-1}As, As v pyrite	Goodarzi (2006)
Kanada, Elk Valley (Britská Kolumbia)	Čierne uhlie	96	uhlie: 0,1 - 8,8 mg.kg^{-1}As	Goodarzi et al. (2009)

Čína S, SV a V Číny	Uhoľné bane	33	uhlie: od 55,71 ± 2,32 mg.kg^{-1} - 156,72 ± 7,55 mg.kg^{-1}As	He et al. (2002)
USA, Clay County, Kentucky (5 baní)	Čierne uhlie (nízky obsah síry, S hlavne v pyrite)	22	uhlie: 5,6 - 292 mg.kg^{-1}As	Sakulpitakphon et al. (2004)
Južná Čína, Heshan Coalfield	Čierne uhlie (vysoký obsah síry: 5,3 - 11,6 %, viazaná v OH)	29	uhlie: 2,1 - 70,1 mg.kg^{-1}As, As viazaný na sulfidy Fe	Shao et al. (2003)
Portugalsko, Rio Maior	Lignit	4	uhlie: 17,3 - 62,7 mg.kg^{-1}As	Suárez-Ruiz et al. (2006)
Španielsko, Peñarroya	Čierne uhlie	4	uhlie: 2,9 - 11,8 mg.kg^{-1}As	
Čína, Huainan, provincia Anhui	Antracit Čierne uhlie	4 4	13,3 - 26,0 mg.kg^{-1}As uhlie: 1,07 - 1,69 mg.kg^{-1}As BA: 1,7 - 2,7 mg.kg^{-1}As FA: 3,14 - 7 mg.kg^{-1}As	Tang et al. (2012)
Južná Afrika, Waterberg	Čierne uhlie	4	uhlie: 1,57 - 15 mg.kg^{-1}As, As v pyrite	Wagner a Tlotleng (2012)
USA, Black Warrior Basin, Alabama	Čierne uhlie		uhlie: 55 mg.kg^{-1}As, FA: 230 mg.kg^{-1}As, As v pyrite	Zielinski et al. (2007)

3.2 Vplyv teploty na premenu minerálnych fáz počas spaľovania uhlia

V uhlí a v nízkoteplotnom popole je exotermický účinok medzi teplotou 55 až 110 °C pripisovaný strate adsorbovanej vody, kým endotermická reakcia okolo teploty 130 – 180 °C zodpovedá dehydratácii sadrovca. Oxidácia organickej hmoty prebieha v intervale 180 – 670 °C pre uhlie a 340 – 530 °C pre nízkoteplotný popol. Táto reakcia je sprevádzaná rozkladom pyritu a sideritu a dehydroxyláciou a deštrukciou niektorých ílových minerálov. Endotermická reakcia medzi 680 a 915 °C zodpovedá rozkladu vápenca a dolomitu. Účinky pri teplote 850 – 1000 °C sú spojené s pokračujúcou deštrukciou ílových minerálov a vzniku hlavne mullitu, spinelu, korundu a amorfných fáz. Teploty 965 – 1000 °C sú pravdepodobne taktiež prisudzované reakciám tuhého skupenstva (hlavne medzi CaO a silikátmi). S teplotou nad 1000 °C súvisí kryštalizácia amorfného SiO_2 na kristobalit, vznik korundu, mullitu, spinelov, Ca-silikátov, pyroxénov a olivínov, rozklad anhydritu, niektoré reakcie medzi fázami, tavenie a rozpúšťanie rôznych fáz. Rozklad síranov Fe (470 – 810 °C), dehydroxylácia hydroxidov Fe (200 – 400 °C), Al (300 – 600 °C) a Ca - Mg (350 – 620 °C) rovnako ako deštrukcia ílových minerálov, rozklad uhličitanov a ďalšie reakcie podobné pre uhlie a nízkoteplotné popoly nad 800 °C, sú charakteristické aj pre vzorky vysokoteplotných popolov (Vassilev et al., 1995).

3.2.1 Termodynamika arzénu počas spaľovania uhlia

Počas spaľovania sa veľké množstvo arzénu uvoľňuje z uhlia a dochádza k jeho rozdeleniu medzi plynnú fázu a tuhý zvyšok v rôznych pomeroch, v závislosti na faktoroch ako je počiatočná koncentrácia v pôvodnom uhlí, konštrukcia a prevádzkové podmienky spaľovania a kontrolné zariadenie. Arzén je koncentrovaný dominantne v časticiach, ale rovnako sa môže nachádzať aj v plyne. Koncentrácia rôznych foriem arzénu v plyne závisí hlavne od teploty a od chemickej interakcie s polietavým popolom (Wouterlood a Bowling, 1979). Elementárny arzén a oxidy arzénu (As_2O_3) sú považované za najpravdepodobnejšie formy výskytu As v spalinových plynoch počas spaľovania, pričom arzén je viac prchavý vo forme As_2O_3 ako elementárny As (Dismukes, 1994; Winter et al., 1994).

Termodynamické zhodnotenie

Podľa práce Eary et al. (1990), koncentrácie arzénu v produktoch spaľovania uhlia sa značne líšia v rozsahu od 2 do 240 $mg.kg^{-1}$ v polietavom popole a od 0,02 do 168 $mg.kg^{-1}$ v popole z dna kotlov, v závislosti od kvality uhlia, hodnoty pH popolov a podmienok vznietenia. Podľa termodynamických výpočtov (Furimsky, 2000) sú pomer arzénu v plyne k tuhej fáze, ako aj formy výskytu arzénu, ovplyvnené dvoma hlavnými činiteľmi: poklesom teploty so vzdialenosťou toku plynu a pomerom vzduch/uhlie počas spaľovania. Pri štandardnom pomere vzduch/uhlie α = 1,1:1 (10 % prebytok vzduchu), pri teplote 1227 °C začína podstatná časť kondenzácie arzénu a pri teplote 927 °C sa vyskytuje kompletná kondenzácia. Pri znížení α = 0,9:1 (redukujúce prostredie) pri teplote 1226,85 °C je množstvo arzénu v plyne zvýšené dvojnásobne. Pri teplote 1527 °C sa zistilo, že v plyne dominuje arzén vo forme AsN a prítomné sú aj ďalšie formy vystupovania arzénu (**poznámka*) v zostupnom poradí: As^0, As_2 a As_2O_4. Pri rovnakej teplote v tuhej fáze, môže existovať As_2O_3 a v zostupnom poradí sa arzén vyskytuje ako: As^0 a $Ca_3(AsO_4)_2$. S poklesom teploty na 927 °C v plyne, je stabilný len As_2O_3. Pri teplote 627 °C sa môže vyskytovať taktiež $AsCl_3$, pričom v pevnej fáze dominuje As_2O_5 a je jedinou formou vystupovania arzénu pri teplote 327 °C. So znížením teploty spalín je kondenzácia arzénu ukončená oxidáciou arzénu na časticiach polietavého popola.

Podľa Beľkova et al. (2000), hlavný faktor, ktorý ovplyvňuje prechod arzénu do plynnej fázy je teplota. Len počas nízkoteplotného vznietenia, arzén vytvára pevné fázy – oxidy a elementárny As^0. Pri teplote nad 600 °C, väčšina arzénu prechádza do plynnej fázy vo formách As_2, As_3 a AsS.

Poznámka: $As_{(g)}$, $As_{2(g)}$, $As_{3(g)}$, $As_{4(g)}$ v podobe elektroneutrálnych molekúl (Zhao et al., 2004), predstavujú formy vystupovania arzénu v plynnej fáze (Chakraborti a Lynch, 1983; Wypartowicz, 1995; Zhong a Lynch, 2001; Potolokov et al., 2003; Leitner a Mikulec, 1991). Tetraédrické molekuly $As_{4(g)}$ (Plesch a Tatiersky, 2004) sú hlavnou formou arzénu v plynnej fáze (až 94 %) do teploty ~1127 °C (Gokcen, 1989).

Výpočet termodynamickej rovnováhy (Bool a Helble, 1995) ukazuje, že arzén vo forme sulfidov by sa mohol vypariť, pravdepodobne ako As^0, a v rozmedzí teplôt 1226,85 – 1726,85 °C ako As_2O_3. Kondenzované formy vystupovania arzénu v polietavom popole môžu byť teoreticky kontrolované chemickým zložením popola: v kyslom popole (vysoký obsah Si) hlavne ako $Fe_3(AsO_4)_2$, v alkalickom popole (vysoký obsah Ca) ako $Ca_3(AsO_4)_2$. V skutočnosti sa arzeničnany Fe nevyskytujú, pretože železo prechádza do silikátových skiel. Vzhľadom k tejto skutočnosti, arzén je kondenzovaný na silikátových povrchoch guličiek ako As_2O_3. Ide o proces fyzikálnej sorpcie.

Pri nízkych teplotách (< 677 °C), za oxidačných podmienok, sú dominantné tuhé arzeničnany: $TlAsO_4$ (< 277 °C), $AlAsO_4$ (277 – 287 °C, 477 – 577 °C), $LaAsO_4$ (377 – 477 °C), $Mg_3As_2O_8$ (577 – 677 °C). Jedinou stabilnou formou vystupovania arzénu pri teplote > 677 °C je plynný AsO (Yudovich a Ketris, 2005).

Za redukčných podmienok pri teplotách < 527 °C, je jedinou formou vystupovania arzénu $TlAsO_4$. V rozsahu teplôt 627 – 727 °C, je dominantnou formou arzénu pevný Ni_5As_2 a pri teplote nad 827 °C plynný AsO (Yudovich a Ketris, 2005).

Počas vyparovania sú dve možnosti odstraňovania plynného arzénu: heterogénna kondenzácia a povrchová adsorpcia na popolových časticiach. Popol obsahuje dva typy častíc: submikrometrové častice (časť popola, ktorá je odparovaná počas vysokoteplotného spaľovania uhlia a neskôr kondenzuje v chladnejších častiach) a supermikrometrové častice, ktoré vznikajú zo zhlukovania zvyškového popola. Hoci veľká časť popola je zložená z väčších častíc, submikrometrové častice sú dôležité kvôli ich veľkým merným povrchom (Senior et al., 2006).

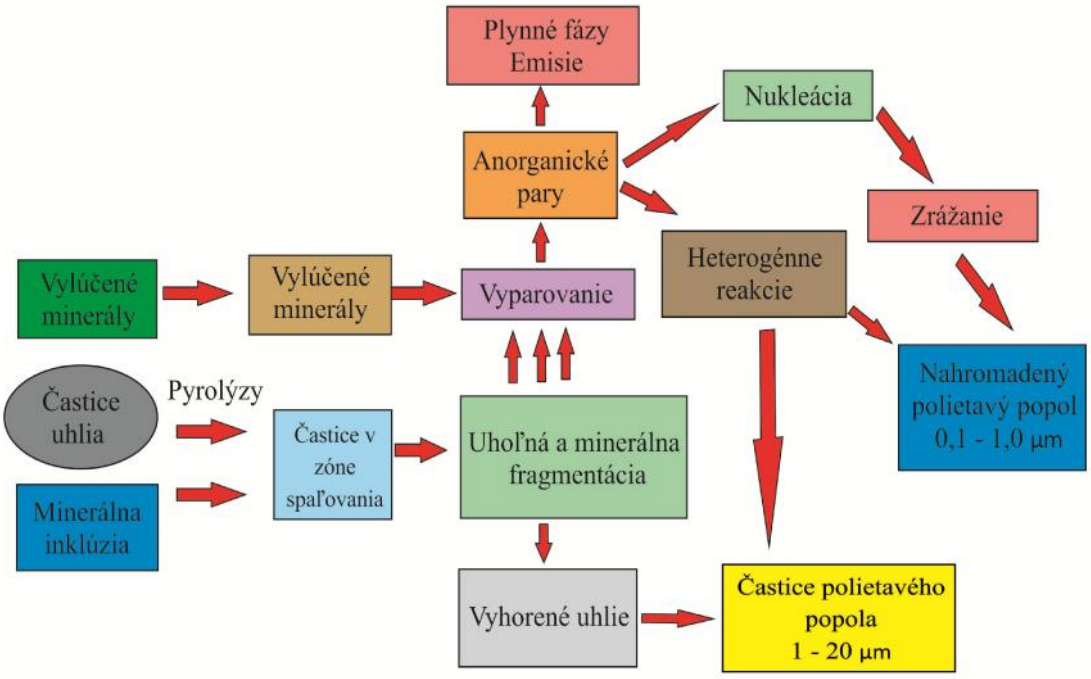
3.3 Chemické zloženie a pôvod minerálnych fáz polietavého popola

Polietavý popol vykazuje jedinečné, polykomponentné, heterogénne zloženie, morfológiu a relatívny podiel fáz, na ktoré vplýva veľa faktorov. Tieto premenné zahŕňajú zdroj a minerálne zloženie zdrojového uhlia, podmienky spaľovania, metódu zberu vedľajších produktov, skladovacie a manipulačné metódy a implementácie techník na zmierňovanie environmentálneho nebezpečenstva. Uhlie je v podstate heterogénna surovina, podobne ako aj jeho vedľajší produkt spaľovania – popol. Zvyšky spaľovania uhlia sú komplexnou zmesou amorfných, kryštalických anorganických zložiek a v menšom obsahu organických zložiek, obsahujúcich množstvo tuhých, kvapalných a plynných fáz (Vassilev a Vassileva, 1996; Koukouzas et al., 2009).

Pri ohreve uhlia v peci pri prevádzkovej teplote 1400 až 1600 °C ílové minerály strácajú vodu a tavia sa, uhličitany sa rozkladajú za uvoľňovania CO_2 a tvorby CaO a MgO, sulfidy sa oxidujú za

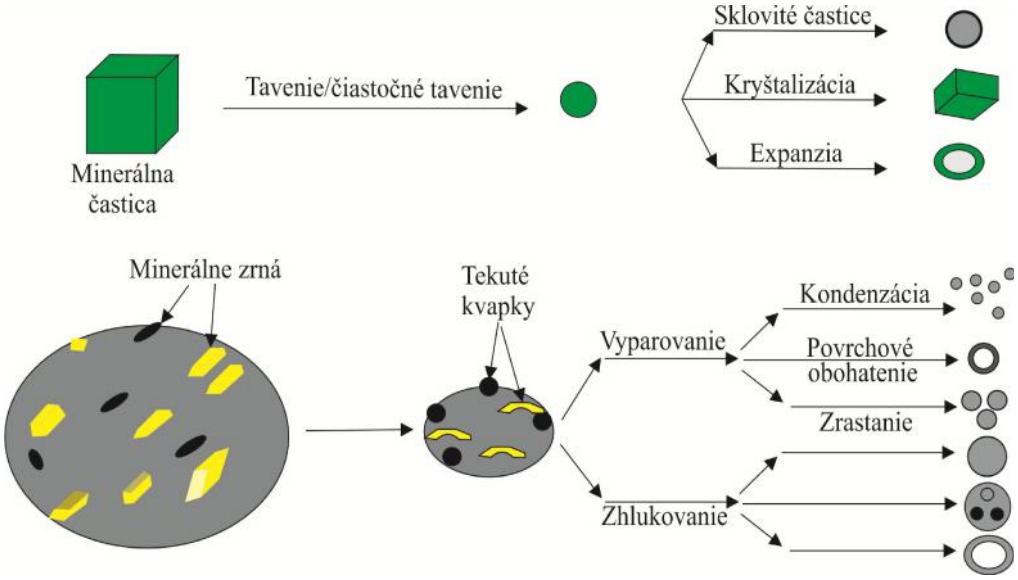
vzniku oxidov kovov, chloridy vyprchávajú a vzniká kyselina chlorovodíková a sírany, pri vyšších teplotách sa kremeň chemicky nemení (Hemmings a Berry, 1987). Teploty tavenia ílových minerálov v uhlí sú dané predovšetkým ich chemickým zložením, zvlášť množstvom skla určeného prítomnými prvkami (alebo tavidla) (Pietersen, 1993 in Chancey et al., 2010). Minerály, ktoré sú prítomné v uhlí, s väčšou koncentráciou tavidiel budú vytvárať väčšie množstvo skla počas chladenia ako uhoľné minerály s nižšou koncentráciou tavivých prvkov (Mindess et al., 2003 in Chancey et al., 2010).

Polietavý popol pozostáva z jemných, sklu podobných častíc, ktorých veľkosť sa pohybuje od 0,01 do 100 µm (Davison et al., 1974), sú hlavne guľovitého tvaru a väčšinou amorfné. Schématické znázornenie procesov, ktoré sa uplatňujú pri vzniku častíc polietavého popola počas spaľovania (modifikovaný podľa Seames, 2003) znázorňuje obr. 6.



Obr. 6 Schématický diagram vzniku polietavého popola počas spaľovania uhlia (modifikované podľa Seames, 2003)

Rýchle ochladenie vedie k vytváraniu guľovitých, amorfných (nekryštalických) častíc (obr. 7). Rozpínavosť plynov môže spôsobiť, že častice expandujú a vytvárajú duté cenosféry (duté častice). Minerály s vysokými teplotami tavenia môžu zostávať relatívne nezmenené. Na zloženie a morfológiu častíc má ohrievanie a chladenie významný vplyv (Kutchko a Kim, 2006).



Obr. 7 Premena častíc počas spaľovania uhlia (Kutchko a Kim, 2006)

Anorganická časť polietavého popola pozostáva hlavne z nekryštalických (amorfných) komponentov a menšieho množstva kryštalických zložiek zastúpených rôznymi hlavnými, vedľajšími a akcesorickými minerálnymi fázami. Organická časť obsahuje nespálené zložky uhlia (Vassilev a Vassileva, 1996). Z chemického hľadiska sú popoly tvorené hlavne Fe, Ca, Mg, Mn, K, Ti, P, O, Si a Al (Mishra a Das, 2010; Medina et al., 2010). Prítomné sú taktiež stopové prvky, ktoré sú koncentrované v najmenších časticiach popola (Adriano et al., 1980). Z oxidov majú najväčšie zastúpenie SiO_2, Al_2O_3, Fe_2O_3 a CaO, menšie množstvo MgO, MnO, P_2O_5, SO_3, Na_2O, K_2O, Cl_2O, P_2O_5 a TiO_2 (Vassilev et al., 2003; Kostakis, 2009; Koukouzas et al., 2009; Mishra a Das, 2010; Medina at al., 2010).

Zložky polietavého popola majú prírodný alebo technogénny pôvod a delia sa na pôvodné (primárne) alebo novovzniknuté (sekundárne alebo terciárne) minerály a fázy (Vassilev a Vassileva, 1996; Vassilev a Vassileva, 2007; Koukouzas et al., 2009):

1) **primárne minerály** – pôvodné minerály alebo fázy v uhlí, ktoré nepodliehajú fázovej premene počas spaľovania uhlia, napr. stabilné silikáty, oxidy, sírany, fosforečnany, uhličitany a iné s pomerne vysokými teplotami rozkladu a tavenia,

2) **sekundárne minerály** – sú definované ako fázy, ktoré vznikajú počas spaľovania uhlia a chemickými reakciami popolového materiálu s vodnými roztokmi, ktoré prichádzajú do kontaktu s popolovým materiálom: rôzne silikáty, oxidy, sírany, uhličitany, sulfidy, sklá, nespálené zvyšky,

3) **terciárne minerály** – nové minerály alebo fázy tvorené počas transportu polietavého popola a uloženia: portlandit, brucit, sadrovec, sírany Fe, kalcit, dolomit, hydroxidy Fe a Al a amorfný materiál.

Polietavý popol je tvorený tromi základnými komponentmi (Vassilev a Vassileva, 2007):

1) **anorganické zložky** – zahŕňajú nekryštalický (amorfný) materiál, a to rôzne sklovité častice a kryštalický (minerálny) materiál ako sú kryštály, zrná a agregáty rôznych minerálov,

2) **organická zložka** – pozostáva z uhoľných častíc (mierne zmenené), organické minerály,

3) **fluidné (kvapalné) zložky** – zložené z kvapaliny (vlhkosť), plynu a plyn-kvapalinových inklúzií v súvislosti s anorganickou a organickou hmotou.

3.3.1 Rozdelenie polietavých popolov do tried F a C

Americká spoločnosť pre testovanie a materiály (ASTM C618-92a, 1994 in Moreno et al., 2005) definuje dve triedy polietavých popolov založené na chemických a fyzikálnych charakteristikách. Celosvetovo sú polietavé popoly zo spaľovania uhlia v práškových kotloch kvôli ich priemyselným aplikáciám (produkcia betónu a cementu) klasifikované do tried F a C. Priemerné zloženie popolov v triedach F (45 analýz) (Scheetz et al., 1997) a C (97 vzoriek) (Scheetz, 2004) sumarizuje tab. 4.

Trieda F

Polietavé popoly v triede F sú väčšinou produkované zo spaľovania vysokokvalitného čierneho uhlia a antracitov (Manz, 1998). Trieda F je charakterizovaná súčtom oxidov $SiO_2 + Al_2O_3 + Fe_2O_3$ > 70 % (ASTM C 618-94a in Koukouzas et al., 2007) a zvyčajne obsahuje menej ako 5 % CaO (Koukouzas et al., 2007), SO_3 < 5%, obsah vlhkosti < 3 % a stratu žíhaním (loss on ignition) LOI < 6 % (ASTM C618-92a, 1994 in Moreno et al., 2005). Najčastejšie sa vyskytujúcou fázou v triede F je sklo ako výsledok tavenia ílov a obsahuje približuje 35 – 40 hm. % hliníka. Tento amorfný materiál je puzolán, ktorý môže byť využívaný v chemických reakciách s rôznymi alkalickými chemikáliami (Scheetz, 2004).

Trieda C

Polietavé popoly triedy C majú vyšší obsah MgO a SO_3 a nižší obsah SiO_2 a Al_2O_3 ako čierne uhlie a zvyčajne sú produkované zo spaľovania nízko kvalitných lignitov a hnedého uhlia. Súčet $SiO_2 + Al_2O_3 + Fe_2O_3$ je v rozsahu 50 – 70 %. Zvýšený obsah CaO v triede C je pripisovaný prítomnosti CaO, kryštalického $3CaO{\cdot}Al_2O_3$ alebo belitu (Chancey et al., 2010). Polietavý popol s obsahom CaO viac ako 15 % je vhodný ako materiál používaný pri výrobe portlandského cementu (Manz, 1998).

Tab. 4 Chemické zloženie polietavých popolov v triedach F a C (Scheetz et al., 1997; Scheetz, 2004)

	Trieda F (hm.%/STDV)	Trieda C (hm.%/STDV)
SiO_2	52,5 ± 9,6	36,9 ± 4,7
Al_2O_3	22,8 ± 5,4	17,6 ± 4,7
Fe_2O_3	7,5 ± 4,3	6,2 ± 1,1
CaO	4,9 ± 2,9	25,2 ± 2,8
MgO	1,3 ± 0,7	5,1 ± 1,0
Na_2O	1,0 ± 1,0	1,7 ± 1,2
K_2O	1,3 ± 0,8	0,6 ± 0,6
SO_3	0,6 ± 0,5	2,9 ± 1,8
vlhkosť	0,11 ± 0,14	0,06 ± 0,06
LOI	2,6 ± 2,4	0,33 ± 0,35

STDV – smerodajná odchýlka

3.3.2 Minerálne zloženie polietavého popola

Polietavý popol pozostáva hlavne z amorfných skiel a niekoľkých kryštalických fáz. Podľa mnohých prác (Querol et al., 1995; Hower et al., 1996; Sulovský, 2002; Kukier et al., 2003; Vassilev et al., 2003, 2005a,b; Moreno et al., 2005; Kutchko a Kim, 2006; Koukouzas et al., 2006; Ward a French, 2006; Koukouzas et al., 2007; Koukouzas et al., 2009; Kostakis, 2009; Dai et al., 2010; Font et al., 2010; Chancey et al., 2010; Medina et al., 2010) k najčastejšie sa vyskytujúcim hlavným minerálnym fázam v popole patria: kremeň (SiO_2), nespálené zvyšky uhlia, hematit (Fe_2O_3), magnetit (Fe_3O_4), mullit ($\sim Al_6Si_2O_{13}$), maghemit (γ-Fe_2O_3), anhydrit ($CaSO_4$), dolomit ($CaMg(CO_3)_2$), albit ($NaAlSi_3O_8$), anortit ($CaAl_2Si_2O_8$), kalcit ($CaCO_3$), K-živce ($KAlSi_3O_8$), illit ($(K,H_3O)(Al,Mg,Fe)_2(Si,Al)_4O_{10}[(OH)_2,(H_2O)]$), ettringit, opál, kaolinit ($Al_2Si_2O_5(OH)_4$), periklas (MgO), rutil (TiO_2), kristobalit (SiO_2), sadrovec ($CaSO_4.2H_2O$), vápenec ($CaCO_3$), spinel ($MgAl_2O_4$), tridymit (SiO_2), wollastonit ($CaSiO_3$), melilit ($(Ca,Na)_2(Al,Mg,Fe^{2+})(Si,Al)_2O_7$), skupina chloritu ($(Mg,Fe)_3(Si,Al)_4O_{10}(OH)_2.(Mg,Fe)_3(OH)_6$) a ďalšie (tab. 5, spracovaná na základe viacerých literárnych zdrojov, [1)] FBC+ [2)] PCC – vysvetlivky ku tab. 4)

[1)] *Fluidné spaľovanie* – FBC

Fluidné spaľovanie uhlia (*fluidized bed combustion*) predstavuje moderný a účinný spôsob spaľovania. Ohriaty prúdiaci vzduch vytvára nad fluidným roštom vrstvu, v ktorej sa vznášajú častice jemne rozomletého uhlia, polietavého popola a vápenca. Vo vhodne zvolenom spaľovacom priestore sa vrstva správa ako vriaca kvapalina. Častice uhlia sú obalené vzduchom a proces horenia je rýchly a pomerne ľahko regulovateľný. Spaľovacie teploty sú v rozsahu 700 – 900 °C (www.javys.sk).

[2)] *Spaľovanie práškového uhlia* – PCC

Prášková technológia je výraz pre technológiu spaľovania uhlia, ktorá dokáže spáliť palivo s vysokým obsahom popola a vody s účinnosťou vyššou, než majú roštové ohniská. Do vybavenia elektrární využívajúcich práškovú technológiu patria uhoľné mlyny drviace uhlie na prášok (odtiaľ názov tejto technológie), ktorý je potom vháňaný do horákov kotla prúdom vzduchu alebo spalín, prípadne ich zmesou (www.javys.sk). Teploty práškového spaľovania (*pulverized coal combustion*) sa zvyčajne pohybujú okolo 1400 °C (~ 2500 °C). Pri týchto teplotách sa môže minerálna hmota v uhlí oxidovať, rozložiť, roztaviť, rozpadnúť alebo hromadiť (Kutchko a Kim, 2006).

Tab. 5 Minerálne fázy identifikované v polietavom popole (rôzne literárne zdroje)

Autor	Font et al. (2010)		Medina et al. (2010)	Moreno et al. (2005)	Kostakis (2009)	Kutchko a Kim (2006)	Koukouzas et al. (2006)		Vassilev et al. (2003)
Štát	Belgicko	Španielsko Holandsko	Mexico	Španielsko Taliansko Holandsko Grécko	Grécko	USA	Grécko	Čína	Španielsko
typ elektrárne	FBC[1)]	PCC[2)]	PCC	PCC		PCC			PPC
teplota spaľovania	734 – 870 °C	1400 – 1500 °C							500 °C
typ paliva	U, B, K	U, U/RK, B/U	HU, ČU	L, HU, ČU, A	L	ČU	L	L	ČU, SA, A
počet vzoriek	5	10		23	95	12			6
Minerály									
Silikáty									
kremeň	x	x	x	x	x	x	x	x	x
mulit	x	x	x	x	x	x		x	
K-živec					x		x		x
albit	x	x		x					
anortit	x	x		x					
plagioklas	x	x							x
ortoklas									
kaolinit								x	x
montmorillonit									x
illit	x	x			x				x
opál				x					
muskovit					x				x
wollastonit									
melilit									
gehlenit					x		x		
pyroxény					x				
merwinit					x				
Oxidy a hydroxidy									
hematit	x	x		x	x	x	x		x
magnetit	x	x	x	x	x	x			
vápno	x	x		x	x	x	x		x
korund									x
periklas					x				x
portlandit						x	x		
rutil						x			
hercynit					x				
brownmillerit					x				
mayenit					x				
Karbonáty									
kalcit		x	x	x	x	x	x	x	x
dolomit								x	x
siderit									x
ankerit									x
Sírany									
anhydrit	x	x		x	x	x	x		x
sadrovec						x			
Iné									
Al-Si sklo	x	x	x	x	x		x		x
ettringit				x					
sillimanit						x			
hannebachit						x			
Ca_2SiO_4					x				
böhmit								x	

Vysvetlivky:
HU – hnedé uhlie, **ČU** – čierne uhlie, **U** – uhlie, **A** – antracit, **SA** – semi-antracit**, L** – lignit, **B** – biomasa, **K** – kal **RK** – ropný koks

3.3.3 Potenciálne toxické prvky v polietavom popole

Koncentrácia prvkov v polietavých popoloch závisí hlavne od zloženia uhlia, podmienok spaľovania a zariadení na ochranu ovzdušia (Kukier et al., 2003). Stopové prvky, ktoré sú v uhlí viazané v organickej hmote a sulfidoch, majú tendenciu vyparovať sa prvé a počas chladenia spalín sú potom ľahko adsorbované na jemné častice (menšie ako 10 μm v priemere), zatiaľ čo prvky asociované s minerálnym materiálom zostávajú koncentrované viac v matrici popola (Xu et al., 2003).

K prvkom, u ktorých bolo pozorované sorpčné obohatenie na veľkom povrchu jemnozrnných častí, patria: As, Cd, Cr, Co, Pb, Hg a Zn (Wadge et al., 1986). Vzťah medzi zložením polietavého popola a veľkosťou jeho častíc študovali aj Martinez-Tarrazona a Spears (1996). So znižovaním veľkosti častíc sa zvyšovala koncentrácia As, Cu, Mo, Pb a Zn. Autori Spears a Martinez-Tarrazona (2004) skúmali detailnejšie asociáciu stopových prvkov k povrchu častíc. Výskyt prvkov As a Mo súvisí hlavne s povrchom, prvky Cu, Zn a Pb sú distribuované rovnomernejšie, V, Cr a Ni majú nižšiu (30 – 20 %) a Ba a Sr minoritnú (10 %) asociáciu k povrchu častíc.

Sklo je fáza, ktorá v polietavom popole predstavuje hlavný adsorbent pre stopové prvky. V prírodných vulkanických horninách je sklo počas chemického zvetrávania pomerne nestabilné a sklo v popole môže (podobne ako vulkanické sklo) po dlhodobej expozícii viesť k rozrušeniu a ďalšiemu uvoľňovaniu prvkov, ktoré sú lúhované do okolia (Ward a French, 2006). Sklá sú schopné adsorbovať rôzne prvky v rôznych koncentráciách a formách. Prvky sú na pevné častice prichytené priamo alebo tvoria na nich povlaky. Sklá tvorené predovšetkým Si, Al a Fe, môžu byť obohatené o potenciálne mobilné hlavné prvky ako Ca, Mg, Na a K, o minoritné prvky ako P a B. Iné (polo)kovy (Cd, As, Sb, Se, Pb, Ni, Cu, Cr, Co, Mo, Be) sú prítomné v nižších koncentráciách vo forme uhličitanov, oxidov, hydroxidov a síranov (Jankowski et al., 2006, tab. 6).

Keďže potenciálne toxické stopové prvky sú koncentrované na alebo blízko povrchu popolových častíc počas spaľovania (Querol et al., 1995), alterácia popola vplýva priamo na ich mobilitu alebo retenciu (Fishman et al., 1999). Prvky, ktoré sú adsorbované na povrchoch častíc, sú oveľa ľahšie uvoľnené do roztoku počas interakcie popol – voda. Vylúhovateľnosť týchto prvkov je úzko spätá s fázami, na ktoré sú viazané, podobne ako s hodnotou pH a ďalšími aspektami lúhovaného prostredia (Jankowski et al., 2006).

Množstvo stopových prvkov uvoľnených z polietavého popola do roztoku a miera uvoľnenia, závisia od 3 faktorov (Eary et al., 1990):

– celkovej koncentrácie prvkov v pevných fázach,
– distribúcie prvkov v časticiach polietavého popola,
– začlenenia prvkov do sekundárnych pevných fáz.

Tab. 6 Stopové prvky (mg.kg^{-1}) prítomné v polietavom popole v niektorých štátoch

PRVOK (mg.kg^{-1})	MFA Coahuila, Mexiko Medina et al. (2010)	European PCC (Španielsko, Holandsko, Taliansko, Grécko) Moreno et al. (2005)	Ptolemais, Grécko Koukouzas et al. (2006)	UK Spears a Martinez-Tarrazona (2004)	Španielsko Vassilev et al. (2003)
As	40	22 - 162	-	104	89 - 186
B	157	24 - 534	24 - 189	-	-
Ba	589	311 - 3134	104 - 184	656	1990 - 2900
Be	5	3 - 34	-	-	-
Bi	-	-	0,23 - 0,37	-	-
Cd	0,9	1 - 6	0,34 - 1,23	-	< 1
Co	13	20 - 112	13 - 37	-	21 - 28
Cr	44	47 - 281	152 - 477	208	123 - 174
Cu	46	39 - 254	-	359	66 - 100
Ga	-	-	11 - 15	-	-
Ge	12	1 - 61	-	-	6,3 - 18
Hg	0,2	< 0,01 - 1,4	33 - 61	-	-
Li	99	36 - 377	-	-	245 - 319
Mo	11	5 - 22	3 - 8	20	5,8 - 11
Mn	-	-	-	639	299 - 394
Ni	22	49 - 377	130 - 671	169	74 - 88
Pb	46	40 - 1075	15 - 20	145	44 - 81
Rb	52	22 - 202	-	155	38 - 59
Sb	4	1-120	0,21 - 0,58	-	8,0 - 18
Sc	-	-	8 - 16	-	28 - 73
Se	6	3 - 30	2 - 4	-	1,7 - 4,8
Sn	5	4 - 15	-	-	4,5 - 13
Sr	302	131 - 4406	195 - 400	286	149 - 515
Th	25	17 - 65	8 - 11	-	-
U	9	5 - 29	-	-	-
V	116	154 - 514	111 - 150	356	140 - 272
W	-	-	0,2 - 1,5	-	-
Zn	94	70 - 924	37 - 71	152	119 - 233

Minoritné prvky prítomné v rozpustných fázach budú rozpúšťané prostredníctvom kongruentných rozpúšťacích reakcií. Prvky alkalických zemín prítomné na povrchoch častíc sú na začiatku rýchlo rozpúšťané a prechádzajú do roztoku, ale neskôr, so zvyšujúcou hodnotou pH a koncentráciou prvkov, môžu opätovne precipitovať a vytvárať sekundárne minerálne fázy, ktoré sú stabilnejšie v rámci interakcie popol – voda (Roy et al., 1984).

Vassilev et al. (2005b) skúmali chemické a minerálne zloženie frakcií polietavého popola oddelených na základe veľkosti, hustoty, magnetické, nemagnetické a vodorozpustné frakcie.

Nespálené zvyšky uhlia (char concentrates) (3,3 – 3,4 %) boli zložené z uhlíka a niekoľkých anorganických fáz. Táto frakcia bola vysoko obohatená o U > S > Mn > Mo > Fe > Sb. Ľahká frakcia (< 1g.cm^{-3}, 0,4 – 0,8 %) obsahovala poréznu cenosféru a uhlík s hubovitou a vezikulárnou štruktúrou, ktorý bol impregnovaný kalcitom, anhydritom, portlanditom a ílovými minerálmi. Táto frakcia obsahovala vysokú koncentráciu prvkov Sb > Se > As. Vodorozpustné zvyšky (1,7 – 2,6 %) sa skladali zo sadrovca, portlanditu, šťaveľanu Ca a kalcitu a boli obohatené o vodorozpustné prvky Sb > Mo > S > Ca. V magnetickej frakcii (1,4 - 2,3 %) boli koncentrované magnetit, hematit a spinel železa a obohatená bola o Mn > Fe > Co > Cu > Ni > Zn > (Mo, Yb) > (Lu, Tm, Y) > (Er, Ho, Mg) > Sb. Nemagnetická hrubozrnná frakcia (> 63 μm, 49 – 56 %) obsahovala väčšinou hrubozrnné sklo, kremeň, kalcit a mullit. Nemagnetická jemnozrnná frakcia (< 63 μm, 39 – 47 %) pozostávala hlavne z jemnozrnných skiel, kalcitu, kremeňa, uhlíka a mullitu.

V práci Kukier et al. (2003), v nemagnetickej frakcii polietavého popola taktiež dominovali kryštalické minerály kremeň a mullit. Magnetická frakcia obsahovala magnetit, hematit, menší obsah kremeňa a mullitu. Na základe chemickej analýzy mala magnetická frakcia približne 10-násobne vyššiu koncentráciu železa a 2 až 4-krát vyššiu koncentráciu Co, Ni a Mn. Nemagnetická frakcia bola obohatená o K, Al a Ca. Rozpustnosť väčšiny prvkov bola vyššia v nemagnetickej ako v magnetickej frakcii alkalických popolov pri porovnateľnej hodnote pH. Vápnik sa nachádzal najmä v nemagnetickej frakcii alkalických polietavých popolov, čo viedlo k zvýšeniu hodnoty pH pufrovacej kapacity tejto frakcie.

Lu et al. (2009) taktiež skúmali magnetickú frakciu polietavého popola, ktorá bola zložená z magnetitu, hematitu, kremeňa a mullitu a obohatená o prvky: Fe, Mn, Cr, Cu, Cd a Pb. V porovnaní s nemagnetickou frakciou mala 5-krát vyššie koncentrácie Fe a 1,6-krát vyššie koncentrácie Mn, Cr, Cu a Cd. Vylúhovateľnosť ťažkých kovov s vysokým potenciálom uvoľnenia do prostredia v acidifikovanom prostredí určili v rade Cu > Cr > Pb > Cd.

Arzén v polietavom popole

Arzén, prvok s unikátnym postavením ako klasický jed, je prítomný v relatívne vysokých koncentráciách v niektorých popoloch (tab. 3 a 5) (EPRI, 1998). Koncentrácie arzénu v popolových časticiach s priemerom menším ako 10 μm sú 10- až 100-násobne vyššie ako v nespálenom uhlí. Značne vysoká koncentrácia arzénu je v časticiach menších ako 2,7 μm. V popolových časticiach triedených na základe hustoty sa koncentrácie arzénu pri hustote < 2,3 g.cm^{-3} a viac ako 2,9 g.cm^{-3} veľmi nelíšia (Ainsworth et al., 1993). Vzťahy priemernej koncentrácie arzénu v polietavom popole v závislosti od kvality uhlia sumarizovali Eary et al.

(1990): čierne uhlie (n = 26) priemerný obsah As 219 $mg.kg^{-1}$ (11 – 1385 $mg.kg^{-1}$), hnedé uhlie (n = 8) priemerný obsah 19,1 $mg.kg^{-1}$ (8 – 34 $mg.kg^{-1}$), lignit (n=5) 54,4 $mg.kg^{-1}$ (21 – 96 $mg.kg^{-1}$).

Kizilstein (2002 in Yudovich a Ketris, 2005) navrhol schému pre precipitáciu arzénu na povrchu polietavého popola. V polietavom popole sú prítomné dva typy guľovitých častíc (s priemerným priemerom blízko 0,17 mm): duté (s hustotou okolo 0,60 – 0,65 $g.cm^{-3}$) a kompaktné s vyššou hustotou. Ak povrchový kondenzačný povlak má rovnakú hrúbku na každej častici (okolo 2 – 4 μm), koncentrácia arzénu v dutých guličkách musí byť vyššia kvôli ich nižšej hustote. Výskum polietavého popola pochádzajúceho zo spaľovania antracitu potvrdzuje túto hypotézu: obsah arzénu v dutých guličkách bol 90 $mg.kg^{-1}$ a v kompaktných len 50 $mg.kg^{-1}$. Kizilsteinov výpočet ukázal, že povrchový film obsahuje 18 % z celkového výskytu As v guličkách.

Termodynamické modelovanie

Termodynamické výpočty uvádzajú, že pri spaľovaní uhlia v redukujúcom prostredí sa sulfidický aj arzeničnanový As vyparuje ako As^0. V oxidujúcom prostredí spalín je arzén rýchlo oxidovaný na stabilný As^{5+} a neskôr kondenzovaný ako As_2O_5. V skutočnosti sa celý proces výrazne komplikuje v dôsledku vytvárania tepelne stabilného $Ca_3(AsO_4)_2$. Preto, namiesto homogénnej kondenzácie (As_2O_5 (plyn) => As_2O_5 (tuhá látka)), prebieha heterogénna kondenzácia (As_2O_5 (plyn) + CaO (tuhá látka) => $Ca_3(AsO_4)_2$ (tuhá látka), čiže arzén sa z plynnej fázy sorbuje chemicky na povrch polietavého popola. Tento proces je silne ovplyvnený obsahom CaO v popole. Keďže CaO je žiaruvzdorná fáza, najvyšší obsah CaO bude v hrubozrnnom polietavom popole, ktorý môže zachytiť arzén zo spalín (Yudovich a Ketris, 2005).

Reálny obraz je ovplyvnený rýchlosťou chladenia spalín. Termodynamicky predpokladaný vznik $Ca_3(AsO_4)_2$ sa môže vyskytovať len pri pomalom chladení spalín. Pri rýchlom ochladení sa neustáli termodynamická rovnováha a v takom prípade je rozdelenie arzénu v popole v súlade s veľkosťou častíc: jemnejšia veľkosť častíc – vyšší obsah As. Ide o rozdelenie kvôli fyzikálnej sorpcii, nie chemickej (Senior et al., 2000a,b).

Arzén môže vstupovať do kryštalickej aj amorfnej (sklovitej) fázy polietavého popola. Podľa Mukhopadhyay et al. (1996), reakcia pyritu so silikátmi vedie k formovaniu sklovitých fáz troch typov: obohatené o Fe-O, Fe-Al-Si-O, Al-Si-O. 70 % pyritického As sa v polietavom popole vyskytuje vo frakcii < 2,81 $g.cm^{-3}$. V polietavom popole je arzén rovnomerne distribuovaný medzi sklovitými fázami typu Fe-O a Fe-Al-Si-O a kryštalickými fázami, kým v popole z dna je arzén asociovaný s kryštalickými fázami Fe-O a Fe-S.

Arzén je zachytený zo spalín na aktívne katiónové miesta polietavého popola (Ca^{2+} a Fe^{3+}) pomocou chemisorpcie, ale výskyt a prístupnosť týchto miest sú spojené nielen s veľkosťou frakcií, ale taktiež s chemickým zložením polietavého popola (Yudovich a Ketris, 2005).

Výsledkom silnej afinity arzénu k vápniku je, že arzén sa v polietavých popoloch bohatých na vápnik nachádza ako $Ca_3(AsO_4)_2$ a $Ca_2As_2O_7$, pravdepodobne potom, čo je absorbovaný z plynnej fázy ako As_2O_3 a následne oxidovaný z As^{3+} na As^{5+} (Mahuli et al., 1997; Jadhav a Fan, 2001; Sterling a Helble, 2003). Počas spaľovania uhlia je rozdelenie arzénu medzi plynné a pevné fázy určené práve interakciami arzénu v plynnej fáze a časticami popola, ktoré obsahujú vápnik. Predpokladá sa, že všetky formy vápnika prítomné v polietavom popole (napr. CaO, Ca_2SiO_4, $CaSiO_3$,...) môžu reagovať s plynným arzénom a zachytiť tento prvok vo vode nerozpustných formách menej toxického As^{5+} (Sterling a Helble, 2003).

Práca Goodarzi (2006) uvádza zachytenie arzénu minerálmi obsahujúcich Ca a hematitom a vznik stabilného komplexu s vápnikom alebo zlúčeninu $[(M^{2+})_2Fe_3(AsO_4)_3(\text{-}OH)_4.10H_2O]$, kde M^{2+} je prechodný kov.

3.4 Podmienky vylúhovateľnosti prvkov z popolov

Hodnoty pH polietavého popola sú v rozmedzí od 4,5 po 12 v závislosti od obsahu síry v pôvodnom uhlí (Pandey a Singh, 2010). Podľa štúdie Ainsworth a Rai (1987) polietavé popoly s pomerom Ca/S < 2,5 produkujú kyslé roztoky, zatiaľ čo popoly s pomerom Ca/S > 2,5 tvoria alkalické roztoky. Hodnota pH roztoku je dôležitý faktor kontrolujúci typ a zloženie sekundárnych fáz formovaných vo zvetrávaných produktoch spaľovania uhlia. Roztok pórovej vody z popola má často extrémne vysoké hodnoty pH (> 10), prevažne v dôsledku rozpúšťania vysoko reaktívnych, malých častíc CaO (< 1 μm) a ďalších oxidov alkalických zemín, ktoré sú bežné ako povlaky na väčších sklovitých časticiach (Dudas, 1981, Fishman et al., 1999). Pri vysokých hodnotách pH podlieha sklo rýchlemu rozpúšťaniu (Hay, 1966).

Vyššie priemerné hodnoty pH zvetrávania produktov spaľovania uhlia vedú k precipitácii aluminosilikátov s nižšími pomermi Si/Al ako u tých aluminosilikátov, ktoré sú formované v prírodných prostrediach, napr. zvetrávanie kremičitých sopečných popolov v otvorenom hydrologickom systéme (Hay a Sheppard, 1981 in Donahoe, 2004).

Podľa Killingley et al. (2000), počiatočná hodnota pH systému popol - voda závisí od rovnováhy medzi koncentráciou prvkov alkalických zemín, Ca a Mg, v popoloch na jednej strane a podielu SO_3 (potenciálny zdroj vytvárania kyseliny) na druhej strane.

Povrchové náboje sorbentov sú, aspoň čiastočne, závislé od hodnoty pH. Katióny a hydroxykatióny kovov môžu byť adsorbované na negatívne nabité povrchy, kým oxyanióny a hydroxyanióny kovov môžu byť adsorbované na pozitívne nabité povrchy (Sposito, 1984 in Donahoe, 2004). Zmenou hodnoty pH roztoku tak možno očakávať zmeny adsorpčného správania a rozpustnosti stopových prvkov a následne aj ich mobility (Donahoe, 2004).

Jankowski et al. (2006) skúmali správanie sa As, B, Mo a Se v testoch lúhovania zo 4 druhov polietavých popolov pre hodnotenie ich potenciálu mobilizácie počas interakcie polietavý popol – voda. Dva druhy popolov boli kyslé a dva alkalické. Všetky 4 prvky sú mobilné pod rôznymi podmienkami a v rôznych časoch lúhovania. Hodnotené boli koncentrácie týchto prvkov v lúhovacích roztokoch s počiatočnými hodnotami pH 4, 7 a 10 pre posúdenie vplyvu podmienok pH na mobilitu prvkov z kyslého a alkalického popola. Najmobilnejším zo 4 prvkov bol molybdén z alkalického popola a bór z kyslého popola. V roztokoch v kontakte s alkalickým popolom sa koncentrácia arzénu po dosiahnutí maxima neskôr znižovala s časom. Mobilita selénu vykazovala podobný charakter ako arzén, s podobnými vylúhovanými koncentráciami. Najvyššiu mobilitu zo všetkých prvkov mal bór. Autori potvrdili význam hodnoty pH ako kľúčového faktora, ktorý ovplyvňuje mobilitu skúmaných prvkov v daných popoloch a taktiež uvádzajú, že možný proces zodpovedný za pokles koncentrácie B, As a Se v alkalickom lúhovacom roztoku, je vytváranie ettringitu.

Jegadeesan et al. (2008) posudzovali mobilitu As, Cr, Pb, Fe, Cu a Zn v polietavom popole triedy F. Prvky Fe, Pb a Cr boli mierne rozpustné v kyslých podmienkach a málo rozpustné v neutrálnych podmienkach. Uvoľnenie arzénu bolo vyššie pri hodnotách pH < 4 a pH > 9. Hlavnú úlohu v mobilite kovov mali oxidy Fe. Lúhovanie väčšiny katiónov kovov, ako je Pb, Cu a Ni, je nižšie vzhľadom k alkalickej povahe polietavého popola (Kim, 2006). Veľmi silné alkalické podmienky (pH > 10) môžu vyvolať uvoľnenie týchto prvkov kvôli desorpčno/rozpúšťacím reakciám (Al-Abed et al., 2007; Van der Hoek et al., 1994).

3.5 Chemické a minerálne zloženie čerstvého a pochovaného popola na lokalite Zemianske Kostoľany

Základné fyzikálno-chemické charakteristiky jednej reprezentatívnej vzorky čerstvého popola pochádzajúcej z Pôvodného odkaliska (vzorka č. 1) a štyroch vzoriek pochovaných popolov (vzorka č. 2, 3, 4 a 5) uvádzajú tab. 7 a tab. 8. Z hlavných prvkov majú najväčšie zastúpenie Si, Fe, Ca, Al a Mg (Veselská et al., 2013). Hodnota CEC je výrazne nižšia vo vzorke čerstvého popola. Zaujímavá je hodnota merného povrchu (S_A), ktorý je najväčší vo vzorke čerstvého popola a tiež

vo vzorke pochovaného popola č. 5. V čerstvom popole dominuje piesčitá frakcia 0,1 – 2 mm (51,46 hm. %), kým v pochovaných popoloch prevláda prachovitá frakcia 0,01 – 0,05 mm (26,83 – 38,26 hm. %). Na základe zrnitostného klasifikačného trojuholníka patria antropogénne sedimenty medzi piesočnaté a hlinito-piesočnaté druhy pôd, s nízkym až stredným obsahom organického uhlíka a sú stredne alkalického charakteru.

Tab. 7 Fyzikálno-chemické charakteristiky vzoriek čerstvého popola (vzorka č. 1) a pochovaných popolov (vzorky č. 2, 3, 4, 5)

	vz. 1	**vz. 2**	**vz. 3**	**vz. 4**	**vz. 5**
Hĺbka odberu (cm)	0 - 30	> 40	> 40	70 - 100	> 40
pH (H_2O)	8,17	8,26	8,31	8,02	7,93
pH (KCl)	8,29	7,55	7,55	7,50	7,34
CEC ($cmol^+.kg^{-1}$)	7,58	18,29	14,74	16,43	26,79
S_A ($m^2.g^{-1}$)	20,18	7,21	8,66	8,58	16,33
$CaCO_3$ (hm. %)	0,95	2,24	2,39	2,38	6,81
C_{ox} (%)	1,60	1,08	1,14	0,77	1,01
< 0,002 mm (hm. %)	0,35	0,58	0,76	0,53	1,72
< 0,01mm (hm. %)	2,51	15,96	11,04	8,54	15,46
0,01-0,05 mm (hm. %)	37,81	38,26	34,53	26,83	34,74
0,05-0,1mm (hm. %)	8,23	19,14	18,86	18,70	18,24
0,1-2 mm (hm. %)	51,46	26,64	35,57	45,93	30,55
Pôdny druh	lp[a]	lh[b]	lh[b]	lp[a]	lh[b]

[a]lp – piesočnatá, [b]lh – hlinito-piesočnatá

Zo stopových prvkov sú na základe Zákona č. 220/2004 Z. z. pre poľnohospodársku pôdu nad limitnou koncentráciou detekované As, Hg a Cu, avšak koncentrácie arzénu sú viacnásobne vyššie ako koncentrácie ostatných stopových prvkov. Na základe zrnitostného zloženia vzoriek je limitná koncentrácia arzénu pre daný pôdny druh 10 $mg.kg^{-1}$, pričom vo vybraných vzorkách sa jeho celkový obsah pohybuje od 714,00 po 1264,00 $mg.kg^{-1}$. Mierne prekročenie limitu pre danú zrnitostnú skupinu je vo všetkých vzorkách aj v prípade Cu (30 $mg.kg^{-1}$). Limit pre ortuť (0,15 $mg.kg^{-1}$) je prekročený vo všetkých vzorkách pochovaného popola.

Pri určovaní celkových chemických a fyzikálnych vlastností popola sú dôležité hlavne jeho jemnejšie častice, ktoré majú veľký merný povrch a kontrolujú tak celkovú adsorpčnú kapacitu (Openshaw et al., 1992). Porovnaním celkových koncentrácií niektorých stopových prvkov v troch rôznych zrnitostných frakciách (< 1 mm, < 63 μm, < 25 μm) čerstvého a pochovaného popola sa potvrdila dôležitá vlastnosť jemnejších častíc viazať tieto prvky prostredníctvom svojho veľkého povrchu (tab. 9). Oproti iným stopovým prvkom v popole, sa arzén vyznačuje silným obohatením (5 až 10x) v najjemnejších frakciách (< 10 μm) (Smith, 1980). Danú

skutočnosť potvrdzujú aj analýzy popolov z lokality Zemianske Kostoľany (tab. 8), kde bol pozorovaný jednoznačný trend nárastu koncentrácie arzénu so zmenšovaním veľkosti častíc popola. Zvyšovanie koncentrácie prvku so zmenšovaním veľkosti častíc je pozorované aj u Co a Cu, v prípade Ni a Mn len vo vzorke čerstvého popola a pri Pb a Hg vo vzorke pochovaného popola. Obsah Sb je najvyšší v 1 mm frakcii. Podľa Spearsa (2004 in Spears a Martinez-Tarrazona, 2004) majú významný vzťah k povrchu popolových častíc aj U, Tl, Se, Ge a v menšej miere Ga. Zvyšovanie obsahu As, Cu, Mo, Pb a Zn so zmenšovaním veľkosti častíc uvádzajú Martinez-Tarrazona a Spears (1996).

Tab. 8 Komplexná chemická analýza vzoriek čerstvého popola (vzorka č. 1) a pochovaných popolov (vzorky č. 2, 3, 4, 5) na základe ICP-ES/ICP-MS. Zvýraznené hodnoty – prekročenie limitnej koncentrácie daného prvku podľa Zákona 220/2004 Z. z. pre poľnohospodársku pôdu

			vz. 1	**vz. 2**	**vz. 3**	**vz. 4**	**vz. 5**
Hĺbka odberu (cm)			0 - 30	> 40	> 40	70 - 100	> 40
	Prvok	det. limit					
hm. %	Fe	0,01	3,88	3,38	3,93	4,63	3,22
	Al	0,01	2,89	2,94	3,24	3,66	2,84
	Ca	0,01	2,69	3,58	3,72	3,60	4,65
	Na	0,01	0,11	0,10	0,10	0,13	0,07
	K	0,01	0,35	0,26	0,31	0,38	0,24
	Mg	0,01	0,64	0,65	0,76	0,76	0,73
	S	0,05	0,20	<0,50	0,06	0,08	0,08
	Ti	0,001	0,12	0,15	0,15	0,15	0,11
	P	0,001	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06
mg.kg^{-1}	**As**	5	**714**	**1264**	**1134**	**1090**	**1047**
	Cu	0,5	**34,3**	**35,8**	**42,5**	**48,3**	**30,2**
	Pb	0,5	10,2	8,6	6,9	8,8	11,7
	Zn	5	47	42	30	43	43
	Ni	0,5	26,3	22,6	21,5	30,5	22,9
	Co	0,5	9,1	8,7	8,5	10,4	8,6
	Mn	5	707	600	637	626	535
	Mo	0,5	5,6	4,1	5,1	6,0	3,1
	U	0,5	4,2	5,7	4,8	5,2	3,8
	Hg	0,05	0,08	**0,38**	**1,02**	**0,87**	**3,62**
	Cr	0,5	22,80	20,80	22,40	25,90	20,00
	Ba	5	307	346	384	404	533
	Sb	0,5	11,7	1,2	0,9	6,4	12,5
	Cd	0,5	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50
	Th	0,5	5,00	6,30	6,40	6,00	5,20
	Sr	5	168	228	210	257	183
	Bi	0,5	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50
	V	10	92	88	95	94	73
	La	0,5	16,00	20,00	17,40	18,30	16,20
	W	0,5	3,50	4,70	3,90	3,20	2,30
	Sc	0,5	8,50	8,30	8,40	9,70	8,30
	Ga	5	8,00	7,00	9,00	8,00	7,00

Tab. 9 Hodnoty merného povrchu (S_A) a celkové obsahy niektorých potenciálne toxických stopových prvkov vo vzorke čerstvého a pochovaného popola

Vzorka	Frakcia	S_A ($m^2.g^{-1}$)	Celkové obsahy ($mg.kg^{-1}$)							
			As	Sb	Mn	Ni	Co	Cu	Pb	Hg
Čerstvý popol	1 mm	20,18	**714**	11,7	707	26,3	9,1	34,3	10,2	0,08
	63 µm	4,48	**1157**	2,0	999	28,7	11,0	34,3	6,0	<0,05
	25 µm	4,74	**1859**	3,1	1275	37,9	13,1	41,9	8,8	<0,05
Pochovaný popol	1 mm	8,58	**1090**	6,4	626	30,5	10,4	48,3	8,8	0,87
	63 µm	7,95	**1296**	1,8	670	31,7	11,3	44,3	7,3	1,19
	25 µm	9,77	**1562**	2,2	627	30,2	11,5	51,1	9,0	1,62

3.5.1 Minerálne zloženie čerstvého a pochovaného popola

Z kvantitatívnej XRD analýzy vyplýva, že vo väčšine vybraných vzoriek sú hlavnou zložkou amorfné resp. slabokryštalické minerálne fázy (tab. 10). Na základe mikroskopického štúdia a mikrosondových analýz sú tieto fázy tvorené prevažne amorfnými sklami s variabilným chemickým zložením, čo sa zhoduje s výsledkami mnohých autorov (napr. Dai et al., 2010). Do tejto skupiny možno tiež zaradiť nespálené zvyšky uhlia, ako aj amorfné oxyhydroxidy Fe. V prípade vzoriek popola zmiešaných s pôdou sa na amorfnom zvyšku podieľajú aj ílové minerály.

Tab. 10 Kvantitatívne zastúpenie hlavných minerálnych fáz vo vzorkách (hm. %), vzorka č. 1 – čerstvý popol, vzorka č. 2, 3, 4 a 5 – pochovaný popol

	vz .1		vz. 2		vz. 3		vz. 4		vz. 5	
Frakcia	25*	1*	25	1	25	1	25	1	25	1
Albit	2,10	4,40	1,10	13,50	2,40	7,00	-	-	0,40	8,60
Anortit	-	-	-	-	-	-	8,30	12,9	-	-
Kalcit	2,10	1,30	50,6	1,20	3,10	2,10	1,70	-	12,1	4,60
Kremeň	4,20	3,50	4,90	4,70	3,40	4,30	3,20	5,90	2,60	5,80
Magnetit	1,10	-	0,60	-	-	-	1,20	-	-	-
Mullit	44,00	1,20	0,70	0,80	2,10	1,10	1,10	-	0,00	-
Hematit	3,10	1,20	2,00	1,00	2,20	0,80	2,70	0,90	0,80	-
Kristobalit	-	-	1,00	4,00	-	-	-	-	0,40	-
Pyrit	-	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
Perovskit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,30
Montmorillonit	-	-	0,10	-	-	-	-	-	-	-
Rutil	-	-	-	-	0,20	-	-	-	-	-
Muskovit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,10
Zvyšok	43,3	88,4	39,0	74,8	86,7	84,6	81,6	80,4	83,7	77,6
Σ	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

25* – frakcia pod 25 µm
1* – frakcia pod 1 mm

Mullit ($Al_2(Al_{2,8}Si_{1,2})O_9$) patrí medzi najbežnejšie minerálne fázy v popoloch a vzniká vysokoteplotnou premenou ílových minerálov, hlavne kaolinitu (Hansen et al., 1981; Spears, 2000; Dai et al., 2010), v menšej miere sľúd, živcov a ďalších aluminosilikátov pri teplotách nad 1000 °C (Vassilev a Vassileva, 1996). Mullit kryštalizuje z taveniny, pričom vytvára sieť kryštálov pod povrchom sklovitého materiálu (Hulett et al., 1980; Hansen et al., 1981; Dudas a Warren, 1987). Vznik mullitu pri teplote vyššej ako 1200 °C súvisí s nadbytkom Al_2O_3/SiO_2 v Al-Si sklách (Font et al., 2010). Najvyšší obsah mullitu sa nachádza v čerstvom popole, kde dosahuje až 44 hm. % (vo frakcii pod 25 μm). V pochovanom popole je jeho obsah do 2,10 hm. %.

Pomerne hojným minerálom v popoloch je **kalcit** ($CaCO_3$). Najvyššie zastúpenie má vo vzorkách pochovaného popola vo frakcii pod 25 μm (až do 50,6 hm. %). Karbonáty prestavujú v elektrárenských popoloch väčšinou primárne a terciárne minerály, zriedka vystupujú ako sekundárne produkty autigénnych minerálov a organickej hmoty v uhlí (Vassilev a Vassileva, 1996). So zvyšujúcou sa teplotou môže byť kalcit premenený na svoje polymorfné modifikácie aragonit a vaterit. Pri teplote okolo 900 °C sa kalcit rozkladá a vytvára CaO, ktorý obyčajne reaguje s oxidmi Si a Mg a vznikajú Ca-Mg silikáty (Liu et al., 2005), prípadne môže Ca pri vysokých teplotách reagovať s aluminosilikátmi za vzniku anortitu, alebo iných živcov (Koukouzas et al., 2009). Aj keď je teplota spaľovania kalcitu vyššia ako teplota rozkladu tohto minerálu, časť primárneho kalcitu je prítomná vo väčšine publikovaných vzoriek popolov po spaľovaní uhlia. Dôvodom je fakt, že v prípade väčších častíc kalcitu dochádza v strede kryštálov k nižšiemu nárastu teploty (Liu et al., 2005).

Bežnými minerálmi v skúmaných popoloch sú **živce** (priemer 6,1 hm. %), vo väčšine vzoriek tvorené albitom ($(Na_{0,98}Ca_{0,02})(Al_{1,02}Si_{2,98}O_8)$), prípadne anortitom ($Na_{0,05}Ca_{0,95}Al_{1,95}Si_{2,05}O_8$). Pôvod živcov (teplota tavenia 1118 – 1553 °C) môže byť primárny, ale tiež sekundárny a vznikať môžu z pevnej fázy reakciou medzi aluminosilikátmi a uvoľnenými oxidmi Ca, K a Na počas spaľovania (Vassilev a Vassileva, 1996).

Kremeň (SiO_2) je prítomný tak v čerstvom ako aj v pochovanom popole. Kremeň v elektrárenských popoloch je považovaný dominantne za primárny minerál, pretože jeho teplota tavenia je 1713 °C (Dai et al., 2010). Kremeň síce z tohto dôvodu nepodlieha procesom spaľovania a niektoré častice kremeňa opúšťajú kotol v nezmenenej minerálnej forme (Hansen et al., 1981), ale pri teplote 573 °C podstupuje zmenu fáz α-kremeň/β-kremeň, čím sa menia veľkosti jednotlivých zŕn (Scheetz, 2004; Ward a French, 2006). Tento tvrdý minerál sa často vyskytuje od hranatých (roztrieštených) až po zaoblené zrnká (Ward, 2002). Vyskytovať sa môže tiež ako bunka alebo pórová výplň v organickej hmote uhlia, čo poukazuje na autigenetický proces precipitácie (Sykes a Lindqvist, 1993). Vznik sekundárneho kremeňa súvisí s premenou ílových minerálov, sľúd a živcov pri teplotách nad 900 °C (Vassilev a Vassileva, 1996).

Vysokoteplotná modifikácia SiO_2 – kristobalit, bol identifikovaný vo vzorkách č. 2 a 5. Pôvod kristobalitu v popolových vzorkách môže byť primárny i sekundárny, ktorý býva výsledkom kryštalizácie organicky viazaného a amorfného kremeňa, rekryštalizácie opálu ($SiO_2.nH_2O$), chalcedónu (SiO_2), ílových minerálov a ďalších silikátových minerálov v uhlí (Vassilev a Vassileva, 1996).

Hoci sa v daných popoloch nachádza aj **magnetit** (Fe_3O_4), jeho množstvá sú pomerne nízke. Magnetit sa v uhlí príliš nevyskytuje, jeho prítomnosť v popole je výsledkom premeny iných minerálov železa počas spaľovania uhlia, predovšetkým pyritu (Kukier et al., 2003).

Súčasťou týchto popolov je taktiež **hematit** (Fe_2O_3) (do 3,1 hm. %), pričom opäť platí, že kvantitatívne viac hematitu je v jemnejšej frakcii. Výskyt hematitu v uhlí je vo všeobecnosti vzácny, považuje sa skôr za sekundárny minerál a jeho vznik súvisí najčastejšie s oxidáciou pyritu (FeS_2) a markazitu (FeS_2), alebo s dekarbonizáciou karbonátov Fe (Koukouzas et al., 2009). Počas spaľovania uhlia je pyrit premieňaný na hematit pri teplote 815 °C (Liu et al., 2005). Hematit môže vznikať aj zo železa, ktoré je viazané určitým spôsobom s organickou hmotou (Vassilev et al., 1995; Li et al., 2007).

V akcesorických množstvách sa v popoloch vyskytuje aj **perovskit** ($CaTiO_3$), **rutil** (TiO_2) a **montmorillonit** ($(Na,Ca)_{0,3}(Al,Mg)_2Si_4O_{10}(OH)_2.n(H_2O)$). Rutil (teplota tavenia 1827 °C) patrí medzi žiaruvzdorné minerály a jeho pôvod je prevažne primárny. Sekundárny pôvod rutilu môže byť výsledkom kryštalizácie z taveniny, polymorfnej premeny anatasu (TiO_2) a brookitu (TiO_2) alebo oxidácie organicky kombinovaného Ti (Vassilev a Vassileva, 1996). Okrem spomínaných hlavných fáz boli v popoloch na základe XRD analýzy identifikované tiež **ilmenit** ($Fe(TiO_3)$), **maghemit** (Fe_2O_3), **pyrotit** (Fe_7S_8) a **pyrit** (FeS_2).

3.5.2 Elektrónová mikroanalýza amorfných skiel

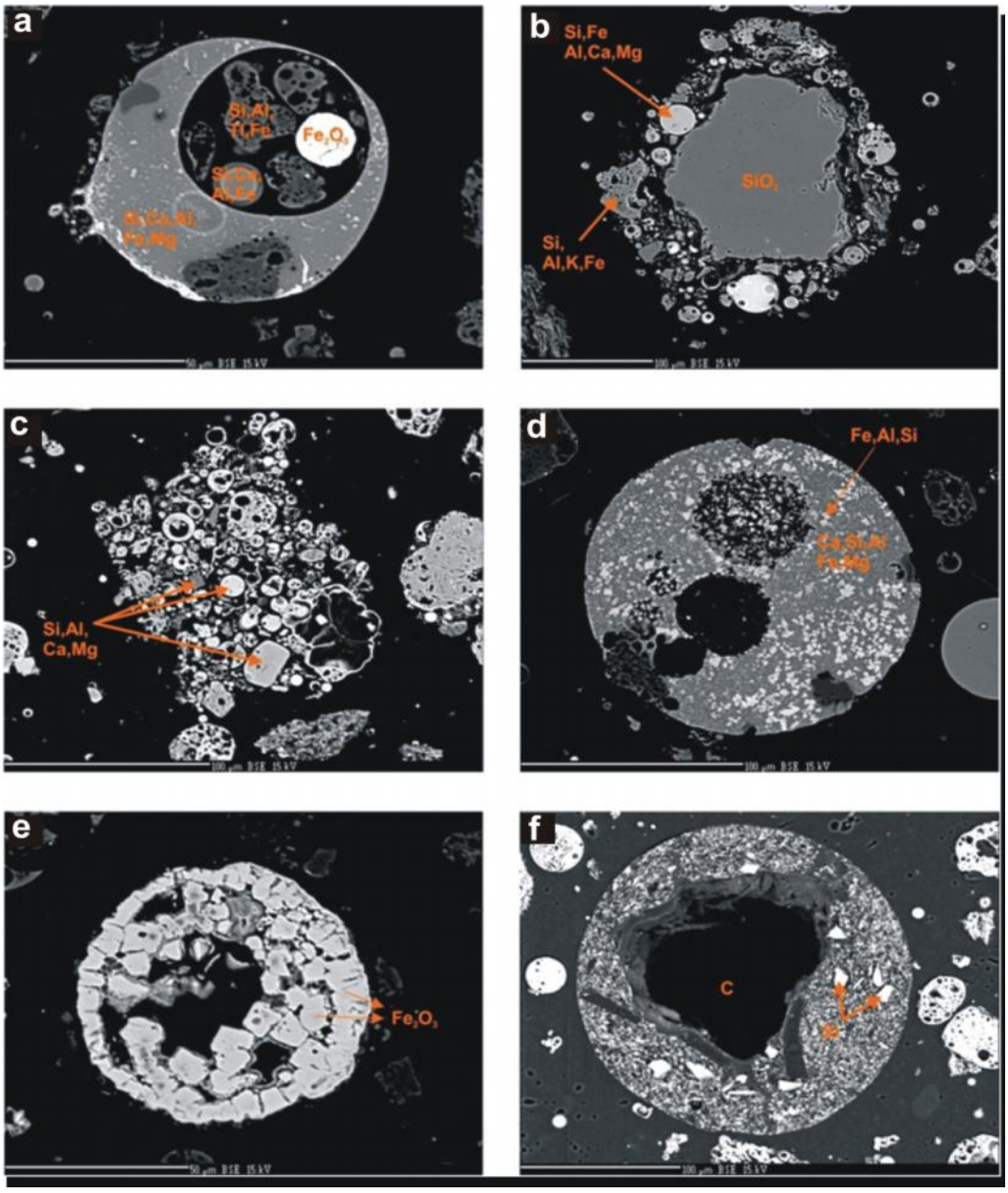
Prítomnosť a zastúpenie minerálnych fáz identifikovaných XRD analýzou boli potvrdené aj mikroskopiou a následnou elektrónovou analýzou. Keďže najhojnejšie zastúpenou zložkou v elektrárenských popoloch sú amorfné aluminosilikátové sklá (obr. 8a,b,c,d), detailnejšie bola študovaná variabilita ich chemického zloženia.

Pomerné zastúpenie Fe_2O_3, Al_2O_3, SiO_2 a CaO v meraných oxidoch Fe a aluminosilikátoch je znázornené na obr. 9. Okrem niekoľkých analýz prislúchajúcich kremeňu, kristobalitu, hematitu a magnetitu (obr. 8e) je z grafu (obr. 9) zrejmá výrazná variabilita v zložení prítomných amorfných skiel.

Obsah SiO_2 v týchto fázach je v rozmedzí od 10,97 hm. % do 94,69 hm. %, Al_2O_3 od 1,61 hm. % do 38,67 hm. %, Fe_2O_3 od 0,31 hm. % do 59,66 hm. % a CaO do 37,63 hm. % (tab. 11). Častou

zložkou aluminosilikátových skiel sú tiež MgO, Na_2O, K_2O a TiO_2. Zo skupiny potenciálne toxických prvkov vstupuje do týchto skiel i As_2O_3 (do 2,28 hm. %).

Aluminosilikátové sklá vznikajú v popole – podobne ako mullit, či kristobalit, transformáciou ílových minerálov a živcov počas spaľovania pri teplote v rozmedzí 900 – 1300 °C (Vassilev a Vassileva, 1996). Podľa práce Medina et al. (2010) sú amorfné sklá z chemického hľadiska tvorené hlavne oxidmi Si, Al, Fe a Ca. Amorfné aluminosilikáty a oxyhydroxidy Fe patria k sekundárnym fázam s najväčším potenciálom limitovať mobilitu stopových prvkov v popoloch po spaľovaní uhlia (EPRI, 2006).

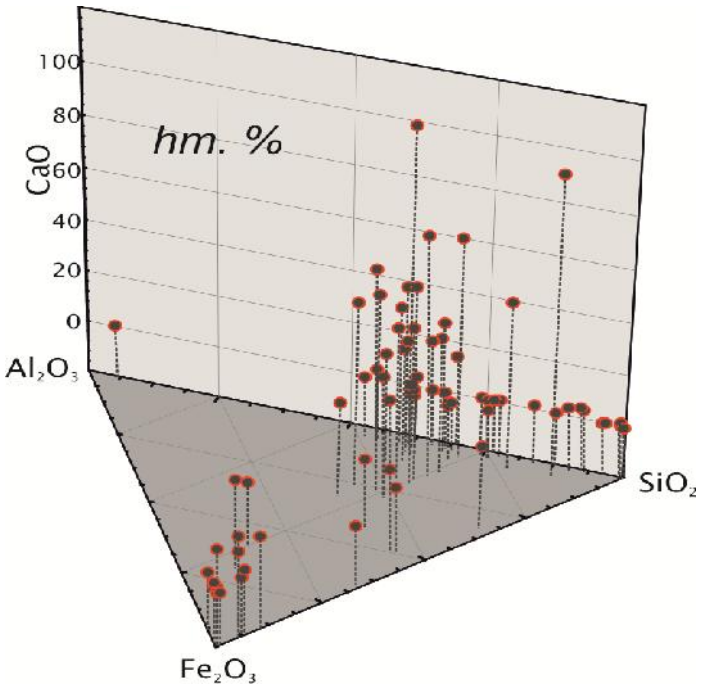


Obr. 8 Snímky v spätne rozptýlených elektrónoch (BSE): a, b, c, d – aluminosilikátové sklá, poradie prvkov zodpovedá ich pomernému zastúpeniu v jednotlivých zrnách, e – magnetit, f – nespálený zvyšok uhlia obalený jemnozrnnou zmesou silikátov (Peťková et al., 2011)

Tab. 11 Reprezentatívne elektrónové mikroanalýzy aluminosilikátových skiel z popolových vzoriek (*n* = 37, hodnoty v hm. %)

	Na_2O	SiO_2	Al_2O_3	MgO	P_2O_5	K_2O	CaO	TiO_2	Fe_2O_3	MnO	As_2O_3	∑
priemer	0,73	48,64	18,87	2,73	0,15	1,28	10,85	0,99	9,50	0,21	0,20	94,42
medián	0,31	46,09	18,83	2,09	0,12	0,79	7,30	0,48	6,32	0,07	0,10	97,60
min.	0,03	10,97	1,61	0,00	0,00	0,05	0,16	0,00	0,31	0,00	0,00	74,41
max.	6,67	94,69	38,67	10,34	0,74	6,83	37,63	9,12	59,66	2,05	2,28	100,8
25%-til	0,16	34,26	13,61	0,89	0,05	0,31	1,30	0,21	1,95	0,01	0,05	92,74
75%-til	0,55	59,68	25,94	4,10	0,19	1,63	19,31	0,91	11,45	0,21	0,13	99,37

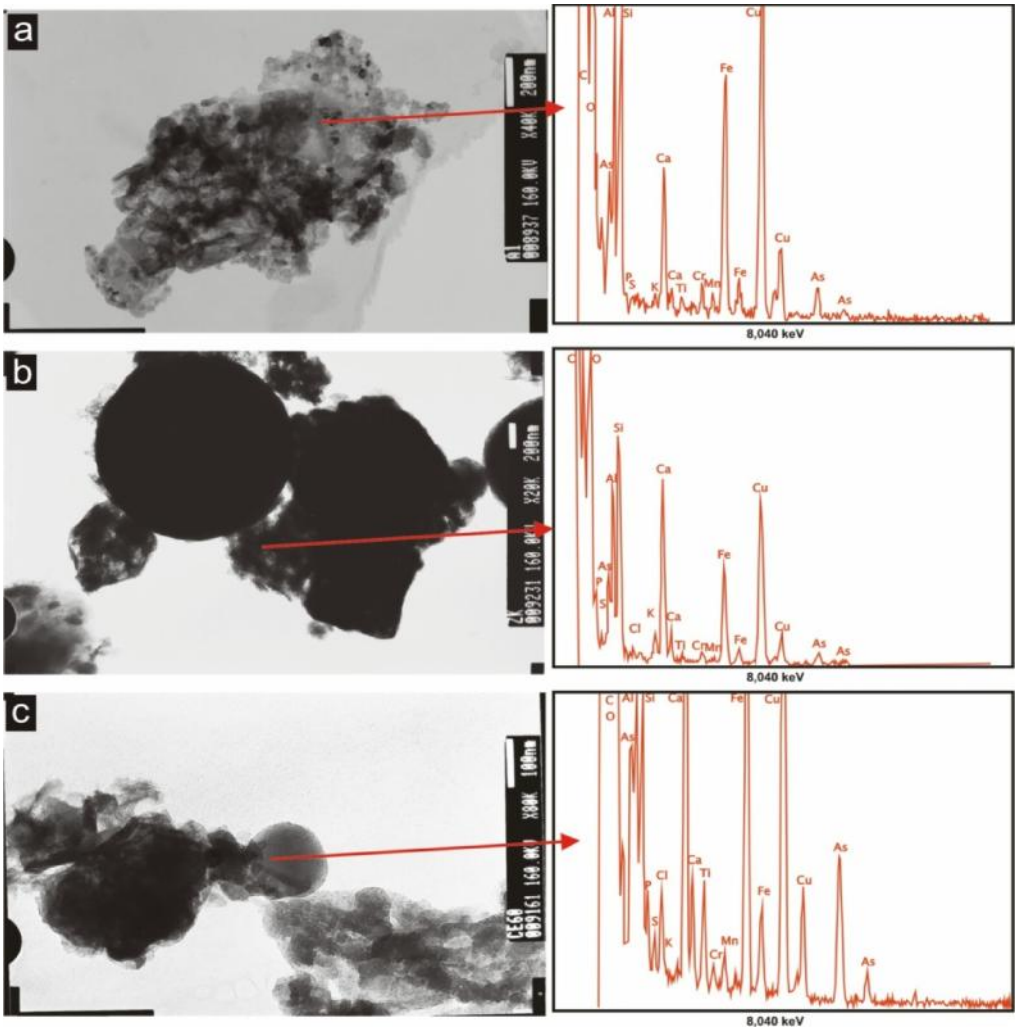
Okrem amorfných skiel, ktoré sú identifikované ako hlavná fáza nesúca As v zrnách merateľných elektrónovou mikrosondou, sa tento prvok viaže tiež na nespálené zvyšky uhlia (do 0,5 hm. %) (obr. 8f). Prioritnú väzbu As na aluminosilikátové sklá a nespálené zvyšky uhlia potvrdili tiež autori Bolanz et al. (2012) v detailnej štúdii zameranej na geochémiu, špeciáciu a distribúciu arzénu v čerstvých popolových vzorkách z Pôvodného odkaliska. Čerstvý popol obsahoval 1000 – 1400 $mg.kg^{-1}$ As a pozostával hlavne z vezikulárnych a kompaktných skiel, ktoré tvorili 86,29 % z popola a obsahovali v priemere 0,13 hm. % As_2O_5. Sféroidné sklá tvorili 2,53 % popola s obsahom 1,35 hm. % As_2O_5 a nespálené častice uhlia tvorili 7,76 % s 0,10 hm. % As_2O_5 s kalcitovými žilami (0,27 %) s 1,60 hm. % As_2O_5. Kremeň, plagioklas a slabokryštalický mullit tvorili 3,15 % popola s 0,01 hm. % As_2O_5.



Obr. 9 Chemické zloženie popolových častíc (vynesené hodnoty sú bodové mikrosondové analýzy)

3.5.3 Pevné fázy obohatené o arzén

Na štúdium fáz obohatených o As vo frakcii pod 25 μm bola použitá transmisná elektrónová mikroskopia s EDS. Po detailnom preskúmaní popolových vzoriek bolo zistené, že As sa viaže dominantne na častice tvorené prvkami Al, Si, Ca a Fe (obr. 10a, c), v menšej miere na častice tvorené Fe a Ca. Tieto nanočastice vytvárajú agregáty nepravidelného tvaru s rozmermi od 300 nm do niekoľko μm. V časticiach s pravidelným (napr. guľovitým) tvarom (obr. 10b) nebola nameraná prítomnosť As. Na základe elektrónovej difrakcie je možné povedať, že časť týchto častíc je kryštalická, nie je však jasné, či ide o proces sorpcie As na povrch častíc, alebo je As viazaný priamo v štruktúre týchto fáz (Peťková et al., 2011).



Obr. 10 Snímky (TEM) agregátov nanočastíc obsahujúcich As a zodpovedajúce EDS analýzy

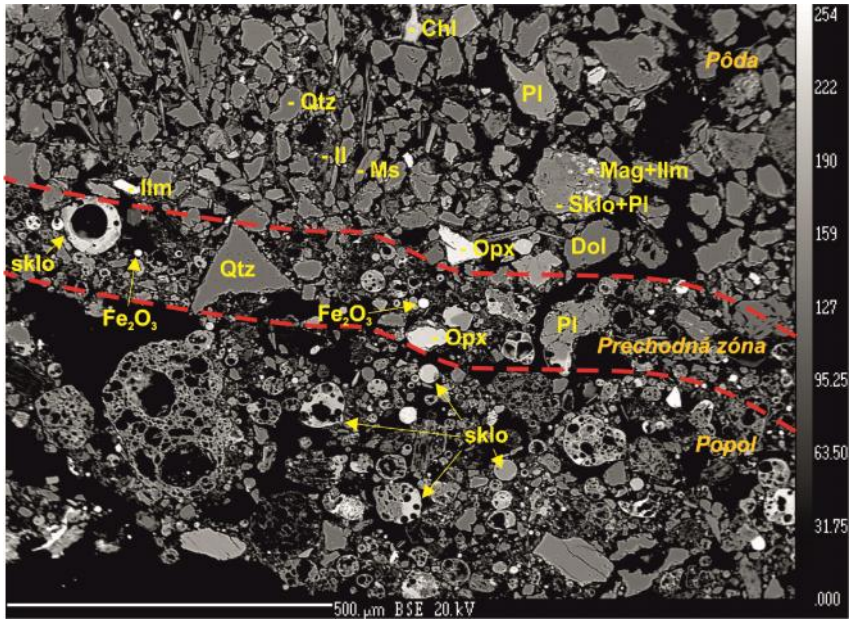
Veselská et al. (2013) vo svojej štúdii taktiež uvádzajú aluminosilikátové sklá obohatené o Ca a Fe za dominantné primárne hostiteľské fázy arzénu, pretože sú najhojnejšie zastúpenou skupinou v popolovom materiáli. Dutinkovité, nepravidelné a guľovité častice s dominantným obsahom SiO_2 (86 obj. %) prevažujú nad časticami, ktoré obsahujú hlavne CaO a FeO_x. Výsledky

kyslej extrakcie so šťaveľanom amónnym naznačujú, že oxohydroxidy Si, Al a Fe (napr. alofán a imogolit) môžu predstavovať sekundárne hostiteľské fázy nestabilných foriem As. Z pochovaných popolov bolo uvoľnených v priemere až 77,87 % arzénu a štatisticky významné kladné korelácie boli zistené medzi uvoľneným As – Si ($r = 0,94$, $p < 0,0001$), As – Al ($r = 0,88$, $p < 0,0001$) a As – Fe ($r = 0,58$, $p < 0,0001$) (Veselská et al., 2013). V práci Bolanz et al. (2012) má arzén vysokú afinitu k sklám tvorených materiálom obohateným o Ca. Podľa autorov dochádza počas spaľovania uhlia k začleneniu As do skiel obohatených o Ca. Na odkalisku sa vytvárajú arzeničnany Ca a sú pomaly nahradené kalcitom so sprievodným uvoľnením As.

Hiller et al. (2009) sa taktiež zaoberali štúdiom fáz s vysokým obsahom As v materiáli popolového odkaliska. V odkaliskových sedimentoch pozorovali dominanciu sklovitých materiálov, organickej hmoty a mullitu. Výrazná korelácia medzi Fe a As naznačuje, že podstatná časť As je viazaná na oxidy Fe. Autori detekovali aj oblasti (hotspoty) s vysokou koncentráciou As, ale s neúmerne nízkym obsahom Fe. Aj keď výskyt takýchto miest bol pomerne vzácny, môžu viazať väčšinu As v odkaliskovom materiáli. Pôvod týchto hotspotov zostáva zatiaľ neznámy.

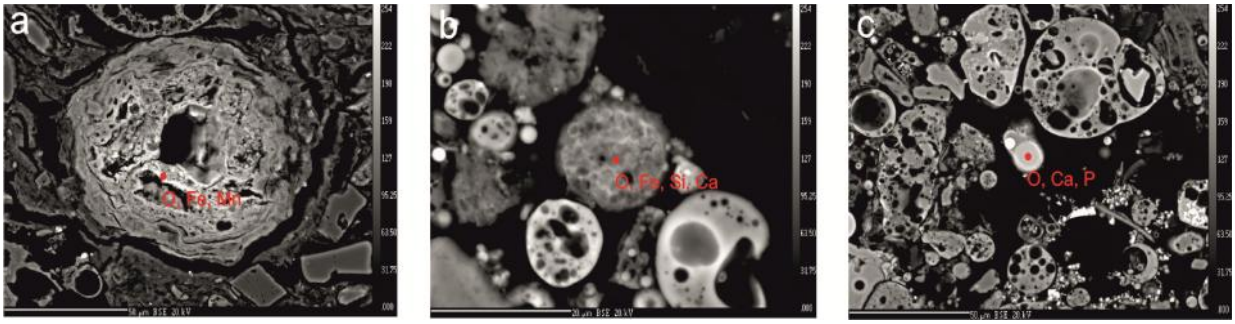
3.6 Mineralógia pochovaných popolov v neporušených vzorkách

V skúmaných vzorkách sa mikroskopickým pozorovaním identifikovali 3 zóny: pôdny substrát, popolové zhluky a prechodná zóna na rozhraní pôdy a popola, ktorá je medzi popolovou vrstvou a pôdou väčšinou tenká (obr. 11) a v niektorých prípadoch nebola prítomná. Pôdny substrát je tvorený pôdnym skeletom a matrixom. Pôdny skelet je zložený z kremeňa, K-živcov, plagioklasu, albitu, apatitu, kalcitu, sľúd (muskovit), dolomitu a ortopyroxénu (obr. 11). Matrix pozostáva z organickej hmoty, ílových minerálov (illit, chlorit) a oxidov Fe (ilmenit, magnetit).

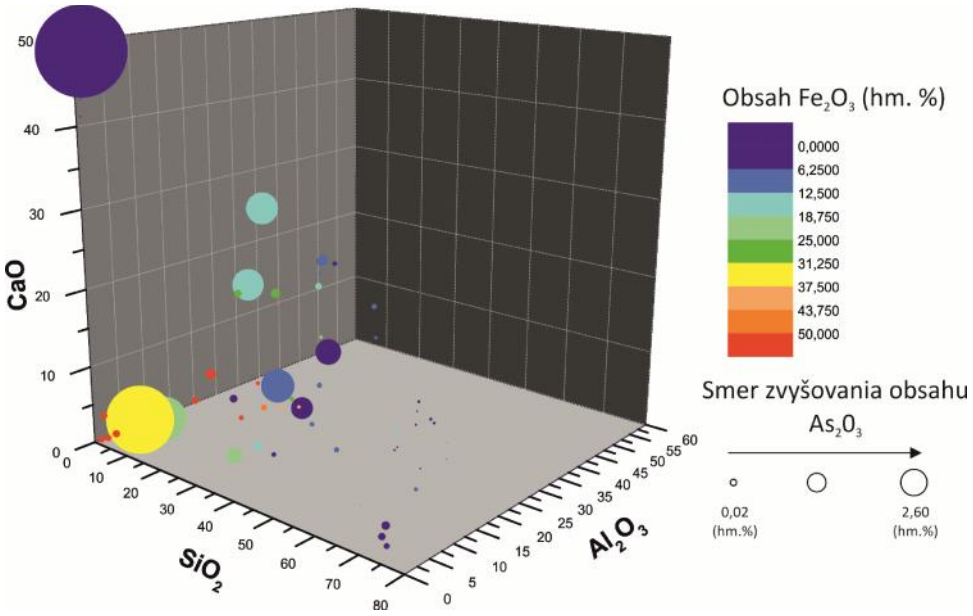


Obr. 11 Snímka výbrusu neporušenej pôdno-popolovej vzorky v spätne rozptýlených elektrónoch (BSE) s prechodnou zónou medzi pôdou a popolom (použité skratky: Chl- chlorit, Dol- dolomit, Il- illit, Ilm- ilmenit, Mag- magnetit, Ms- muskovit, Opx- ortopyroxén, Pl- plagioklas, Qtz- kremeň)

Popolová vrstva pozostáva hlavne z amorfných Al-Si skiel a oxidov Fe, v ktorých sa vyskytuje zatavený plagioklas, magnetit a ilmenit. Oxidy Fe boli pozorované vo forme guľovitých zŕn. Prítomné boli aj zvyšky nespáleného uhlia. Prechodná zóna obsahuje zmiešaný materiál z pôdneho substrátu a popolového materiálu. Elektrónovou mikroanalýzou bolo pozorované chemické zloženie pôdneho substrátu, popolového materiálu aj prechodnej zóny. Na základe orientačnej EDS analýzy sa zistilo, že v samotnom pôdnom substráte arzén nie je prítomný či už vo forme sekundárnych minerálov alebo na povrchu minerálnych fáz a zložiek pôdneho substrátu. Analýzy potvrdili prednostnú väzbu arzénu na fázy tvorené hlavne Si, Al, Ca a Fe, v ktorých sa obsah As_2O_3 pohyboval do 2,6 hm. %. Príklad zŕn s najvyšším obsahom As znázorňuje obr. 12. Vynesené hodnoty Fe_2O_3, Al_2O_3, SiO_2, CaO a As_2O_3 v meraných aluminosilikátových sklách a oxidoch Fe vyjadruje obr. 13.



Obr. 12 Snímky zŕn v spätne rozptýlených elektrónoch (BSE) v popolovom materiáli s najvyšším obsahom As, poradie prvkov zodpovedá ich pomernému zastúpeniu v jednotlivých zrnách, a) 1,44 hm. % As, b) 2,32 hm. % As, c) 1,97 hm. % As



Obr. 13 Distribúcia arzénu v časticiach Al-Si skiel a oxidov Fe v popolovom materiály na základe mikrosondových analýz. Farebná škála vyjadruje obsah Fe_2O_3 a veľkosť kruhov je škálou pre obsah As_2O_3

Obsah SiO_2 v týchto fázach je v rozmedzí od 0,07 hm. % do 80,17 hm. %, Al_2O_3 od 0,02 hm. % do 35,82 hm. %, Fe_2O_3 od 0,12 hm. % do 97,55 hm. % a CaO od 0,32 hm. % do 48,90 hm. % (tab. 12). V niekoľkých prípadoch bol vysoký obsah As zistený v zrnách tvorených hlavne MnO a Fe_2O_3 (obr. 12a).

Tab. 12 Reprezentatívne elektrónové mikroanalýzy aluminosilikátových skiel a oxidov Fe v popolovom materiáli (*n* = 63, hm. %)

	Na_2O	SiO_2	Al_2O_3	MgO	P_2O_5	K_2O	CaO	TiO_2	Fe_2O_3	MnO	As_2O_3	∑
priemer	0,34	36,94	14,96	2,30	2,86	1,14	10,86	1,44	19,30	1,08	0,27	91,92
medián	0,25	39,02	13,78	1,88	0,12	0,47	5,38	0,47	8,51	0,10	0,13	98,50
minimum	0,00	0,07	0,02	0,01	0,00	0,00	0,32	00,0	0,12	0,00	0,00	47,97
maximum	1,69	80,17	35,82	10,27	38,65	11,83	48,90	14,12	97,55	28,39	2,60	109,9
25%-til	0,06	26,72	9,29	0,93	0,08	0,16	1,60	0,27	3,76	0,05	0,08	79,99
75%-til	0,48	49,59	21,02	3,13	0,29	1,42	17,60	0,97	24,50	0,35	0,24	101,3

Chemické zloženie tmelu a ílových minerálov (pôdneho matrixu) v prechodnej zóne uvádza tab. 13. Hoci štúdium tmelového materiálu potvrdilo prítomnosť arzénu, jeho obsahy boli pomerne nízke a pohybovali sa do 0,43 hm. % As_2O_3.

Tab. 13 Reprezentatívne elektrónové mikroanalýzy tmelu a ílových minerálov v prechodnej zóne (*n* = 8, hm. %)

	Na_2O	SiO_2	Al_2O_3	MgO	P_2O_5	K_2O	CaO	TiO_2	Fe_2O_3	MnO	As_2O_3	∑
priemer	0,16	41,86	15,29	1,84	4,99	1,51	7,69	0,48	15,35	0,16	0,22	89,77
medián	0,15	47,11	18,37	1,96	0,59	1,76	1,49	0,51	6,42	0,06	0,20	91,39
minimum	0,06	3,34	1,21	0,79	0,05	0,07	0,89	0,06	1,87	0,0	0,06	79,70
maximum	0,30	59,58	22,33	2,99	36,76	2,50	48,64	0,74	45,65	0,52	0,43	96,11
25%-til	0,07	34,34	9,77	0,98	0,08	0,78	1,46	0,38	3,63	0,02	0,08	84,61
75%-til	0,26	53,62	20,83	2,45	0,88	2,26	3,71	0,63	30,68	0,32	0,38	93,88

Výsledky mineralogického štúdia neporušených vzoriek nepotvrdili migráciu As z hľadiska väzby na minerály v pôdnom substráte. Aj napriek vplyvu vonkajších podmienok prostredia (zrážky) zostáva As súčasťou hlavne popolového materiálu. Uvoľnený As je prítomný v tenkej prechodnej zmiešanej vrstve medzi pôdou a popolom, kde bol identifikovaný v tmeli, ktorý tvoria ílové minerály a oxidy Fe. Výsledky korelujú s prácou Bolanz et al. (2012), kde autori uvádzajú, že v pochovaných popoloch v týchto pôdach je časť As zadržaná na už existujúcich alebo novovytvorených oxidoch Fe a íloch. Hoci sú koncentrácie As v hmote tvorenej slabo kryštalickými ílmi a oxidmi Fe pomerne nízke (0,05 hm. % As_2O_5), hmota (matrix) je všadeprítomná a jej podiel je pomerne vysoký.

4. DIVERZITA BAKTÉRIÍ V POCHOVANÝCH ELEKTRÁRENSKÝCH POPOLOCH NA LOKALITE ZEMIANSKE KOSTOĽANY

Prežitie mikroorganizmov v znečistených pôdach závisí od vnútorných biochemických a štruktúrnych vlastností, fyziologickej alebo genetickej adaptácii, vrátane morfologických zmien buniek, ako aj od zmeny špeciácie kovov (Ehrlich, 1997; Piotrowska-Seget et al., 2005). Pri vysokých obsahoch bioprístupných foriem ťažkých kovov dochádza k vymiznutiu druhov citlivých na ťažké kovy, čo je pravdepodobne zodpovedné za pokles mikrobiálnej aktivity, a konkurenčné zvýhodnenie druhov tolerantnejších k ťažkým kovom vedie k zmene zloženia spoločenstva a k zvýšeniu tolerancie spoločenstva ku kovom. Rýchlosť vývoja tolerancie závisí od kovu spôsobujúceho selekčný tlak a taktiež či je kov pridaný do pôdy v malých dávkach postupne alebo jednorázovo veľkou dávkou a či ide o kombináciu kovov (Díaz-Raviña a Bååth, 1996). Díaz-Raviña a Bååth (1996) pozorovali dva rôzne účinky na bakteriálnu aktivitu pridaním Zn do pôdy: počiatočný inhibičný účinok pravdepodobne spôsobený smrťou baktérií citlivých na Zn v dôsledku toxicity kovu a stimulačný účinok na rýchlosť rastu prežitých, tolerantnejších baktérií v dôsledku zvýšenej dostupnosti substrátu, ktorý pochádzal z mŕtvych buniek. Názory na negatívne účinky ťažkých kovov na diverzitu mikroorganizmov v pôdach kontaminovaných ťažkými kovmi sa líšia. Niektorí autori poukazujú na nepriaznivý vplyv kovov na rast, morfológiu a biochemické aktivity mikroorganizmov, čo vedie k zníženiu biomasy a diverzity (Kandeler et al., 1996; Roane a Kelloqq, 1996; Wenderoth a Reber, 1999; Sandaa et al., 1999; Müller et al., 2001; Moffett et al., 2006; Wang et al., 2007; Thavamani et al., 2012), iné štúdie uvádzajú nielen vysokú diverzitu mikroorganizmov (Filali et al., 2000; Konstantinidis et al., 2003), ale že okrem adaptácie pôvodných organizmov novým podmienkam prostredia, pod nimi aj „prekvitali“ (Haq a Shakoori, 2000; Roane a Pepper, 2000). Niektoré práce nezistili dostatočne významné zmeny v mikrobiologickej charakteristike kontaminovaných pôd (Pennanen et al., 1998). V každom prípade, väčšina prác potvrdzuje zmenu štruktúry mikrobiálneho spoločenstva v prítomnosti ťažkých kovov a iných kontaminantov (Kozdrój a van Elsas, 2001; Ellis et al., 2003; Turpeinen et al., 2004; Frey et al., 2006; Valverde et al., 2011).

Diverzita baktérií v predmetných antropogénnych sedimentoch sa realizovala na šiestich reprezentatívnych vzorkách z lokality Zemianske Kostoľany. Základné fyzikálno-chemické charakteristiky pôdno-popolových vzoriek sú uvedené v tab. 14 a 15. Podľa zrnitostného zloženia patria vzorky k piesočnato-hlinitému, hlinitému a prachovito-hlinitému druhu pôdy. Väčšina vzoriek mala podľa hodnotenia Čurlíka a Šurinu (1998) stredný obsah organického uhlíka (TOC), okrem vzorky č. 2, ktorá mala vysoký obsah TOC (1,8 hm. %) a vzorky č. 1 s veľmi vysokým obsahom TOC (3,54 hm. %). Vzorky boli neutrálneho až slabo alkalického charakteru.

Tab. 14 Fyzikálno-chemické charakteristiky reprezentatívnych vzoriek určených pre mikrobiologické štúdium a biolúhovacie experimenty

	vz. 1	**vz. 2**	**vz. 3**	**vz. 4**	**vz. 5**	**vz. 6**
Hĺbka odberu (cm)	0-15	0-15	0-15	0-15	15-30	0-15
Charakter vzorky	pôda	pôda	pôda+popol	pôda	popol	pôda+popol
pH (H_2O)	6,90	7,16	7,23	7,19	7,51	7,67
pH (KCl)	6,65	6,56	6,86	7,15	6,99	7,14
EC (H_2O) µS.cm^{-1}	493,5	458,0	541,0	796,0	446,0	386,0
EC (KCl) mS.cm^{-1}	54,5	69,4	75,3	72,0	73,7	77,7
TC (%)*	4,85	2,55	2,28	1,80	2,45	2,67
TOC (%)**	3,54	1,80	1,30	1,41	1,38	1,42
TIC (%)***	1,31	0,75	0,98	0,39	1,07	1,25
CO_2 (%)****	4,80	2,75	3,59	1,43	3,92	4,58
$CaCO_3$(%)*****	10,91	6,25	8,17	3,25	8,92	10,41
2 - 0,05 mm (%)	62,68	32,08	43,80	36,36	39,96	51,28
0,05 - 0,002 mm (%)	31,66	45,70	44,27	50,52	50,73	42,94
< 0,002 mm (%)	5,66	22,22	11,93	13,12	9,31	5,78
Pôdny druh	*sp*[a]	*sh*[b]	*sh*[b]	*ssh*[c]	*ssh*[c]	*sp*[a]

*TC – celkový obsah uhlíka
**TOC – obsah organického uhlíka
***TIC – obsah anorganického uhlíka
****CO_2 – obsah karbonátového uhlíka
*****$CaCO_3$ – % $CaCO_3$ podľa obsahu karb. uhlíka

[a]*sp* – piesočnato-hlinitá
[b]*sh* – hlinitá
[c]*ssh* – prachovito-hlinitá

Tab. 15 Komplexná chemická analýza reprezentatívnych vzoriek určených pre mikrobiologické štúdium a pilotné biolúhovacie experimenty na základe ICP-ES/ICP-MS (zvýraznené hodnoty znamenajú prekročenie limitnej koncentrácie daného prvku podľa Zákona 220/2004 Z. z. pre poľnohospodársku pôdu)

			vz. 1	**vz. 2**	**vz. 3**	**vz. 4**	**vz. 5**	**vz. 6**
Hĺbka odberu (cm)			0-15	0-15	0-15	0-15	15-30	0-15
	Prvok	det. limit						
%	Fe	0,01	2,79	2,19	2,18	2,47	3,23	2,15
	Al	0,01	2,09	2,01	1,72	2,19	2,69	1,72
	Ca	0,01	2,97	0,85	1,88	1,18	2,22	2,34
	Na	0,01	0,05	0,02	0,03	0,03	0,06	0,04
	K	0,01	0,23	0,23	0,19	0,26	0,29	0,20
	Mg	0,01	0,46	0,40	0,69	0,50	0,61	0,62
	S	0,05	0,06	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	Ti	0,001	0,06	0,04	0,06	0,05	0,09	0,06
	P	0,001	0,42	0,11	0,11	0,09	0,08	0,07
mg.kg^{-1}	**As**	5	**264**	**93**	**193**	**230**	**634**	**377**
	Cu	0,5	38,20	16,50	17,70	19,30	26,80	18,70
	Pb	0,5	9,00	16,30	15,40	16,70	13,00	13,70
	Zn	5	**182**	75	70	63	47	45
	Ni	0,5	21,70	20,60	20,40	23,00	25,60	18,10
	Co	0,5	8,10	9,60	9,60	10,10	11,20	9,10

*Pokračovanie **tab. 15***

			vz. 1	**vz. 2**	**vz. 3**	**vz. 4**	**vz. 5**	**vz. 6**
Hĺbka odberu (cm)			0-15	0-15	0-15	0-15	15-30	0-15
	Prvok	det. limit						
mg.kg^{-1}	Mn	5	470	568	614	635	633	526
	Mo	0,5	3,10	0,70	1,10	1,20	3,10	1,20
	U	0,5	2,30	0,80	1,20	1,30	2,80	1,70
	Hg	0,05	0,31	0,29	0,31	0,40	0,47	**1,67**
	Cr	0,5	21,60	23,40	20,40	26,50	25,80	20,90
	Ba	5	199	146	162	189	296	273
	Sb	0,5	<0,5	0,60	0,80	0,70	0,80	0,70
	Cd	0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
	Th	0,5	2,20	4,30	4,30	4,90	5,70	5,00
	Sr	5	96,00	32,00	51,00	50,00	114,00	77,00
	Bi	0,5	0,60	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
	V	10	51	40	41	46	66	45
	La	0,5	14,20	19,90	19,20	22,10	20,40	17,40
	W	0,5	1,50	<0,5	0,60	0,70	1,60	0,90
	Sc	0,5	4,60	5,40	5,40	5,90	7,50	5,20
	Tl	0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
	Ga	5	5,00	6,00	5,00	7,00	8,00	5,00
	Se	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	Ag	0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

Vo všetkých reprezentatívnych vzorkách bola mnohonásobne prekročená limitná koncentrácia arzénu (25 mg.kg^{-1}) podľa Zákona 220/2004 Z.z. o ochrane a využívaní poľnohospodárskych pôd (tab. 16). Najvyšší obsah As (634 mg.kg^{-1}) bol analyzovaný v hĺbke 15 – 30 cm, ktorá predstavuje už vrstvu s pochovaným popolom. Vysoký obsah As (377 mg.kg^{-1}) bol zistený taktiež vo vrchnom horizonte (0 – 15 cm) poľnohospodársky využívanej pôdy, na ktorej sa pestuje jačmeň siaty (*Hordeum vulgare*) a repka olejná (*Brassica napus*).

Tab. 16 Limitné koncentrácie pre arzén v pôdach (mg.kg^{-1}) v niektorých štátoch

Slovensko				Holandsko	Kanada
Zákon č. 220/2004 Z. z.	Rozhodnutie č. 531/1994-540			GVSRS[e]	CSQG[f]
	A[b]	B[c]	C[d]		
25[a]	29	30	50	29	12

[a] *limitná koncentrácia* pre piesočnato-hlinitú a hlinitú zrnitostnú skupinu

[b] *referenčná hodnota* – pôda nie je kontaminovaná, ak je koncentrácia prvku pod touto hodnotou, ak dosahuje, resp. prekračuje túto hodnotu, obsah prvku je vyšší ako sú fónové (pozaďové) hodnoty pre danú oblasť, prípadne vyššie ako hodnoty medze citlivosti analytického stanovenia

[c] *indikačná hodnota* – kontaminácia pôd bola analyticky preukázaná

[d] *indikačná hodnota pre asanáciu* – ak koncentrácia prvku dosiahne túto hodnotu, je nevyhnutné okamžite vykonať definitívne analytické zmapovanie rozsahu poškodenia príslušného miesta a rozhodnúť o spôsobe nápravného opatrenia

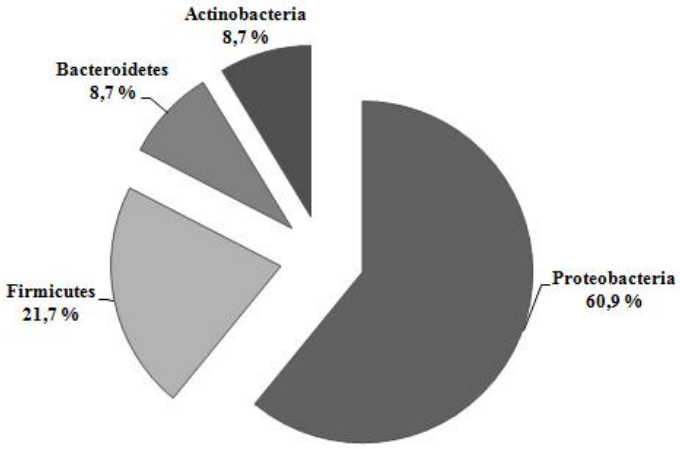
[e] *Guidelines values* for Soil remediation strategies, Department of Housing and Environment, Netherlands

[f] Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health

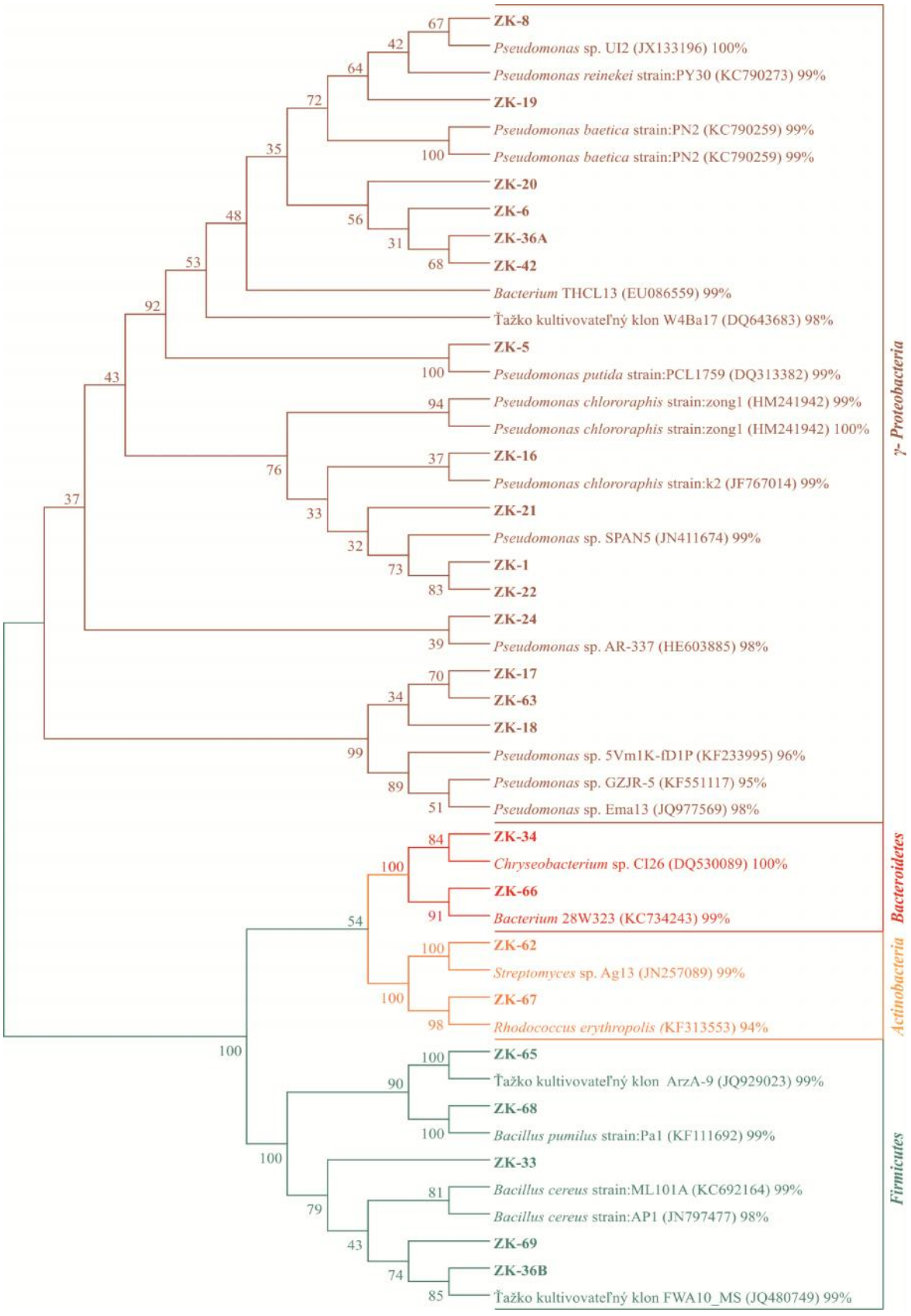
Adriano (2001) uvádza, že priemerné obsahy arzénu v nekontaminovaných pôdach sú pod 10 $mg.kg^{-1}$. Podľa štúdie Tamaki a Frankenberger (1992) je priemerná koncentrácia As v pôdach 6 $mg.kg^{-1}$ a zvyčajne v rozsahu od 0,1 do 40 $mg.kg^{-1}$. Z ďalších potenciálne toxických stopových prvkov presahovala limitnú koncentráciu v študovanej oblasti aj ortuť (Hg_{limit} 0,50 $mg.kg^{-1}$) a zinok (Zn_{limit} 150 $mg.kg^{-1}$) (tab. 15).

Z reprezentatívnych vzoriek antropogénnych sedimentov sa izolovalo spolu 63 morfologicky odlišných bakteriálnych kmeňov so širokou farebnou škálou (biela, biela vláknitá, biela tvrdá, biela mazľavá, žltá, ružová, oranžová, béžová, mazľavá, lososová, mäsová). Najviac izolátov sa získalo použitím živného média PSA (Pseudomonas agar, HiMedia Laboratories, Mumbai, India), ktoré je určené pre izolovanie baktérií rodu *Pseudomonas*, a naznačilo tak prítomnosť dominantného rodu, čo bolo neskôr potvrdené PCR analýzou.

Použitím ARDRA analýzy, pomocou ktorej sa izoláty roztriedili na základe vzájomnej podobnosti, sa 23 vybraných PCR produktov identifikovalo 16S rRNA analýzou (obr. 15, tab. 17). Izolované druhy zastupovali 4 hlavné taxonomické skupiny (obr. 14): *Proteobacteria* (60,9 %), *Firmicutes* (21,7 %), *Bacteroidetes* (8,7 %) a *Actinobacteria* (8,7 %). Kmeň *Proteobacteria* bol zastúpený len jednou triedou – *Gammaproteobacteria*. Prevládajúca prítomnosť rodu *Pseudomonas* v skúmaných pôdno-popolových substrátoch je pravdepodobne daná dôsledkom jednoduchých požiadaviek na živiny, množstvom zlúčenín uhlíka, ktoré využíva, jeho genetickou a metabolickou prispôsobivosťou a taktiež širokou škálou stanovíšť, ktoré je schopný kolonizovať (Moore et al., 2006; Chapon et al., 2012). Viaceré práce uvádzajú, že gram-negatívne baktérie v kontaminovaných pôdach prevládajú nad gram-pozitívnymi organizmami, pretože sú viac tolerantné ku kovom (Duxbury a Bicknell, 1983; Turpeinen et al., 2004; Margesin et al., 2011) kvôli väčším energetickým požiadavkam než gram-pozitívne baktérie (Abaye et al., 2005). Rovnaké zistenia vyplývajú aj z výsledkov predkladanej práce. Izolovaných gram-negatívnych druhov bolo 17 a gram-pozitívnych len 7.



Obr. 14 Relatívna početnosť bakteriálnych kmeňov vo vzorkách pôdno-popolových substrátov identifikovaných na základe PCR analýzy



Obr. 15 Fylogenetický strom baktérií izolovaných z antropogénnych sedimentov lokality Zemianske Kostoľany na základe porovnania 16S rRNA a ich percentuálna podobnosť s druhmi uloženými v databáze GenBank (www.http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

Dominantné postavenie rodu *Pseudomonas* v silne znečistených prostrediach (napr. pôdy kontaminované PAU, ťažkými kovmi z ťažby rúd, z čistiarenských kalov) je možné nájsť v prácach Abaye et al. (2005), Máthé et al. (2012), Shi et al. (2013) a mnohých ďalších. Dominancia rodu *Pseudomonas* ako aj gram-negatívnych druhov v skúmaných vzorkách koreluje s výsledkami práce Abaye et al. (2005), ktorí sledovali zmeny v mikrobiálnom spoločenstve ornej pôdy zapríčinené dlhodobou kontamináciou kovmi z čistiarenských kalov. Účinky relatívne nízkych koncentrácií ťažkých kovov (podobné obsahy Cu, Zn a Ni ako v prípade vzoriek zo Zemianskych Kostolian) spôsobili zníženie počtu gram-pozitívnych baktérií. Takmer 40 rokov po kontaminácii gram-negatívne baktérie dominovali bakteriálnemu spoločenstvu v pôdach kontaminovaných ťažkými kovmi.

Druhým najpočetnejším kmeňom v kontaminovaných pôdach v Zemianskych Kostoľanoch bol kmeň *Firmicutes* zastúpený druhmi rodu *Bacillus*, ktorý je bežnou súčasťou pôdy a jeho kľúčová úloha spočíva v produkcii extracelulárnych hydrolytických enzýmov, ako sú celulázy a xylanázy, ktorými dochádza k degradácii organickej hmoty. Taktiež je schopný vytvárať spóry, ktoré poskytujú značnú ochranu pred nepriaznivými podmienkami prostredia (Chapon et al., 2012). Rezistenciu druhu *Bacillus cereus* voči Zn a Cr v kontaminovaných pôdach uvádza Piotrowska-Seget et al. (2005) a Camargo et al. (2005). Mnohé práce uvádzajú práve kmeň *Firmicutes* ako dominantný kmeň v kontaminovaných pôdach. Zaujímavé výsledky priniesla štúdia Valverde et al. (2011), v ktorej autori skúmali diverzitu a štruktúru spoločenstva kultivovateľných As-rezistentných baktérií v pôdach taktiež dlhodobo (viac ako 20 rokov) znečistených banskou hlušinou z bane na volfrám a cín, kde vplyvom zrážok dochádza k narastaniu obsahu arzénu vo väčších hĺbkach. Prevládajúcimi As-rezistentnými baktériami v týchto pôdach boli *Firmicutes* (60,6 %) (hlavne *Bacillus* spp.) nasledovaný *γ-Proteobacteria* (predovšetkým *Pseudomonas* spp.). *Pseudomonas* bol hlavným rodom v najmenej kontaminovanej vzorke. Práca uvádza posun smerom k prevahe gram-pozitívnych baktérií (*Firmicutes*) v súvislosti s vysokou koncentráciou arzénu v pôde. Podobné zistenia uvádzajú aj Ellis et al. (2003). Rozdiely v relatívnej abundancii rozličných taxonomických skupín v pôdach kontaminovaných ťažkými kovmi (hlavne Cu, Zn, Pb, As) korelovali s obsahom kovov vo vzorkách. Obzvlášť v prípade kmeňa *Firmicutes* (najmä *Bacillus* sp.), ktorý mal vyššiu relatívnu abundanciu v najviac kontaminovaných vzorkách, zatiaľ čo *γ-Proteobacteria* (hlavne *Pseudomonas* sp. a *Xanthomonas* sp.) mali zvýšenú relatívnu abundanciu v najmenej kontaminovaných vzorkách.

Dominantné postavenie kmeňa *Firmicutes* sa objavuje aj v rádioaktívnych pôdach Černobylu, kde bolo izolovaných viac ako 200 kultivovateľných izolátov, ktoré patrili do oddelení *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *α-*, *β-*, *γ-Proteobacteria* a *Bacteroidetes* (Chapon et al., 2012). Kmeň *Firmicutes* tvoril 65 % z kultivovateľných populácií s izolátmi patriacimi do rodov *Bacillus*,

Brevibacillus, *Cohnella*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Sporosarcina* a *Staphylococcus*. Druhým najviac zastúpeným kmeňom bol *Proteobacteria* (20 % izolátov) s rodmi *Burkholderia* a *Pseudomonas*.

Tab. 17 Diverzita baktérií v kontaminovaných pôdno-popolových vzorkách

Identifikované izoláty podľa 16S rRNA	Vzorka					
(číslo izolátu z databázy GenBank)	1	2	3	4	5	6
Actinobacteria						
KP289264 *Streptomyces* sp. ZK-30 100%	-	-	-	+	-	-
KP289278 *Rhodococcus erythropolis* ZK-24 100%	-	-	+	-	-	-
Bacteroidetes						
KP289265 *Chryseobacterium* sp. ZK-25 100%	-	-	-	+	-	-
KP289266 *Bacterium* sp. ZK-3 100%	-	-	+	-	-	-
Firmicutes						
KP289279 *Bacillus cereus* ZK-27 100%	-	+	-	-	-	-
KP289267 *Bacillus cereus* ZK-28 100%	-	-	-	+	+	-
KP289268 *Bacillus pumilus* ZK-29 100%	-	-	+	-	-	-
KP289269 Uncultured *Firmicutes bacterium clone* ZK-1 100%	-	+	-	-	-	+
KP289270 Uncultured *bacterium clone* ZK-2 100%	+	-	-	-	-	-
Proteobacteria (Gammaproteobacteria)						
KJ541679 *Pseudomonas baetica* ZK-20 100%	-	-	-	-	+	-
KJ541677 *Pseudomonas fluorescens* ZK-6 100%	-	-	+	-	-	-
KJ541675 *Pseudomonas chlororaphis* ZK-1 100%	-	-	-	+	-	-
KP289273 *Pseudomonas chlororaphis* ZK-22 100%	-	-	-	-	+	-
KP289274 *Pseudomonas koreensis* ZK-12 100%	+	-	-	+	-	-
KJ541676 *Pseudomonas putida A* ZK-5 100%	+	-	-	-	-	-
KJ541678 *Pseudomonas reinekei* ZK-19 100%	-	-	-	+	-	-
KJ671466 *Pseudomonas* sp. ZK-9 100%	+	+	+	+	+	+
KP289277 *Pseudomonas* sp. ZK-17 100%	-	-	+	-	-	-
KP289271 *Pseudomonas* sp. ZK-18 100%	-	-	+	-	-	-
KP289280 *Pseudomonas* sp. ZK-23 100%	-	+	-	+	-	+
KP289272 *Pseudomonas* sp. ZK-21 100%	-	-	-	-	+	-
KP289275 *Bacterium* ZK-26 100%	+	-	-	-	-	-
KP289276 Uncultivable soil bacterium clone ZK-36 100%	+	-	-	-	-	-

Dva izoláty reprezentovali kmeň *Bacteroidetes,* a to *Chryseobacterium* sp. a bližšie neurčený druh *Bacterium* sp.. Dvoma druhmi a zároveň aj dvoma izolátmi bol zastúpený kmeň *Actinobacteria: Rhodococcus erythropolis* a *Streptomyces* sp. Kmeň *Actinobacteria* je taktiež bežnou skupinou v pôdach. V práci Margesin et al. (2011) tvorili spolu s kmeňom *Proteobacteria* hlavnú aktívnu bakteriálnu zložku v pôdach kontaminovaných ťažkými kovmi. Rody *Rhodococcus*

a *Streptomyces* boli detekované v pôdach kontaminovaných nielen ťažkými kovmi, ale aj rádioaktívnymi prvkami (Chapon et al., 2012). *Rhodococcus* je bežný bakteriálny mikroorganizmus, ktorého výskyt bol dokázaný v rôznych typoch pôd, antropogénnych sedimentoch, kaloch, v sladkej i slanej vode (Finnerty, 1992; Warhurst a Fewson, 1994; Poelarends et al., 2000). Niektoré druhy *Rhodococcus* sú patogénne a môžu spôsobiť celú radu rôznych infekcií a ochorení rastlín, živočíchov i ľudí (Prescott, 1991; Soedarmanto et al., 1998; Morton et al., 2001; Weinstock a Brown, 2002; Fhitri et al., 2012). Biotechnologicky významnou vlastnosťou rady druhov je schopnosť degradovať alifatické a polycyklické uhľovodíky, steroidy, lignín, chlórované fenoly, nitrované aromatické zlúčeniny, niektoré pesticídy i polychlórované bifenyly (Grund et al., 1992; Warhurst a Fewson, 1994; Bell et al., 1998; Egorova et al., 2011). Príkladom biotechnologických vlastností tohto kmeňa je potvrdená schopnosť biolúhovania i bioakumulácie iónov toxických kovov, vrátane rádioaktívnych (Ivshina et al., 2002). Vďaka schopnosti degradovať tak široké spektrum látok sa kmeň využíva v bioremediačných procesoch a rastie jeho význam predovšetkým v oblastiach modernej environmentálnej a priemyselnej biotechnológie (Kurosawa et al., 2010; Song et al., 2011; Vojtková et al., 2012; Ivshina et al., 2013).

Máthé et al. (2012) uvádzajú druh *Rhodococcus erythropolis* medzi najlepšími baktériami degradujúcimi široké spektrum uhľovodíkov (BTX, PAU) a taktiež k druhom s najvyššou rezistenciou voči Pb^{2+}, Zn^{2+} a Cu^{2+}. Aeróbne aktinobaktérie rodu *Streptomyces* sú popredné v degradácii zložitých organických zlúčenín (Moore et al., 2006). Niekoľko kmeňov rodu *Bacillus* a *Pseudomonas* boli skúmané aj pre ich schopnosti zvyšovať mobilitu kovov a akumuláciu Cd rastlinou *Brassica juncea* (Salt et al., 1995).

Tri z 23 izolátov boli identifikované ako ťažko kultivovateľné druhy. Dva druhy patrili do kmeňa *Firmicutes* a jeden do kmeňa *Proteobacteria*. Trinásť zo šesťdesiattri počiatočných izolátov (20,63 %) sa nepodarilo identifikovať.

Identifikované kultivovateľné baktérie boli zastúpené bežnými rodmi v pôde. Vo všetkých skúmaných substrátoch boli prítomné kmene *Proteobacteria* a *Firmicutes* (tab. 17). Druhy kmeňa *Proteobacteria* tvorili dominantnú časť vo väčšine vzoriek. Vo vzorke č. 4p s najväčším celkovým obsahom arzénu (As_{tot} = 634 $mg.kg^{-1}$) tvoril hlavný podiel kmeň *Proteobacteria*. Aj napriek vysokému celkovému obsahu arzénu vo vzorkách č. 3 (As_{tot} = 193 $mg.kg^{-1}$) a č. 4(As_{tot} = 230 $mg.kg^{-1}$), sú vzorky oproti ostatným substrátom druhovo aj kmeňovo rozmanitejšie. Súčasť ich spoločenstva tvoria aj kmene *Actinobacteria* a *Bacteroidetes* (tab. 17).

Zaujímavým zistením je, že hoci vzorka č. 6 predstavuje substrát odobratý z poľnohospodársky využívanej pôdy s pravidelným hnojením, identifikované boli len dva druhy rodu *Pseudomonas* a jeden ťažko kultivovateľný druh rodu *Bacillus*. Naproti tomu, vzorka č. 5 z väčšej hĺbky,

popolového charakteru a s najvyšším obsahom arzénu (As_{tot} = 634,00 $mg.kg^{-1}$) obsahovala 5 druhov identifikovaných baktérií patriacich do 2 kmeňov. Pozoruhodná je vzorka č. 3, ktorú tvorí taktiež hlavne pochovaný popol. Identifikovaných bolo 7 druhov patriacich do 4 kmeňov. Porovnaním diverzity v jednotlivých substrátoch sa dá konštatovať, že skúmané vzorky pochádzajúce z nivnej terasy využívanej ako pasienok (vzorka č. 1, 3, 4 a 5) boli druhovo rozmanitejšie ako vzorka z poľnohospodárskej pôdy (vzorka č. 6).

K hlavným faktorom, ktoré ovplyvňujú mikrobiálnu diverzitu v pôde patria fyzikálno-chemické vlastnosti pôdy, zrnitosť, obsah organickej hmoty, druh pestovaných plodín, vegetácia a typ využitia pôdy (poľnohospodárska pôda, lúky, tropický les, pastviny,...) (Nusslein a Tiedje, 1999; Kozdrój a van Elsas, 2001; McCaig et al., 2001; Webster et al., 2002; Clegg et al., 2003; Drijber et al., 2000; Garbeva et al., 2004).

Jedným z možných vysvetlení nízkej diverzity vo vzorke č. 6 je, že daná vzorka, bola odoberaná z poľa, z vrchnej vrsty pôdy (0 – 15 cm) bez vegetačného pokryvu, po zbere poľnohospodárskej plodiny a čerstvo zoraná. Oraním došlo k zničeniu pôvodného rozvrstvenia mikroorganizmov. Vyšší počet izolátov by sa pravdepodobne zistil z väčšej hĺbky, ktorá bola menej zasiahnutá poľnohospodárskymi postupmi. V práci Grantina et al. (2011) bola najvyššia diverzita v poľnohospodárskych pôdach s konvenčným poľnohospodárstvom zaznamenaná až v hĺbke 30 – 35 cm. Diverzita v hĺbke 10 až 30 cm bola podobná alebo o niečo vyššia, ako v hornej vrstve pôdy. Wuczkowski et al. (2003) pozorovali najväčšiu diverzitu kultivovateľných mikroorganizmov v hornej vrstve lesnej pôdy (0 – 15 cm). Táto vrstva pôdneho profilu je charakterizovaná ako zóna najvyššieho rozkladu organického materiálu. Nižšiu druhovú diverzitu mikroorganizmov v poľnohospodárskej pôde, v porovnaní napr. s lesnou pôdou alebo bývalými poľnohospodárskymi pôdami, uvádza aj Grantina et al. (2011). Inou možnosťou nízkej diverzity vo vzorke č. 6 je toxické pôsobenie prítomnej Hg, ktorej celkové koncentrácie sú v danej vzorke najvyššie (Hassen et al., 1998).

Nízka druhová diverzita vo vzorke č. 2, ktorá obsahuje relatívne najmenej As (93 $mg.kg^{-1}$), podľa všetkého súvisí taktiež so slabou vegetačnou pokrývkou vyskytujúcou sa na danom mieste. Ďalším možným vysvetlením je vyšší obsah ílovej frakcie oproti ostatným vzorkám. Nižšiu diverzitu baktérií v ílovitých pôdach (7 kmeňov) oproti piesčito-hlinitým pôdam (20 kmeňov) uvádza Piotrowska-Seget et al. (2005). Rozdiel súvisel s pôsobením vyšších koncentrácií ťažkých kovov (celkové obsahy aj rozpustné frakcie) v ílovitej pôde.

Z výsledkov PCR analýzy sa nedá presne povedať, či zistená štruktúra bakteriálneho spoločenstva je výsledkom dlhodobého pôsobenia arzénu v pôdach a či došlo k rozvinutiu rezistencie prítomných druhov voči arzénu a k potlačeniu citlivejších druhov. Aj keď, ako uvádzajú mnohé práce (napr. Cai et al., 2009), dlhodobá kontaminácia pôd arzénom

pravdepodobne viedla k rozvoju rezistentných druhov. Jednou z možných alternatív je, že celková výsledná štruktúra spoločenstva baktérií súvisí pravdepodobne aj s nízkou biologickou dostupnosťou As v daných pôdach, ktorá bola zistená nielen stanovením vodorozpustného podielu As v daných pôdach (menej ako 4 hm. %), ale aj na základe jednokrokovej extrakcie s roztokom 1M NH_4NO_3 pre určenie ľahko prístupných foriem prvkov zo vzoriek pre rastliny (0,33 hm. % uvoľneného As) (Jurkovič et al., 2011). Túto hypotézu podporuje práca Turpeinen et al. (2004), v ktorej taktiež sledovali dlhodobú kontamináciu pôd As, Cr a Cu z továrne na impregnáciu dreva. Bioprístupné obsahy As v pôdach (vodorozpustná frakcia) boli podobne nízke ako v prípade pochovaných sedimentov v Zemianskych Kostoľanoch. Z pôd odobratých z okolia továrne, kde bola prevádzka cca 30 rokov zrušená, boli vodorozpustné podiely As 5,1 % resp. 8,8 %. Pôda pri továrni, ktorá bola uzavretá len 2 roky pred odberom, obsahovala až 42 % vodorozpustného podielu As. Hoci v pôde s 30 ročnou záťažou bola diverzita As-rezistentných izolátov pravdepodobne kvôli nízkej biologickej dostupnosti a toxicite As nízka, celková diverzita baktérií bola vyššia ako v pôdach, kde bola vysoká rozpustnosť a bioprístupnosť As.

Množstvo, biomasa alebo činnosť pôdnych organizmov môžu byť ovplyvnené rôznymi faktormi životného prostredia (napr. teplota, obsah vody, hodnota pH) a nielen vplyvom ťažkých kovov. Preto je niekedy ťažké posúdiť vplyv kovov na mikroorganizmy kvôli problému oddelenia toxického účinku kovu od ostatných faktorov životného prostredia (Diaz-Raviña a Bååth, 1996). Macdonald et al. (2010) uvádza, že význam vplyvu faktorov na štruktúru spoločenstva baktérií klesá v poradí pôdny typ > zdroj kovu > koncentrácia kovu. Chodak et al. (2013) považujú hodnotu pH pôdy za hlavný faktor ovplyvňujúci štruktúru a aktivitu mikrobiálneho spoločenstva. Vplyv vysokých obsahov ťažkých kovov bol slabší v porovnaní s inými vlastnosťami pôdy. Sandaa et al. (2001) skúmali vplyv dlhotrvajúcej kontaminácie ťažkými kovmi z odpadových kalov na mikrobiálne spoločenstvá. Výsledky neukázali výrazný rozdiel v štruktúre spoločenstiev porovnaním pôd s nízkym obsahom ťažkých kovov s pôdami s vysokým obsahom ťažkých kovov.

Hoci sa pre izoláciu čo najväčšieho počtu druhov baktérií v daných substrátoch použili univerzálne aj selektívno-diagnostické živné médiá, množstvo kultivovateľných mikroorganizmov je menšie ako 1 % z mikroorganizmov pozorovaných pod mikroskopom (Torsvik a Øvreås, 2002). Väčšina pôdnych mikroorganizmov je nedetekovateľná, pretože ich požiadavky na živiny sú buď neznáme alebo ich nevieme zachytiť súčasnou technikou.

5. ENVIRONMENTÁLNY VÝZNAM MIKROORGANIZMOV V PROCESOCH BIOTRANSFORMÁCIE POTENCIÁLNE TOXICKÝCH PRVKOV

Mikroorganizmy sú v kontaminovanom prostredí vystavené pôsobeniu celej rady kovových iónov, ktoré priamo či nepriamo ovplyvňujú všetky fázy ich bunkového cyklu. Toxicita a environmentálny dopad rôznych chemických prvkov môžu byť veľmi variabilné v závislosti na fyziológii mikroorganizmu, na chemicko-fyzikálnych vlastnostiach prvku i na jeho finálnej koncentrácii v prostredí. V prípade bakteriálnych buniek sa pôsobenie kovu odlišne prejavuje taktiež v závislosti od rodu i druhu a súvisí i s rastovou fázou bakteriálnej kultúry. Miera nebezpečenstva ťažkých kovov v pôde vyplýva z ich relatívnej mobility a bioprístupnosti, ktoré závisia od pôdnych charakteristík, ako je hodnota pH, mineralógia, štruktúra a obsah organických látok, ako aj od zdroja a množstva ťažkých kovov v pôde (Lofts et al., 2004). Roane et al. (2009) klasifikovali kovy do 3 skupín na základe ich biologických funkcií a účinkov:

- esenciálne kovy so známymi biologickými funkciami (Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, W), ktoré hrajú dôležitú úlohu pri stabilizácii molekúl v základných oxidačno-redukčných procesoch metabolizmu, alebo sú súčasťou rôznych enzýmov a uplatňujú sa pri regulácii osmotických javov,
- toxické kovy (Ag, Cd, Sn, Au, Hg, Ti, Pb, Al a metaloidy As, Ge, Sb, Se)
- neesenciálne, netoxické kovy so žiadnym známym biologickým účinkom (Rb, Cs, Sr).

Mechanizmy, ktorými sa ióny kovov viažu k bunkovým povrchom, zahŕňajú elektrostatické interakcie, Van der Waalsove sily, kovalentnú väzbu, redoxné reakcie a extracelulárne zrážanie alebo kombináciou týchto procesov (Blanco et al., 2000).

Toxicita sa prejavuje nad určitou hranicou koncentrácie, ktorá sa mení v závislosti od typu organizmu i od fyzikálno-chemických vlastností kovu. Toxické kovy vytvárajú s esenciálnymi prvkami v bunkách baktérií kovalentné i iónové väzby a môžu sa uplatniť v čiastkových metabolických procesoch. V určitých koncentráciách však môžu pôsobiť letálne –poškodzovať bunkové membrány, menit špecifickosť enzýmov, viesť k narušeniu bunkových funkcií a vyvolávať mutácie DNA (Gadd, 1993; Adams et al., 2001). Ochiai (1997) uvádza všeobecný mechanizmus toxicity iónov kovov: blokovanie esenciálnych biologických funkčných skupín v biomolekulách, najmä v proteínoch a enzýmoch, nahradenie esenciálneho iónu kovu v biomolekulách a pozmenenie aktívnej štruktúry biomolekúl, čo vedie k strate špecifickej činnosti. Mikroorganizmy majú voči takýmto kovom vyvinuté rezistenčno-adaptačné mechanizmy vedúce k eliminácii ich vplyvu, napr. uzavretie permeability membrán, intra(extra)-celulárna tvorba komplexných zlúčenín a enzymatická detoxikácia vedúca k zníženiu senzitivity

buniek voči kovovým iónom. Organizmy odpovedajú na stres vyvolaný ťažkými kovmi rôznymi obrannými systémami, napr. vylučovaním, tvorbou komplexov a syntézou adaptatívnych komplexov (metalothioneiny a chelatíny) (Rajendran et al., 2003).

Pochopenie mechanizmov rezistencie a stratégie detoxikácie na bunkovej úrovni je pre procesy smerujúce k odstráneniu kovov kľúčové a umožňuje širšie praktické aplikácie mikroorganizmov v procesoch vedúcich k odstráneniu toxických kovov z prostredia (Bruins et al., 2000; McKinney, 2004).

5.1 Interakcie mikroorganizmov s potenciálne toxickými prvkami

Mikrobiálne spoločenstvá hrajú dôležitú úlohu prostredníctvom rôznych funkcií, napr. zaisťujú kolobeh mnohých prvkov v prostredí, alebo sa podieľajú na humifikačných a mineralizačných procesoch, na vzniku a udržiavaní pôdnej štruktúry, na rozklade hnojív, pesticídov a ďalších nežiaducich látok (Nannipieri et al., 2003). Baktérie sú mikroorganizmy s vysokou adaptabilitou na zmeny fyziologických podmienok, a táto schopnosť im umožňuje existovať i v extrémnych podmienkach, ktoré už nevyhovujú iným organizmom. Prítomnosť baktérií bola opakovane preukázaná v antropogénne zaťažených pôdach, v kyslých vodách, v technogénnych zeminách, v sedimentoch odkalísk a lagún (Jurkovič et al., 2014; Peťková et al., 2014; Vojtková et al., 2014a; Vojtková, 2014b; Šimonovičová et al., 2016).

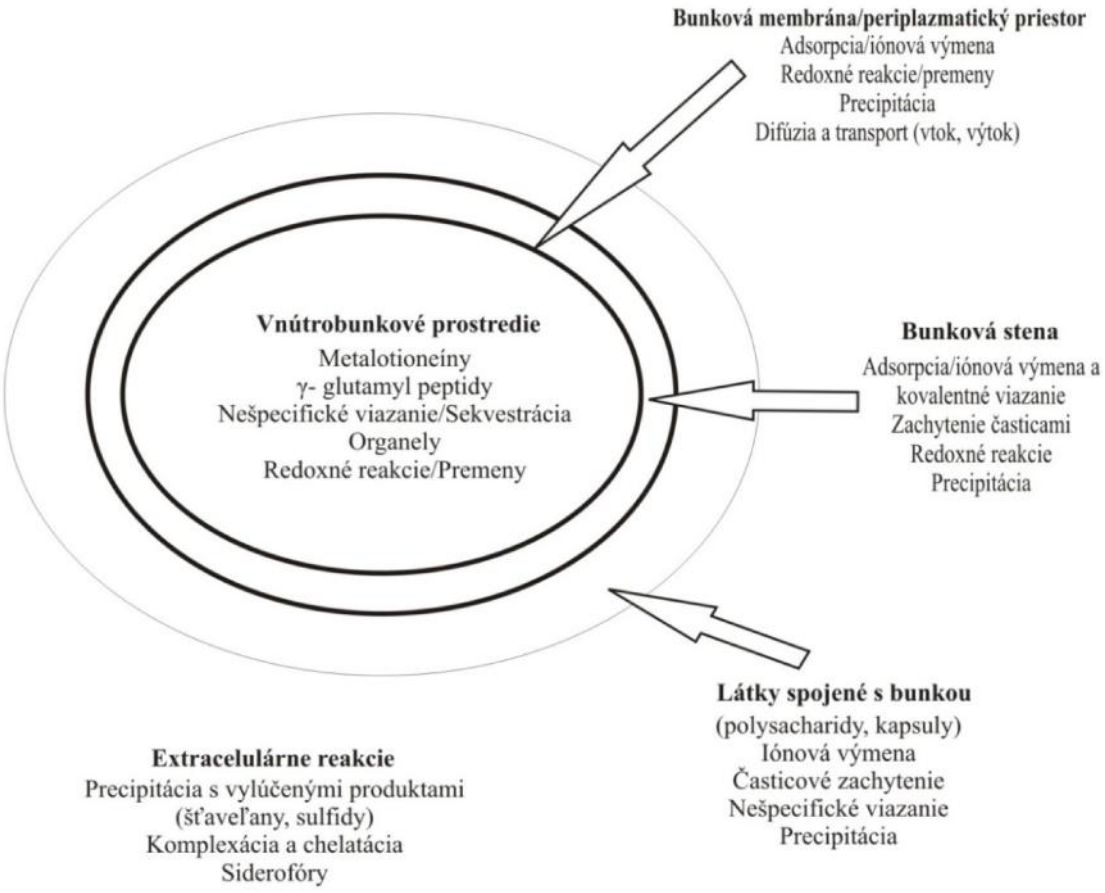
Prítomnosť ťažkých kovov nepriaznivo vplýva na rast, morfológiu a biochemické aktivity mikroorganizmov, znižuje množstvo pôdnej mikrobiálnej biomasy (Brookes a McGrath, 1984; Chander et al., 1995), a rôzne enzymatické činnosti, čo vedie k zníženiu funkčnej rozmanitosti pôdneho ekosystému (Kandeler et al., 1996; Roane a Kelloqq, 1996) a zmenám v štruktúre mikrobiálneho spoločenstva (Witter et al., 2000; Abaye et al., 2005; Frey et al., 2006).

Na negatívne zmeny v prostredí reaguje spoločenstvo mikroorganizmov zmenou svojej ekologickej stability – denzity aj diverzity, ktorá vedie v rámci ekosystému k dekompenzačným procesom. Stresové faktory sa prejavujú na mikroorganizmoch deformáciami mikromorfologických štruktúr i fyziologických charakteristík, časté sú aj zmeny na ich molekulárnej úrovni (Beňová, 2004; Šimonovičová, 2013).

Na druhej strane, pôsobenie potenciálnych prvkov môže viesť k vývoju kov-tolerantných a rezistentných mikrobiálnych populácií (Haq a Shakoori, 2000; Roane a Pepper, 2000; Ellis et al., 2003; Camargo et al., 2005).

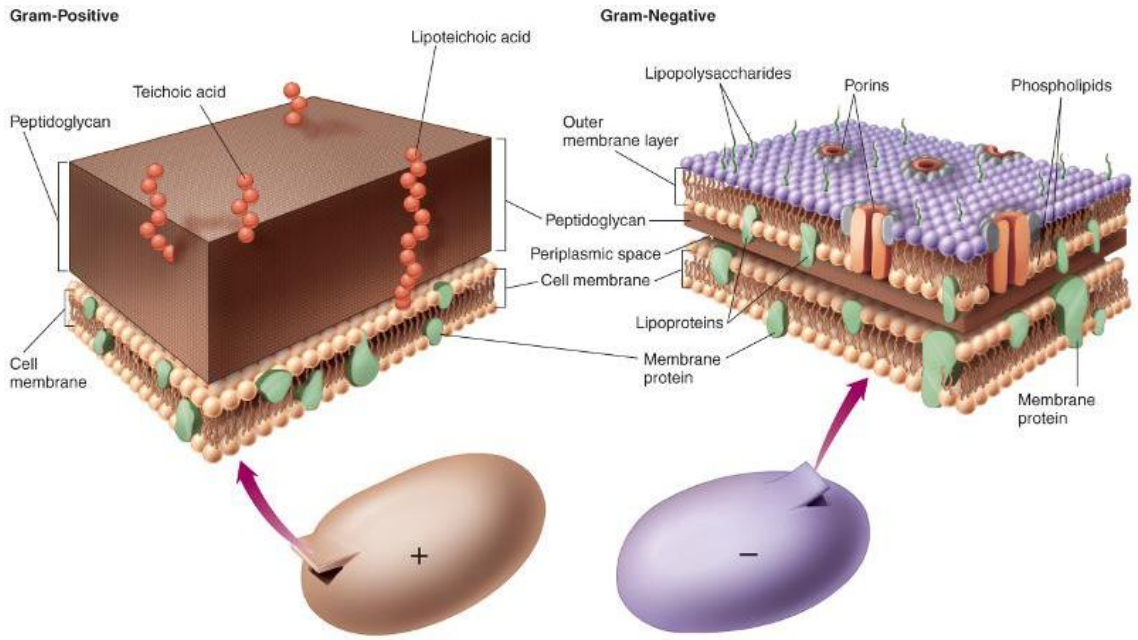
5.1.1 Bunkové zložky a procesy ovplyvňujúce mobilitu a imobilitu PTP

Spôsoby, akými mikroorganizmy interagujú s toxickými kovmi, sú veľmi rôznorodé (obr. 16). Mechanizmus odstraňovania kovov, ktorý je závislý od metabolizmu, zahŕňa precipitáciu kovov ako sulfidy, komplexáciu siderofórmi a ďalšími metabolitmi, sekvestráciu kov-viažucimi proteínmi a peptidmi, transportom na intracelulárne časti (White et al., 1995). K ďalším mechanizmom, ktoré majú mikroorganizmy vyvinuté ako odpoveď na prítomnosť ťažkých kovov patrí: transport cez bunkovú membránu, biosorpcia na bunkovú stenu, zachytenie v extracelulárnych kapsulách, precipitácia a oxidačno-redukčné reakcie (Avery a Tobin, 1993; Brady et al., 1994; Brady a Duncan, 1994; Veglió et al., 1997; Veglió a Beolchini, 1997; Malik, 2004).



Obr. 16 Schéma znázorňuje procesy prispievajúce k mikrobiálnemu príjmu a detoxikácii toxických kovov. Lokalizácia niektorých procesov (najmä enzýmové a redoxné reakcie) je neistá a predpokladané umiestnenia sú naznačené. Tie sa môžu líšiť medzi skupinami, kmeňmi a druhmi prokaryotických a eukaryotických organizmov (Gadd aWhite, 1993).

Bunková stena je prvá časť bunky, ktorá prichádza do kontaktu s iónmi kovov v roztoku. Jej základnými stavebnými súčasťami sú peptidoglykan (murein) a teichoová kyselina u grampozitívnych baktérií, u gramnegatívnych buniek taktiež fosfolipidy, lipoproteíny a lipopolysacharidy (obr. 17).



Obr. 17 Rozdiely v stavbe bunkovej steny u grampozitívnych a gramnegatívnych baktérií (Biology Forums Gallery, www. biology-forums.com)

Primárne interakcie, ktoré prebiehajú medzi kovovými iónmi a bunkami baktérií, sú podmienené účasťou funkčných skupín, predovšetkým karboxylových skupín $–COO^-$ a –COOH, aminoskupiny $–NH_2$, tiolovej (sulfhydrylovej) skupiny –SH, fosfátovej skupiny $–(PO_4)^{3-}$ a hydroxylovej skupiny –OH. Fosfátové, karboxylové a hydroxylové funkčné skupiny kyselín a proteínov prítomných v bunkovej stene majú zásadnú úlohu, pretože umožňujú väzbu kovu rôznymi mechanizmami, predovšetkým iónovou výmenou alebo tvorbou kovaletných väzeb. Ich pomer môže byť výrazne ovplyvnený prítomnosťou katiónov v okolitom prostredí, ktoré môže dobre reprezentovať nutričné (kultivačné) médium. S týmto pomerom súvisí pevnosť väzieb kovov na bunkový povrch i spôsob príjmu kovu bunkou. Mnohé kovy, napr. Fe, Zn, Cu, Pb, Hg, U sa veľmi rýchlo viažu na stavebné súčasti bunkových stien, v rôznej miere v závislosti od druhu kovu. Pokiaľ sú v roztoku prítomné viac ako dva kovy, katión, ktorý vytvára najstabilnejší komplex s polymérom, je prednostne viazaný, pričom ostatné katióny zostávajú v roztoku (Volesky a Holan, 1995; Volesky, 2007).

Experimentálnym spôsobom bolo dokázáné, že aminoskupiny a karboxylové skupiny, prítomné v bunkovej stene, zohrávajú významnú úlohu pri biosorpcii kovových iónov Pb, Cd a Cu biomasou mikromycét na rozdiel od fosfátových skupín a lipidových frakcií (Kapoor a Viraraghavan, 1995). Aktivita funkčných skupín v procesoch biosorpcie je však rozdielna. V súvislosti s bakteriálnou elimináciou kovov z odpadových vôd z procesov textilného farbenia bola potvrdená primárna úloha aminoskupiny $–NH_2$ pri väzbe iónov kovov, karboxylové a fosfátové funkčné skupiny tento proces inhibovali (Han a Yun, 2007).

Kovy môžu byť uložené na povrchu alebo vo vnútri štruktúry bunkovej steny pred interakciou s cytoplazmatickým materiálom alebo inými bunkovými časťami (Gadd, 1990). Príjem kovov bunkovou stenou je založený na dvoch mechanizmoch: príjem riadený funkčnými skupinami (napr. fosforečnanmi). Druhý mechanizmus príjmu vychádza z fyzikálno-chemických anorganických interakcií usmerňovaný adsorpčnými javmi. Mechanizmus odstraňovania rádionuklidov vyplýva z kombinácie oboch procesov, kým pre ťažké kovy je dôležitý prvý mechanizmus (Kapoor a Viraraghavan, 1995). Tiež bunkové steny mikroskopických húb obsahujú chitín a chitosan, ktoré sú schopné sekvestrovať/zadržať ióny kovov (Muzzarelli, 1979; Tsezos, 1983).

Kapsuly alebo tenké vrstvy sú dôležitými mikrobiálnymi zložkami z hľadiska viazania kovov. Melaníny predstavujú tmavo-hnedé alebo čierne pigmenty a nachádzať sa môžu na bunkových stenách alebo sú ich súčasťou, napríklad v podobe zŕn (Bell a Wheeler, 1986). Tieto zložky obsahujú rôzne funkčné skupiny, ktoré poskytujú veľký počet väzbových miest pre ióny kovov (Fogarty a Tobin, 1996), a tým majú významnú úlohu pri znižovaní ich koncentrácií vo vonkajšom prostredí bunky (Rizzo et al., 1992). Väčšina týchto zložiek je zložená z polysacharidov, glykoproteínov a lipopolysacharidov, ktoré môžu byť spojené s proteínmi (White et al., 1995). Fenolické polyméry a melaníny u mikroorganizmov obsahujú fenolové jednotky, peptidy, sacharidy, alifatické uhľovodíky a mastné kyseliny a z tohto dôvodu majú množstvo potenciálnych miest schopných viazať kovy (Senesi et al., 1987; Sakaguchi a Nakajima, 1987).

Metalotioneíny, bielkoviny bohaté na cysteín, sú schopné izolovať a následne akumulovať ióny kovov. Tieto malé polypeptidy viažu esenciálne kovy ako Cu a Zn, podobne ako neesenciálne kovy (Cd) (White et al., 1995). Prvý krát boli popísané v roku 1957 ako hlavné proteíny viažuce kadmium v extrakte z kôrovej vrstvy obličiek koňa (Margoshes a Vallee, 1957). Ide o proteíny s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktoré obsahujú značné množstvo cysteínových zvyškov a majú vysokú afinitu ku kovovým iónom. Metalothioneíny boli postupne izolované z ďalších organizmov vrátane cicavcov, kvasiniek, rias a húb (Butt a Ecker, 1987). Taktiež v bunkách človeka bolo preukázaných najmenej 16 génov pre metalothioneíny, ktoré sú exprimované najčastejšie v ľudskej pečeni, obličkách, črevách, slinivke a mozgu (Coyle et al., 2002; Robinson et al., 2001). Metalothioneíny, ktoré bunky produkujú, možu mať hneď niekoľko funkcií: zaisťujú detoxikáciu nadbytku kovových iónov (napr. Zn^{2+}, Cu^{2+} a Cd^{2+}), môžu akumulovať nadbytočné kovové ióny (ktoré môžu byť mobilizované v podmienkach s limitujúcou koncentráciou daných prvkov), môžu mať funkciu kovových chaperónov, ktoré dodávajú do proteínov esenciálny kov, prípadne môžu mať funkciu antioxidantov, ktoré vychytávajú kyslíkové radikály (Palmiter, 1998). V súčasnej dobe sú metalothioneíny rozdelené s ohľadom

na primárnu štruktúru do troch základných tried: metalothioneíny cicavcov (trieda MT-I), bakteriálne formy metalothioneínov (trieda MT-II) a metalothioneíny rastlín (trieda MT-III) (Zelená et al., 2004). Pre všetky metalothioneíny je charakteristický nielen vysoký obsah aminokyseliny cysteínu, ale i väzba kovových iónov pomocou thiolátov a tvorba cysteinyl-thiolátových klastrov s charakteristickým priestorovým usporiadaním (Vodičková et al., 2001). Napríklad sa zistilo, že metalothioneíny pseudomonád (*P. putida* KT2440 a *P. aeruginosa*), ktoré boli identifikované na základe sekvenovania ich genómu, obsahujú v priemere oveľa dlhšie reťazce aminokyselín než u iných baktérií, co môže zohrať významú úlohu práve pri väzbe iónov kovov (Robinson et al., 2001). Príklad: jedna molekula pseudomonádového metalothioneínu je schopná viazať 3 – 4 atómy zinku oproti methalothioneínu z baktérie *E. coli*, ktorý viaže len jeden atóm zinku (Blindauer et al., 2001); u pseudomonád však nebol doposiaľ identifikovaný žiadny regulačný proteín (Cánovas et al., 2003). V rastlinách je ich tvorba indukovaná rôznymi stresovými faktormi, ako sú ťažké kovy, tepelný šok, rastlinné hormóny a poranenie. Tvorba týchto bielkovín v baktériách sa využíva pre zvýšenie zadržiavania kovov mikroorganizmami a biotechnologicky sa aplikuje pri odstraňovaní ťažkých kovov z odpadových a podzemných vôd (Demnerová a Macková, 2006). Príkladom ich pôsobenia je sprostredkovanie Cu-rezistencie v *Saccharomyces cerevisiae* (Fogel et al., 1988).

Sideroféry sú nízkomolekulárne koordinačné zlúčeniny Fe (III), ktoré sú extrahované mikroorganizmami, najmä baktériami a hubami, pre akumuláciu železa z prostredia v Fe-limitujúcich podmienkach. Hoci sú sideroféry a ich analógové zložky špecifické pre Fe (III), môžu vytvárať komplexy aj s inými kovmi (Ga (III), Cr (III), Mg, Mn, Sc, In, Ni, U a Th (Premuzic et al., 1985; Hausinger, 1987; Macaskie a Dean, 1990; Birch a Bachofen, 1990).

Fytochelatíny (γ-glutamyl peptidy) sú krátke peptidy zúčastňujúce sa na detoxikácii ťažkých kovov v riasach, rastlinách a niektorých hubách (Mehra a Winge, 1991; Gadd, 1993).

Koreňmi rastlín a hubovými vláknami sú do pôdy uvoľňované šťaveľany a citráty. Tieto nízkomolekulové organické kyseliny sú schopné vytvárať stabilné komplexy s mnohými kovmi v roztoku (White et al., 1997). Šťaveľan vápenatý je najčastejšie sa vyskytujúcou formou šťaveľanu v prostredí, väčšinou ako dihydrát (weddellit) alebo stabilnejší monohydrát (whewellit) (Gadd, 1999). Kryštály šťaveľanu vápenatého sú zvyčajne spojené s voľne žijúcimi, patogénnymi a rastlinnými symbiotickými hubami a vznikajú precipitáciou rozpusteného vápnika (Gadd, 1999; Gharieb et al., 1998). Vytvorenie šťaveľanu vápenatého má významný vplyv na biogeochemické procesy v pôde, pretože pôsobí ako zásobáreň vápnika a ovplyvňuje prístupnosť fosforečnanov. Huby môžu produkovať ďalšie štaveľany s radom rôznych kovov a kov-viažúcich minerálov, napr. Cd, Co, Cu, Mn, Sr a Zn (White et al., 1997; Gadd, 1999; Sayer et al., 1999). Kyselina šťaveľová pôsobí zároveň aj ako činidlo pre lúhovanie týchto kovov, ktoré

vytvárajú rozpustné šťaveľanové komplexy, hlavne Al a Fe, Li, Mn (Strasser et al., 1994). Mnohé citráty kovov sú vysoko mobilné a pomerne ťažko degradovateľné (Francis et al., 1992).

Sulfát-redukujúce baktérie majú nenahraditeľnú funkciu v kolobehu síry v prírode a predstavujú skupinu chemoorganotrofných, striktne anaeróbnych, gramnegatívnych a nespórotvorných (okrem rodu *Desulfotomaculum*) baktérií. Charakteristická je pre ne schopnosť využívať pri anaeróbnych respiračných pochodoch ako akceptory elektrónov sírany, ktoré redukujú na sulfidy, a vzhľadom na túto skutočnosť sa proces nazýva bakteriálna redukcia síranov (Castro et al., 2000). Donorom elektrónov môže byť plynný vodík (autotrofná síranová redukcia):

$$4\,H_2 + SO_4^{2-} \xrightarrow{\text{SRB}} H_2S + 2\,H_2O + 2\,OH^-$$

alebo organický substrát (heterotrofná síranová redukcia):

$$2\,CH_3CHOHCOO^- + SO_4^{2-} \xrightarrow{\text{SRB}} 2\,CH_3COO^- + 2\,HCO_3^- + H_2S^-$$

Sulfát-redukujúce baktérie tak produkujú značné množstvo sírovodíka, ktorý vo vodnom prostredí ľahko reaguje s katiónmi ťažkých kovov za vzniku málo rozpustných sulfidov:

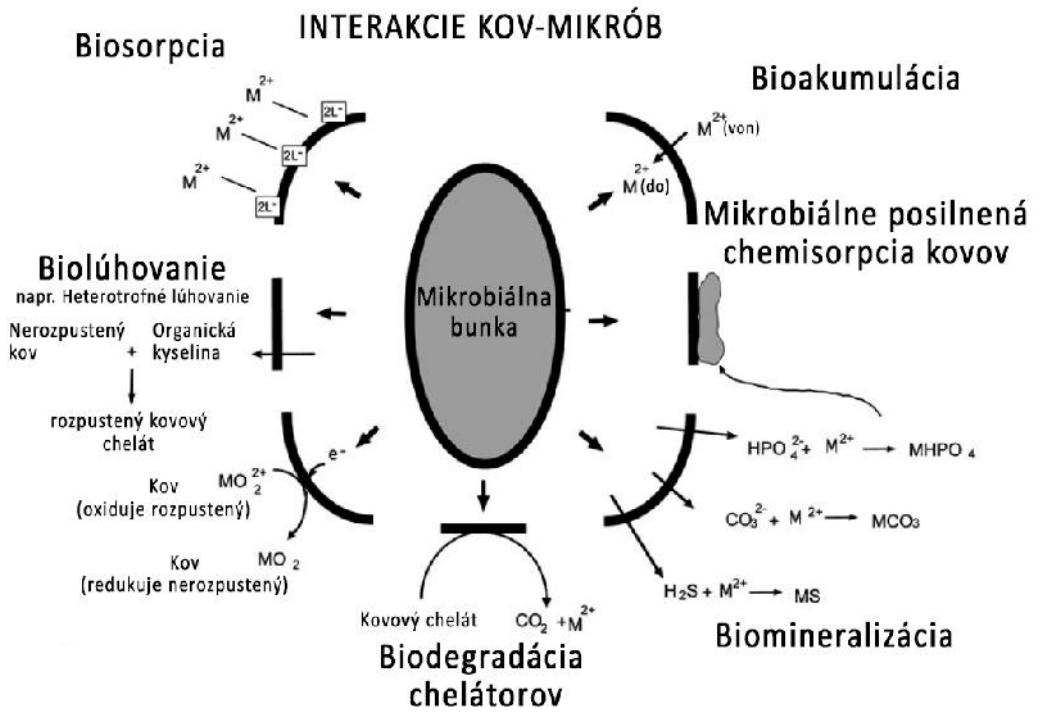
$$Me^{2+} + H_2S \longmapsto Me. + 2\,H^+$$

Prirodzené biologické aktivity sulfát-redukujúcich baktérií popísané uvedenými rovnicami je možné použiť pri odstraňovaní ťažkých kovov a aj síranov z odpadových vôd. Je to nekonvenčná biologicko-chemická metóda, ktorá sa z hľadiska mechanizmu akumulácie kovu mikroorganizmami klasifikuje ako extracelulárne zrážanie kovov (Luptáková a Kaduková, 2002).

Zvýšený záujem o výskum interakcií medzi mikroorganizmami a kovmi podporil aplikácie v oblasti minerálnych biotechnológií, najmä možnosti znovuzískavania cenných kovov z menej kvalitných rúd biolúhovacími procesmi s využitím mikroorganizmov (Gadd, 1993; Gomes et al., 1993; Cervantes et al., 1994; Khoo a Ting, 2001; Kušnierová a Fečko, 2001; Tsuruta, 2004; Vojtková et al., 2012).

5.1.2 Bunkové procesy využívané v remediácii kontaminovaného prostredia

Mechanizmy, ktorými mikroorganizmy účinne menia špeciáciu (polo)kovov a tým ovplyvňujú ich mobilitu, sú súčasťou prírodných biogeochemických cyklov a sú potenciálom pre *in situ* a *ex situ* bioremediačné procesy tuhých a tekutých odpadov (Gadd, 2000). Bioremediačné schopnosti prirodzeného potenciálu mikroorganizmov spôsobujú transformáciu, mineralizáciu alebo komplexáciu environmentálnych polutantov (obr. 18) (Bollag et al., 2005).



Obr. 18 Interakcie medzi kovom (M) a mikróbom ovplyvňujúce bioremediáciu (Tabak et al. 2005)

Schopnosť prežívať v podmienkach kontaminácie je u mikroorganizmov zaistená základnými mechanizmami:

– chelatácia prvkov a ich väzba na proteíny,
– zmena pH, ktorá podporuje výmenu iónov,
– imobilizácia, ktorá vedie k vytvoreniu stabilnejších foriem,
– biodegradácia organických komplexov kovov a rádionuklidov,
– biometylácia, biovolatilizácia,
– biosorpcia cez funkčné skupiny na povrchu buniek,
– bioakumulácia a bioprecipitácia.

Z hľadiska spôsobu akumulácie kovov mikroorganizmami sa rozlišuje 5 hlavných mechanizmov (Borovec, 1989):

– väzba kovu k povrchu bunky (biosorpcia),
– intracelulárna (vnútrobunková) akumulácia,
– volatilizácia (vyparovanie),
– extracelulárna (mimobunková) akumulácia, ktorú predchádza tvorba komplexov kovov,
– extracelulárne (mimobunkové) zrážanie kovov.

Biotransformácia býva často súčasťou stratégie mikroorganizmov prežiť v životnom prostredí nepriaznivé podmienky (prítomnosť ťažkých kovov). Biosorpcia a bioprecipitácia sú väčšinou aplikované v *ex situ* procesoch.

Biosorpcia

Množstvo fyzikálno-chemických a biologických mechanizmov určuje odstraňovanie toxických kovov, polokovov a rádionuklidov z kontaminovaných odpadov (Frankovská et al., 2010). Fyzikálno-chemické mechanizmy odstraňovania v environmentálnych biotechnológiách, ktoré môžu byť označené všeobecným termínom „biosorpcia“, zahŕňajú fyzikálnu adsorpciu, iónovú výmenu, tvorbu chelátov, koordinačné a kovalentné viazanie, mikroprecipitáciu, zachytenie a pravdepodobne dochádza aj k oxidačným a redukčným reakciám (Strandberg et al., 1981; Tobin et al., 1990; White et al., 1995; Luptáková a Kaduková, 2002). Sposito (1984) definoval sorpciu ako akumuláciu rozpustených látok na rozhraní medzi vodnou fázou roztoku a pevnou fázou. Iná definícia uvádza biosorpciu ako nepriamu fyzikálno-chemickú interakciu, ktorá sa môže vyskytovať medzi formami kovu/rádionuklidmi a bunkovými zlúčeninami biologických druhov (Shumate a Strandberg, 1985). Biomasa je schopná viazať a koncentrovať rôzne látky z vodných roztokov, a to predovšetkým bunkovým povrchom. Biomasa v tomto prípade zohráva úlohu adsorbentu (biosorbentu), teda materiálu, na ktorom dochádza k väzbe toxických látok. Látky, ktoré sa v procese biosorpcie viažu na sorbent, sa označujú ako adsorbát (sorbát).

Uvedené procesy väzby toxických prvkov môžu byť spájané s mŕtvou i živou biomasou. Na biosorpciu v živých bunkách pôsobí metabolizmus priamo alebo nepriamo (Tobin et al., 1990). Príjem ťažkých kovov biomasou môže prebiehať aktívne (v závislosti od metabolickej aktivity) známej ako bioakumulácia alebo pasívne (sorpcia alebo komplexácia) označovaná ako biosorpcia (Kapoor a Viraraghavan, 1995). Príjem kovu odumretými bunkami prebieha pasívnym spôsobom, kým živé bunky využívajú oba spôsoby. Pre izoláciu a imobilizáciu kovových prvkov sa za výhodnejšie javí použitie neživej biomasy, pretože bolo dokázané, že jej efektivita nie je podmienená rezistenciou organizmu voči toxickým účinkom kovov a polokovov (Volesky, 2003). Biosorpčná kapacita biomasy môže byť ovplyvnená rozsahom fyzikálnych a chemických úprav. Imobilizovaná biomasa udržiava biosorpčné vlastnosti a má množstvo výhod pre rôzne aplikácie (Tobin et al., 1994).

Fyzikálno-chemické mechanizmy biosorpcie závisia od existencie rôznych vonkajších faktorov, typu kovu, jeho iónovej formy v roztoku a od typu aktívnych väzbových miest na povrchu bunky (Luptáková a Kaduková, 2002). K hlavným chemickým skupinám v biomase, ktoré sú schopné podieľať sa na biosorpcii, patria elektronegatívne skupiny ako sú hydroxylové alebo sulfhydrylové skupiny, aniónové skupiny ako je karboxylová alebo fosforečnanové skupiny a skupiny obsahujúce dusík ako napr. amino skupiny (Tobin et al., 1990).

Podľa miesta, kde dochádza k odstráneniu kovu z roztoku, je biosorpcia klasifikovaná ako (Veglió a Beolchini, 1997):

1. extracelulárna akumulácia/precipitácia,
2. sorpcia bunkovým povrchom/precipitácia,
3. intracelulárna akumulácia.

Biosorpcia je veľmi rýchly, na metabolizme nezávislý proces a jeho rovnováha je v priebehu kinetických experimentov spravidla dosiahnutá v priebehu niekoľkých minút. Významná časť vedeckých štúdií zameraných na problematiku biosorpcie z vodných roztokov, respektíve kontaminovaných pôd, sa týka predovšetkým toxických a potenciálne toxických kovov. Pomerne detailne je preskúmaný proces biosorpcie pre vybrané toxické kovy – Pb, Cd, Cr, Cu a Hg (Blanco et al., 1999; Ahalya et al., 2003; Uslu a Tanyon, 2006); avšak v literatúre sa taktiež objavujú štúdie predstavujúce biosorpciu pri odstraňovaní organických polutantov z kontaminovaného prostredia (napr. biosorpcia farieb, pesticídov a fenolov) (Aksu et al., 2005; Fu a Viraraghavan, 2001). Volesky (2007) uvažuje o aplikácii biosorpcie pri izolácii, resp. purifikácii farmaceutík a protilátok. Zaujímavým aspektom biosorpcie je jej aplikácia pri koncentrácii a spätnom získavaní vzácnych prvkov ako je napr. Au, Pt, Pd, Ag, U, Th, prípadne lanthanoidy (Godlewska-Zylkiewicz, 2003; Niu a Volesky, 2003; Diniz a Volesky, 2005; Mack et al., 2007).

Sorpcia ťažkých kovov biomasou mikroorganizmov bola pozorovaná v rôznej miere a závisí do značnej miery na parametroch ako je hodnota pH, koncentrácia iónov kovov a biomasy, prítomnosť rôznych ligandov v roztoku a v obmedzenej miere na teplote (Kapoor a Viraraghavan, 1995). *Aspergillus nidulans* ako vhodný adsorbent pre arzén v pôdach potvrdili vo svojej štúdii Maheswari a Murugesan (2009).

Využitie zástupcov rodu *Pseudomonas* ako modelových biosorbentov na báze bakteriálnej biomasy pri štúdiu mechanizmu biosorpcie je pomerne časté (tab. 18). Väčšinou sa k tomuto účelu hľadajú nové izoláty zo silne kontaminovaných oblastí. Doteraz bola publikovaná rada druhov, u ktorých bola experimentálne potvrdená možnosť ich zaradenia ako účinných biosorbentov so zaujímavým potenciálom pre odstraňovanie ťažkých kovov z roztokov, a to predovšetkým v porovnaní s biomasou vláknitých húb rodu *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus* a *Penicillium* (Volesky a Holan, 1995; Tobin a Roux, 1998; Čerňanský et al., 2007).

V roku 2003 bola publikovaná štúdia zaoberajúca sa sorpčnými schopnosťami inaktivovanej lyofilizovanej bakteriálnej biomasy kmeňa *P. putida* voči kadmiu, medi, olovu a zinku (Pardo et al., 2003). Práca bola zameraná na stanovenie optimálnych podmienok pre ideálny priebeh sorpcií. Pri dodržaní takých podmienok je uvádzaná až 80 % účinnosť v odstránení všetkých študovaných kovov.

Tab. 18 Prehľad bakteriálnych kmeňov *Pseudomonas* a ich využitie v sorpcii kovov

Bakteriálny kmeň	Sorbované kovy	Zdroj
P. aeruginosa AT18	Cr(III), Cu(II), Mn(II), Zn(II)	Pérez Silva et al. (2009)
P. aeruginosa	Zn (II), Pb (II)	Yin et al. (2014)
P. aeruginosa	Fe(0), Cr (VI), Cd (II)	Singh et al. (2013)
P. aeruginosa CA207Ni	Ni(II), Co(II)	Oyetibo et al. (2013)
P. aeruginosa	Cd (II), Cr (VI), Cu (II), Zn (II), Co (II), Hg (II)	Hassen et al. (1998)
P. aeruginosa PU21	Hg (II)	Chang a Hong (1994)
P. fluorescens biovar II	Fe (III), Cd(II), Cu(II), Ni(II), Pb(II), Zn(II), U(IV)	Joshi-Tope et al. (1995)
Pseudomonas stutzeri KC	As(III), Cd(II), Cr(IV), Hg(II)	Zawadska et al. (2007)
Pseudomonas sp. Ps-6	Cr (VI), Cu (II), Ni (II), Cd (II)	Singh et al. (2002)
Pseudomonas sp.	Li (I), Mn (II), Zn (II), Fe (III)	Vats et al. (2011)
Pseudomonas sp.	Cr(VI), Cu(II), Cd(II), Ni(II)	Hussain et al. (2004)

Chen et al. (2006) publikovali v roku 2006 štúdiu, v ktorej sledujú biosorpčnú kapacitu kmeňa *P. putida* CZ1, ktorý bol izolovaný z rhizosféry kontaminovanej pôdy v severnej oblasti provincie Zhejiang v Číne. U kmeňa bola najskôr overená jeho tolerancia voči účinkom kovov i vybraným antibiotikám, následne bol kmeň aplikovaný v procese biosorpcie medi a zinku. Kmeň *P. putida* CZ1 preukázal vysokú kapacitu pre adsorpciu oboch testovaných kovov, bol schopný odstrániť až 87,2 % Cu a 99,8 % Zn počas aktívneho rastového cyklu so špecifickou biosorpčnou kapacitou 24,2 $mg.l^{-1}$ a 26,0 $mg.l^{-1}$. V priebehu biosorpčných procesov však bolo sledované poškodenie povrchu niektorých buniek už pri nízkych koncentráciách kovov v adsorbáte. Vzhľadom k tomu, že uvedený kmeň preukázal rast v prítomnosti zvýšených koncentrácií iónov Cu a Zn, ako aj schopnosť vysokej adsorpcie oboch kovov v aeróbnych podmienkach, bola táto baktéria navrhnutá pre potenciálne použitie v bioreaktoroch, prípadne v procesoch bioremediácie *in situ* vo vodných alebo pôdnych ekosystémoch kontaminovaných uvedenými kovy.

Zaujímavá štúdia biosorpčných experimentov na neživej biomase rodu *Pseudomonas* bola publikovaná v roku 2004 (Hussain et al., 2004). V tejto práci boli popísané biosorpčné experimenty pre ióny Cr(VI), Cu(II), Cd(II) a Ni(II) s použitím rôznych druhov pseudomonád izolovaných z odpadových vôd. Pri porovnávaní reakčnej kinetiky biosorpcie bola zistená najrýchlejšia väzba u Ni(II), nasledovali ióny Cd(II), Cu(II) a Cr(VI). Dosiahnuté hodnoty odstránenia kovov z roztokov s využitím biosorpcie boli u Cr(VI) 38 % a zvyšovali sa s nárastom koncentrácie Cr v roztoku. Maximálne účinnosti pre odstránenie Cu(II) boli dosiahnuté v prítomnosti Cr(VI) ako binárneho kovu v roztoku (uvádzané sú hodnoty až do výšky 93 %). Pri iónoch Cd(II) a Ni(II) boli získané podobné pomery odstránenia, ktoré sa pohybovali v rozmedzí 35 – 88 %. Ich maximálne hodnoty však boli dosiahnuté pri oddelenej biosorpcii oboch kovov.

Získané zistenia potvrdzujú už skôr publikované výsledky (Chang a Hong, 1994; Figueira et al., 1997; Utigikar et al., 2000), ktoré potvrdzujú, že celkové množstvo adsorbovaného kovu v systéme s vyšším počtom kovov je nižšie, než je v systéme s jedným kovom.

Štúdia z roku 2007 popisuje biosorpciu iónov Cr(III), Cu(II), Mn(II) a Zn(II) s využitím baktérie *P. aeruginosa* AT18 izolovanej z lokality znečistenej ropnými produktami a ťažkými kovmi (Pérez et al., 2007). Výsledky získané v experimentálnych testoch ukázali, že kmeň AT18 má zaujímavé biosorpčné schopnosti, aj keď jeho kapacita pre sorpciu Mn^{2+} bola hodnotená ako nízka (22,39 $mg.g^{-1}$ biomasy) v porovnaní so sorpciou iónov Cr^{3+}, Cu^{2+} a Zn^{2+}. Najvyššia hodnota odstránenia bola sledovaná u chrómu, kde je uvádzaná až 100 % účinnosť pri pH 7 – 7,72.

Inou štúdiou, ktorá dokazuje aktivitu kmeňa *P. aeruginosa* pri biosorpcii kovov, je štúdia z roku 2013 (Nagashetti et al., 2013). Biosorpcia bola skúmaná na vzorkách pôd z oblasti Durgapur, West Bengal, ktoré boli zmiešané s rôznymi koncentráciami kovov – chrómom, meďou a zinkom (v úrovni $mg.kg^{-1}$), do ktorých bol následne inokulovaný bakteriálny kmeň. Po inkubácii boli kovy extrahované a porovnané s rôznymi štandardmi pomocou spektrofotometrickej a titračnej metódy. Experimentálne výsledky potvrdili, že baktéria *P. aeuruginosa* odstraňuje chróm efektívne, čo môže byť využité pri znižovaní záťaže prostredia priemyselnými odpadmi.

Zaujímavé sú štúdie týkajúce sa biosorpcie vzácnych kovov z vodných roztokov. Tsuruta (2004) popisuje vysoké schopnosti biosorpcie zlata u niektorých gramnegatívnych bakteriálnych kmeňov, medzi ktorými uvádza taktiež kmeň *P. aeruginosa* a *P. maltophilia*. Práve u bakteriálneho kmeňa *P. maltophilia* bola preukázaná vysoká adsorpčná schopnosť zlata, ktorá je ovplyvnená hodnotou pH roztoku, vstupnou koncentráciou zlata a množstvom imobilizovaných bakteriálnych buniek (zlato adsorbované na imobilizovaných bunkách je potom ľahko desorbované 0,1 M roztokom thiomočoviny). Autor uvádza, že imobilizované bunky kmeňa *P. maltophilia* môžu byť v biosorpčne-desorpčných systémoch opakovane použité.

V roku 2011 bol v Číne a USA patentovaný bakteriálny kmeň *P. alcaliphila* MBR CGMCC 2318 (Li et al., 2011) so širokou schopnosťou znižovať a adsorbovať kovové a nekovové ióny vrátane niektorých vzácnych a drahých kovov ako Au(I), Ag(I), Pd(II), Pt(0), Pt(II), Rh(III) a rádioaktívnych prvkov – U(IV) a Pu(IV). Predkladaný patent sa týka tiež bioredukčných a biosorpčných schopností uvedeného bakteriálneho kmeňa vrátane možnosti jeho praktických aplikácií v biohutníctve pri získavaní vzácnych kovov, pri čistení odpadových vôd s obsahom kovových iónov a pri odstraňovaní toxických kovov obsiahnutých v pôde a vo vode.

Biosorpcia ťažkých kovov pomocou mikrobiálnych buniek bola uznaná ako potenciálna alternatíva ku existujúcim technológiám, najmä pre využitie ťažkých kovov z priemyselných odpadov (Kapoor a Viraraghavan, 1995). Väčšina biosorpčných štúdií pre odstránenie kovov je

založená na využití buď laboratórne kultivovanej biomasy mikroorganizmov alebo na využití odpadovej biomasy vytvorenej pri procesoch farmakológie, potravinárskeho priemyslu alebo pri čistení odpadových vôd (Tsezos a Volesky, 1981; Townsley et al., 1986; Rome a Gadd, 1987; Macaskie, 1990; Costa a Leite, 1991; Rao et al., 1993). Biosorpcia kovových iónov môže poskytnúť atraktívnu alternatívu k používaným fyzikálno-chemickým metódam. Pri biologickom odstraňovaní iónov ťažkých kovov môže byť úspešne aplikovaná celá rada mikroorganizmov, ako sú baktérie, huby, kvasinky i riasy (Aksu et al., 1991; Paknikar et al., 1993; Volesky et al., 1993; Liu et al., 2004; Romera et al., 2006; Wang a Chen, 2009; Kaduková a Horváthová, 2012).

Bioakumulácia

Živé bunky akumulujú v priebehu svojho cyklu látky rôzneho typu. Majú taktiež vytvorené obranné mechanizmy proti toxickým látkam, ktorých príjem možu regulovať, alebo ich hromadiť a ukladať v podobe vnútrobunkových kompartmentov tak, aby nedochádzalo k poškodeniu fyziológie bunky (Alberts et al., 2003).

Bioakumulácia sa chápe ako schopnosť mikroorganizmov viazať a následne ukladať rôzne látky nielen vo vnútornom prostredí bunky, ale taktiež na jej povrchu. Preto možno chápať proces bioakumulácie ako dvojfázový proces: v prvej fáze dochádza k väzbe kovu (polokovu) na povrch bunky – táto fáza je nezávislá na bunkovom metabolizme a je v podstate totožná s mechanizmom biosorpcie. Druhú fázu tvorí aktívny, resp. pasívny prechod iónov kovov do vnútorného prostredia bunky (Chojnacka, 2010). Po prechode do vnútrobunkového prostredia sú ióny začlenené do prebiehajúcich metabolických a fyziologických procesov formou vnútrobunkovej sekvestrácie (tvorbou komplexov), kompartmentácie a vnútrobunkového transportu, rozkladných reakcií pomocou enzýmov, bunkovým vylučovaním, prípadne iných procesov na bunkovej úrovni.

V procesoch väzby chemických látok sa uplatňuje živá biomasa, preto je tento dej spojený len so schopnosťou metabolicky aktívnych buniek. Transport toxických prvkov do bunky môže byť sprostredkovaný rovnakými mechanizmami ako príjem esenciálnych iónov – draslíka, horčíka, sodíka a ďalších (Ahalya et al., 2003).

Väzba potenciálne toxických prvkov do makromolekúl vo vnútri buniek je súčasne efektívnym detoxikačným mechanizmom využívaným k zníženiu biologickej dostupnosti daného prvku alebo látky (Worms et al., 2006). Príkladom takejto sekvestrácie môže byť chelatácia, teda väzba molekúl kovu do stabilných komplexov. Dnes je už známa celá rada chelatačných činidiel, ktoré zabezpečujú tvorbu komplexov, a tým sa aktívne podieľajú na ochrane bunky – napríklad

aminokyseliny (prolín, cysteín, histidín), ktoré môžu tvoriť komplexy kovov v cytosole (Mohapatra et al., 1997).

Bioakumulačný potenciál bol sledovaný u bakterií rodu *Pseudomonas,* ktoré boli izolované z pôdnych i vodných vzoriek odobratých zo znečistenej priemyselnej oblasti. Výsledky štúdie (Krishna et al., 2012) preukázali, že s nárastom biomasy kmeňa *Pseudomonas* sp. Dochádza k zvýšeniu odstránenia kadmia zo vzoriek, zníženie kovu bolo pozorované už v prvý deň experimentu. Štúdia uvádza, že najlepšie výsledky boli dosiahnuté po 74 hod. experimente, kedy bol zistený úbytok Cd vo vzorkách o 40 %. Výsledky potvrdili, že bakteriálne izoláty z kontaminovaných ekosystémov majú potenciál pre bioakumuláciu a sú vhodným kandidátom pre využitie v bioremediačných procesoch.

Zaujímavú štúdiu o bioakumulácii striebra uverejnil v roku 2001 časopis Brazilian Archives of Biology and Technology (Ibrahim et al., 2001). Kmeň *Pseudomonas diminuta*, pôvodom z banského prostredia v Malajzii (Ibrahim, 1993), bol kultivovaný v nutričnom médiu s obsahom iónov striebra (50 mM). Zistilo sa, že bunky tohto kmeňa majú vysokú schopnosť absorpcie striebra už v priebehu skorej exponenciálnej fázy, a to v porovnaní s adsorbovaným množstvom viazaného kovu na povrchu buniek. Realizované boli taktiež pokusy s izoláciou proteínov, ktoré by mohli byť spojené s väzbovými vlastnosťami iónov Ag. Proteíny boli najskôr extrahované z bakteriálnych kultúr zrážaním síranom amónnym a následne identifikované pomocou metódy SDS-PAGE. Výsledky experimentu preukázali prítomnosť špecifických proteínov s nízkou ako aj vysokou molekulovou hmotnosťou, ktoré obsahujú striebro, a ktoré sú kľúčové pre detoxikačné procesy umožňujúce prežitie baktérií v prítomnosti strieborných iónov.

Biovolatilizácia

Transformačné procesy majú geochemickú významnosť, ktorou môžu meniť mobilitu a toxicitu polokovov a využiť biotechnologický potenciál v bioremediácii (Lovley, 1993). Kým biosorpcia je mechanizmus imobilizácie (polo)kovov biomasou, biovolatilizácia zvyšuje ich mobilitu v prostredí prostredníctvom enzymatickej premeny anorganických alebo organických zložiek kovov (polokovov) na ich prchavé deriváty cez intracelulárnu biochemickú reakciu, ktorá je známa ako biometylácia (Cullen a Reimer, 1989; Michalke et al., 2000; Stýblo et al., 2002). Metylácia kovov v bunkách je prirodzený dej, ktorý môže probiehať niekoľkými biochemickými procesmi. Volatilizované a hydrogenované deriváty kovov a polokovov sa často nachádzajú v plynoch uvoľňovaných z prírodného i antropogénneho prostredia. Hlavnými činiteľmi biovolatilizácie v prírodnom prostredí sú baktérie a mikroskopické vláknité huby. Z hľadiska biogeochemického cyklu má volatilizácia významný vplyv na mobilitu a distribúciu prvkov

v prírodnom prostredí (Gadd, 2010). Metylácia Hg, As, Se, Sn, Te a Pb môže byť sprostredkovaná radom baktérií a húb v aeróbnych aj anaeróbnych podmienkach (Gadd, 2004).

Vzhľadom k stúpajúcej antropogénnej záťaži prostredia patrí ortuť v súčasnej dobe k najviac sledovaným prvkom z hľadiska biovolatilizácie. Biometyláciou sa zvyšuje jej rozpustnosť v tukoch, a tým taktiež jej možnosť bioakumulácie v tkanivách živočíšnych organizmov, vrátane človeka. Dnes je známa celá rada aeróbnych i anaeróbnych mikroorganizmov schopných jej volatilizácie (Cursino et al., 2000; Takeuchi et al., 2001) a doposiaľ publikované štúdie naznačujú, že viac než 90 % metylovanej ortuti v prírode je spojené s biologickou aktivitou mikroorganizmov (Berman a Bartha, 1986). Napríklad metylácia ortuti sulfát-redukujúcimi a železo-redukujúcimi baktériami prebieha prostredníctvom metylkobalamínu (Kerin et al., 2006), ktorý poskytuje k metylácii skupinu CH_3^- . Úloha metylkobalamínu ako metylačného činidla bola preukázaná taktiež pri metylácii cínu a ďalších kovov (Mason, 2012).

Selén je pomerne ľahko metylovaným prvkom. Mikrobiálna transformácia anorganických zlúčenin selénu do prchavých organických a anorganických derivátov je dôležitým článkom v biogeochemickom cykle tohto prvku. Súčasne však môže predstavovať účinný mechanizmus pri dekontaminácii znečistených pôd, sedimentov i vôd (Thompson-Eagle et al., 1989; Karlson a Frankenberger, 1990; Stork et al., 1999). Pri metylácii selénu sa uplatňuje metylová skupina vo forme CH_3^+ (ako aj pri As), pochádzajúca z S-adenosyl-metionínu či N-methyl-tetrahydrofolátu (Mason, 2012). Hlavným metabolitom metylácie selénu mikroorganizmami je dimetylselenid, ktorý je menej toxický ako seleničnany a selénany a vďaka vysokej prchavosti sa ľahko vylúči z bakteriálnych buniek (Frankenberger a Benson, 1994).

Prehľad prvkov podliehajúcich biovolatilizácii a ich známe formy metylovaných derivátov v životnom prostredí uvádza tab. 19 (upravené podľa Mason, 2012).

Tab. 19 Prehľad prvkov podliehajúcich biovolatilizácii a ich metylovaných zlúčenín

Prvok	Metylované zlúčeniny
As	$(CH_3)_4As_2$, $(CH_3)_3As$, $(CH_3)_3AsO$, $(CH_3)_2AsH$, $(CH_3)AsH_2$, $(CH_3)AsO(OH)$
Cd	$(CH_3)_2Cd$, CH_3Cd^+
Bi	$(CH_3)_3Bi$, $(CH_3)_2BiH$, CH_3BiH_2, $(CH_3)_2BiH^+$, CH_3Bi^{2+}
Ge	$(CH_3)_3GeH$, $(CH_3)_2GeH_2$, CH_3GeH_3, $(CH_3)_2Ge^{2+}$, CH_3Ge^{3+}
Te	$(CH_3)_2Te$
Pb	$(CH_3)_4Pb$, $(CH_3)_3PbH$
Sb	$(CH_3)_3Sb$, $(CH_3)_3SbO$, $(CH_3)_2SbH$, CH_3SbH_2
Hg	$(CH_3)_2Hg$, $(CH_3)Hg^+$, $(CH_3)HgH$
Se	$(CH_3)_2Se_2$, $(CH_3)_2Se$, $(CH_3)_2SeS$, $(CH_3)_2SeH$
Sn	$(CH_3)_4Sn$, $(CH_3)_3SnH$, $(CH_3)_2SnH_2$, CH_3SnH_3
Te	$(CH_3)_2Te^+$

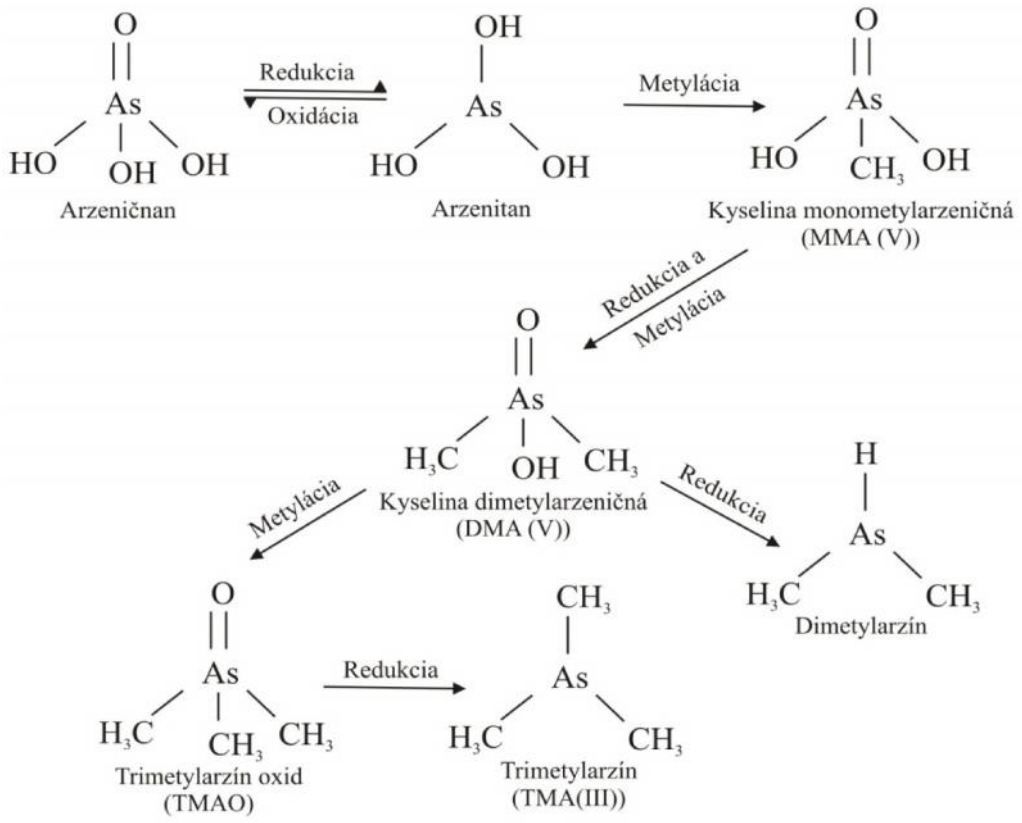
Metylácia a hydrogenácia kovov a polokovov pomocou mikroorganizmov sú známe a rozšírené procesy v prírodnom prostredí, ktoré výraznou mierou prispievajú k ich mobilite a vo väčšine prípadov taktiež znižujú ich toxicitu. Uvedených biotransformácií je schopná taktiež mikrobiocenóza ľudských čriev (Diaz-Bone a Van de Wiele, 2009).

Biovolatilizácia arzénu

Biovolatilizácia arzénu je prirodzený proces, ktorý sa vyskytuje v prírodných a antropogénnych prostrediach, kde sú mikroorganizmy rozšírené a geochemicky reaktívne zložky (Visoottiviseth a Panviroj, 2001; Turpeinen et al., 2002). Činnosťou mikroorganizmov dochádza k vzniku prchavých anorganických a organických foriem arzénu (najmä arzínu, mono-, di-, a trimetylarzínu), ktoré sa uvoľňujú zo substrátu (pôdy, sediment) do atmosféry, kde sú veľmi rýchlo oxidované, demetylované a následne rozptýlené vzdušnými prúdmi (Craig, 2003). Toxicita rôznych foriem As sa znižuje v rade: arzín > anorganický arzenitan > organický arzenitan > anorganický arzeničnan > organický arzeničnan > voľný arzén (Mandal a Suzuki, 2002) a závisí od rôznych faktorov ako je: skupenstvo (plyn, roztok), veľkosť častíc, rýchlosť adsorpcie bunkou, rýchlosť vylučovania atď. (Anderson a Cook, 2004).

Počas procesu biometylácie dochádza k premene anorganických kovov a polokovov na organické formy, prostredníctvom ktorých dochádza k zmene mobility, toxicity a biologickej prístupnosti (polo)kovov. Vzniknuté organické zlúčeniny tak môžu byť prchavé alebo neprchavé (zväčša dobre rozpustné). Prchavé zlúčeniny sa uvoľňujú z buniek a v procese biovolatilizácie sú uvoľňované do atmosféry. Anorganický arzeničnan alebo arzenitan sa naviazaním jednej metylovej skupiny môže meniť na kyseliny ako napr. kyselina monometylarzenitá (MMA (III)) alebo monometylarzeničná (MMA (V)) alebo prchavý monometylarzín (CH_3AsH_2). Ak sa naviažu dve metylové skupiny, vznikajú kyseliny dimetylarzenitá ((DMA (III)) alebo dimetylarzeničná (DMA (V)) alebo prchavý dimetylarzín $(CH_3)_2AsH$. Väzbou 3 metylových skupín vznikajú prchavé zlúčeniny trimetylarzín oxid (TMAO) alebo trimetylarzín $(CH_3)_3As$ (obr. 19). Proces biometylácie arzénu sa nazýva taktiež Challengerov mechanizmus biometylácie, podľa objaviteľa (Henke a Hutchison, 2009).

Toxicita a chemické správanie zlúčenín arzénu sú ovplyvnené formou a špeciáciou As. Plynné arzíny sú najtoxickejšie, zatiaľ čo arzenobetaín a arzenocholín (nájdený hlavne v morských organizmoch) sú netoxické. Anorganické zlúčeniny arzénu sú toxickejšie ako organické formy arzénu a trojmocný oxidačný stav je toxickejší než päťmocný oxidačný stav (Fowler, 1977; Adriano, 2001).



Obr. 19 Mikrobiálny proces biometylácie arzénu (Challenger, 1945; Cervantes et al., 1994; Bentley a Chasteen, 2002)

Schopnosť transformovať arzén z anorganických a metylovaných zlúčenín na prchavý trimetylarzín procesom redukčnej metylácie bola zistená u niekoľkých húb: *Aspergillus glaucum*, *Candida humicola*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Gliocladium roseum*, *Penicillium gladioli* a *Fusarium* sp. (Cullen a Reimer, 1989; Lin, 2008 in Srivastava et al., 2011).

Podľa štúdie Čerňanský et al. (2007) bola najefektívnejšia biovolatilizácia arzénu pozorovaná v termorezistentných vláknitých hubách rodu *Neosartorya fischeri*, kým biotransformácia arzénu na prchavé formy bola približne dvojnásobne nižšia pre netermorezistentný rod *Aspergillus niger*. Biovolatilizácia arzénu prostredníctvom *Talaromyces wortmannii*, *T. flavus*, *Eupenicillium cinnamopurpureum* bola zanedbateľná.

Biovolatilizácii arzénu mikroskopickými hubami sa venovali aj Urík et al. (2007). Kmene húb pochádzali resp. boli izolované z miest s vysokou kontamináciou arzénu. Autori skúmali kmene húb v laboratórnych podmienkach s cieľom zhodnotiť možnosť aplikácie vláknitých húb v bioremediáciách v substrátoch kontaminovaných arzénom. Izolované a identifikované druhy boli mikroskopické vláknité huby *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* a *Penicillium glabrum*. Metabolická transformácia arzénu na prchavé formy bola pozorovaná

vo všetkých kmeňoch húb. K najaktívnejším As-biovolatilizujúcim mikroorganizmom patrili *Penicillium glabrum* a *Aspergillus niger* B. Autori taktiež pozorovali, že množstvo prchavého arzénu závisí od počiatočnej koncentrácie v živnom médiu. So zvyšujúcou počiatočnou koncentráciou arzénu bola pozorovaná vyššia schopnosť húb biovolatilizovať arzén. Z výsledkov sa dá predpokladať, že vyššia koncentrácia arzénu, v súvislosti s jeho toxicitou, vedie k intenzívnejšej metabolickej aktivite húb vytvárať prchavé formy arzénu.

Žiadne významné rozdiely v biovolatilizácii trojmocného a päťmocného arzénu v laboratórnych podmienkach neboli pozorované kolektívom Čerňanský et al. (2009). Priemerné množstvá prchavého arzénu vo všetkých kmeňoch húb boli v rozmedzí 0,026 – 0,257 mg As (III) a 0,024 – 0,191 mg As (V). Približne 23 % arzénu vyprchalo z kultivačných médií obohatených trojmocným As v koncentráciách 4 a 17 $mg.l^{-1}$. Priemerné množstvo biovolatilizovaného arzénu z kultivačného média obohateného o 4 $mg.l^{-1}$ As v päťmocnej forme bolo 24 %, a pri koncentrácii 17 $mg.l^{-1}$ sa uvoľnilo 16 % arzénu. Schopnosť biovolatilizácie arzénu klesala v poradí: *Neosartorya fischeri* > *Aspergillus clavatus* > *Aspergillus niger*. Väčší význam v znížení biovolatilizácie, v porovnaní s valenciou, má skôr počiatočná koncentrácia arzénu. Visoottiviseth a Panviroj (2001) pozorovali, že extrémne arzén-rezistentný druh rodu *Penicillium* spp. je schopný volatilizovať počas kultivácie 25,82 – 43,94 μg arzénu. Biovolatilizácia As bola dokázaná u rôznych kmeňov húb ako je *Penicillium* sp. (Visoottiviseth a Panviroj, 2001) a *Scopulariopsis brevicaulis* (Pearce et al., 1998). *A. niger* kmeň B je jedným z najúčinnejších kmeňov schopných biovolatilizovať As pri koncentrácii arzeničnanov 5 – 20 $mg.l^{-1}$ (Urík et al., 2007). Rýchlosť tvorby prchavého As z pôd kontaminovaných As a DDT zvýšili Edvantoro et al. (2004) augmentáciou druhmi *Penicillium* sp. a *Ulocladium* sp.

Organická hmota poskytuje zdroj metyl-donorov pre biometyláciu aj abiotickú metyláciu, no biologická metylácia je považovaná za dominantný proces v pôdach a vodných prostrediach, ktorý vedie k detoxifikácii (polo)kovov. Metylované deriváty môžu byť ľahko vylučované z buniek, sú často prchavé a môžu byť menej toxické. Mikroorganizmy v pôde a v sedimentoch pôsobia ako biologicky aktívni metylátori (Frankenberger a Arshad, 2001; Bolan, 2004; Loseto et al., 2004). Mohapatra et al. (2008) aplikovali do kalu kravský trus, ktorý bol použitý ako substrát pre rast baktérií počas volatilizácie As metanogénnymi baktériami. Pri koncentrácii trusu 25 $g.l^{-1}$ volatilizovalo okolo 35 % As. Vyššia koncentrácia substrátu znižovala množstvo volatilizovaného As, čo môže byť v dôsledku vzniku metánu, ktorý inhibuje vyššie dávky arzénu a vedie k vytvoreniu neprchavých látok. Až 16 % arzénu bolo pripočítaných k mikrobiálne sprostredkovanej volatilizácii po aplikovaní kompostu do pôdy znečistenej arzénom, meďou a chrómom (Cao et al., 2003). Detoxifikácia bola spôsobená pravdepodobne kvôli zvýšenému rastu huby v prítomnosti kompostu, ktorý mohol hube poskytovať ďalší zdroj uhlíka. Gao

a Burau (1997) obohatili pôdu o celulózu a mikrobiálna redukcia a metylácia viedli k volatilizácii As za vzniku arzínov. Pretože mikroorganizmy zohrávajú dôležitú úlohu ako v redukčných tak aj metylačných reakciách, prídavok organických zlúčenín preukázane zvýšil stratu (polo)kovov volatilizáciou (Park et al., 2011).

Mikrobiálna metylácia arzénu na jeho prchavé formy účinne znižuje jeho toxicitu v pôde. Keďže volatilizácia As mikroorganizmami závisí od obsahu živín a mikrobiálneho rastu (Sanford a Klein, 1988) a aplikácia kompostu zvyčajne zvyšuje mikrobiálne populácie a činnosť v pôde, predpokladá sa, že organická hmota by mohla mať pozitívny vplyv na metyláciu As, no pred prípadnou aplikáciou organických doplnkov je vhodné overiť pre každý typ pôdy mobilizáciu a imobilizáciu ťažkých kovov a arzénu.

Keďže biovolatilizácia As je prírodný proces v prostredí, ktorým sa As stráca z pôdy alebo vody (Jakob et al., 2010), môže byť považovaný za jedným z nástrojov bioremediácie a spolu s ďalšími mikrobiálnymi procesmi ako sú oxidácia, redukcia, alkylácia, dealkylácia predstavuje významné procesy, ktoré ovplyvňujú prchavosť, mobilitu, toxicitu a bioprístupnosť arzénu v prostredí (Čerňanský et al., 2009).

Biolúhovanie

Biolúhovanie predstavuje proces, ktorým dochádza k "rozpúšťaniu kovov z ich minerálneho zdroja určitými prirodzene sa vyskytujúcimi mikroorganizmami" alebo "taká premena prvkov pôsobením mikroorganizmov, že tieto prvky môžu byť extrahované z materiálu pri kontakte s vodou“ (Atlas a Bartha, 1997). Transformácia prebieha cez produkciu organických a anorganických kyselín, ktoré spôsobujú rozpustnosť a extrahovateľnosť prvkov. Biolúhovanie možno považovať za príklad čistej technológie, ktorá je spojená s nízkymi nákladmi a energetickými požiadavkami v porovnaní s nebiologickými procesmi (Krebs et al., 1997). Procesy biolúhovania sú úspešne aplikované pre odstraňovanie ťažkých kovov z rúd, sedimentov, banských hlušín, priemyselných odpadov a čistiarenských kalov (Acevedo a Gentina, 1989; Blais et al., 1993; Seidel et al., 1998; Chen a Lin, 2000; Solisio et al., 2002; Rodríguez et al., 2003; Groudeva et al., 2007; Liu et al., 2007; Pathak et al., 2009; Rehman et al., 2009). Účinky baktérií a húb na minerály sú založené na troch princípoch: acidolýza, komplexolýza a redoxolýza. Mikroorganizmy sú schopné mobilizovať kovy tvorbou organických alebo anorganických kyselín (protóny), oxidačnými a redukčnými reakciami a vylučovaním komplexotvorných činidiel (Brandl, 2008). Kovy môžu byť lúhované priamo (fyzický kontakt medzi mikroorganizmami a pevným materiálom) alebo nepriamo (bakteriálna oxidácia Fe^{2+} na Fe^{3+}, ktorá katalyzuje rozpúšťanie kovu ako prenášač elektrónu) (Brandl et al., 1997).

Medzi hlavné fyzikálno-chemické parametre biolúhovaného prostredia patrí: teplota, hodnota pH, redox potenciál, vlhkosť, dostupnosť a obsah kyslíka, obsah CO_2, pohyb hmoty, dostupnosť živín, koncentrácia Fe(III), svetlo, tlak, ťažké kovy, povrchové napätie, veľkosť častíc, prítomnosť inhibítorov a doba biolúhovania. K mikrobiologickým parametrom biolúhovaného prostredia patrí: mikrobiálna diverzita, hustota populácie, mikrobiálne aktivity, priestorová distribúcia mikroorganizmov, tolerancia voči kovom a adaptačné schopnosti mikroorganizmov (Acevedo a Gentina, 1989; Bosecker, 1997, Brandl, 2008; Rehman et al., 2009).

Na biolúhovaní (často sa používa aj výraz „biooxidácia“, ktorý popisuje mikrobiálne indukované oxidácie minerálov obsahujúce zlúčeniny kovov vedúce k ich uvoľneniu (Hansford a Miller, 1993)) a následnom uvoľnení potenciálne toxických prvkov sa môžu podieľať rôzne druhy mikroorganizmov, ktoré zintenzívňujú biochemické procesy v mechanicky rozrušených horninách na haldách a odkaliskách (Edwards et al., 2000). Najstaršie biolúhovacie experimenty využívali aktivitu acidofilných baktérií, predovšetkým z rodu *Acidithiobacillus* (predtým rod *Thiobacillus*) (Colmer a Hinkle, 1947; Zimmerley et al., 1958) pri získavaní kovov zo sulfidických minerálov, keďže tieto baktérie premeňajú nerozpustné kovové sulfidy na rozpustné sírany. Neskôr bolo skúmané taktiež biolúhovanie nesulfidických materiálov a získavanie kovov z priemyselných odpadov rôzneho typu. Prehľad publikovaných mikroorganizmov so schopnosťou bakteriálneho lúhovania sulfidov základných kovov uvádza tab. 20.

Tab. 20 Využitie bakteriálnych mikroorganizmov v procesoch biolúhovania kovov zo sulfidov (kremičitanov, bauxitu)

Prvok	Forma výskytu	Mikroorganizmus	Zdroj
As	sulfidy	*Acidithiobacillus, Sulfolobus* *Leptospirillum ferrooxidans*	Schippers a Sand (1999) Kušnierová a Fečko (2001)
Au	sulfidy	*Acidithiobacillus ferrooxidans*	Gonzalez et al. (2004)
Cd	sulfidy	*Acidithiobacillus thiooxidans*	Liu et al. (2003)
Cu	sulfidy	*Acidithiobacillus ferrooxidans*	Lilova et al. (2007)
Fe	sulfidy kremičitany	*Acidithiobacillus caldus* *Leptospirillum ferriphilum*	Schippers a Sand (1999) Johnson (2008)
Mn	sulfidy	*Leptospirillum ferrooxidans*	Sand et al. (1992)
Ni	sulfidy	*Acidithiobacillus caldus*	He et al. (2009)
Pb	sulfidy	*Acidithiobacillus ferrooxidans*	Jang et al. (2008)
Sb	sulfidy	*Acidithiobacillus ferrooxidans,* *Acidithiobacillus thiooxidans,* *Stibiobacter senarmontii*	Andráš et al. (2004) Lyalikova et al. (1976) Kušnierová a Fečko (2001)
Si	bauxity	*Paenibacillus polymyxa* silikátové baktérie	Vasan et al. (2001)
U	sulfidy	*Ferrobacillus* sp.	Dwivedy a Mathur (1995)
Zn	sulfidy	*Acidithiobacillus caldus*	Semenza et al. (2002)

Aplikácia húb v remediácii pôdy kontaminovanej toxickými prvkami a zlúčeninami pomocou biolúhovania získava čoraz väčší záujem, pretože huby sú všadeprítomné v prirodzenom prostredí a sú často dominantnými organizmami v mnohých pôdach, najmä v tých s nízkymi hodnotami pH, kde je mobilita kovov zvýšená. Predovšetkým ide o mikroskopické vláknité huby, ktoré môžu byť pestované na mnohých rôznych podkladoch, ako napr. antropogénne sedimenty, elektronický odpad či popolček zo spaľovania komunálneho odpadu (Kolenčík et al., 2011a; Kolenčík et al., 2013). Dôležitou úlohou v bioremediácii prostredia je ich schopnosť rozpúšťať a prijať kovy. Tieto procesy sú neoddeliteľnou súčasťou rastu húb a metabolizmu v prírodných, laboratórnych a priemyselných prostrediach (Gadd, 1993; Gadd et al., 1993; Gadd a White, 1993; Burgstaller et al., 1992). Huby dokážu významne ovplyvňovať dynamiku ťažkých kovov v pôde vďaka vysokému podielu mikrobiálnej biomasy v pôde, veľkému pomeru povrch : objem a vysokej metabolickej aktivite (Sosak-Swiderska, 2010). V porovnaní s bakteriálnym lúhovaním, má lúhovanie použitím húb niekoľko výhod: schopnosť rásť pri vyššej hodnote pH, uprednostňované je biolúhovanie alkalických odpadov, všeobecne rýchlejší proces lúhovania s kratšou lag fázou a schopnosť vylučovať metabolity (napr. organické kyseliny) za vzniku komplexov s iónmi kovov a tým znižovať toxicitu metabolitov pre biomasu. Nízka hodnota pH podporuje acidolýzu (základný mechanizmus v procese biolúhovania použitím *A. niger*) a je nasledovaná uvoľnením a zvýšenou mobilitou voľných katiónov kovov protonizáciou (Burgstaller a Schinner, 1993; Rezza et al., 2001). Na rozdiel od baktérií sú huby schopné rozšíriť ich biomasu prostredníctvom rastu hýf, rásť pod stresovými podmienkami prostredia, ako sú nízka dostupnosť živín, nízky obsah vody a pri nízkych hodnotách pH, kde bakteriálny rast môže byť obmedzený (Davies a Westlake, 1979). Huby sú taktiež schopné degradovať a utilizovať širokú škálu rôznych prírodných substrátov ako celulózu, hemicelulózu, lignín a pektín. Schopnosť degradovať tieto látky súvisí s produkciou extracelulárnych enzýmov s relatívne nízkou substrátovou špecifitou (Demnerová a Macková, 2006). Huby môžu akumulovať kovy a rádionuklidy prostredníctvom fyzikálno-chemických a biologických mechanizmov, ku ktorým patrí extracelulárne viazanie prostredníctvom metabolitov a biopolymérov, viazanie na špecifické polypeptidy a akumulácia závislá od metabolizmu (Tobin et al., 1994). Vytvorené komplexy kovov môžu v závislosti od podmienok prostredia následne precipitovať, resp. tvoriť kryštalické formy. Vznik a tvorba sekundárnych mykogénnych kryštalických foriem má fyzikálno-chemický vplyv na biologickú dostupnosť a mobilitu viazaných kovov, na ich toxicitu rovnako ako na ich chovanie v prostredí (Gorbushina et al., 2003; Gadd, 2007; Kolenčík et al., 2011b; Kolenčík et al., 2012). Zafar et al. (2007) pozorovali, že huby sú schopné tolerovať, biosorbovať a detoxifikovať kovy niekoľkými mechanizmami zahŕňajúcimi zmenu oxidačného stavu, extra a intracelulárne zrážanie a aktívny príjem.

Huby okysľujú živné médium počas rastu organickými zlúčeninami (vylučovaním protónov, absorpciou živín vo výmene za protóny, vylučovaním organických kyselín, acidifikáciou cez produkciu CO_2). Podstatou mechanizmu biolúhovania minerálnych substrátov mikroskopickými vláknitými hubami sú protolytické, komplexotvorné, prípadne redoxné reakcie (Burgstaller a Schinner, 1993). Reakcie prebiehajú za účasti mikrobiálnych metabolitov, ktoré tvoria anorganické i organické kyseliny, viažuce uvoľnené ióny kovov (Gadd, 2004) a ich bioakumulácii mycéliami (Gholami, 2011). Druh, množstvo a koncentrácia organických kyselín vylučovaných hubami závisí na rôznych faktoroch ako sú: pufračná kapacita živného média, hodnota pH, pomer dusíka a fosforečnanov v médiu, zdroj uhlíka a prítomnosť niektorých ťažkých kovov a stopových prvkov v živnom médiu a od experimentálnych podmienok rastu húb (Bosshard et al., 1996; Gadd a Sayer, 2000). Všetky vláknité huby patriace do skupiny *Zygomycetes* (Madigan et al., 2000), obsahujú na ich bunkovej stene N-acetyl polymér, chitín, chitosan a deacetylovaný glukózo-amín, čím poskytujú množstvo potenciálnych väzbových miest vďaka voľným hydroxylovým, amino- a karboxylovým skupinám. Amino-skupina (obsahuje atóm dusíka) a hydroxylová skupina (obsahuje atóm kyslíka) majú schopnosť viazať protón alebo ión kovu (Das et al., 2007).

Niektoré druhy heterotrofných mikroorganizmov, ako je napr. rod *Aspergillus* alebo *Penicilium*, majú schopnosť vylučovať veľké množstvo organických kyselín (Burgstaller a Schinner, 1993). Xu a Ting (2004) zistili nadpriemerné biolúhovanie Al, Fe a Zn z polietavého popola použitím *Aspergillus niger*. Santhiya a Ting (2005) skúmali biolúhovanie vyhoreného katalyzátora z rafinérskeho spracovania použitím *A. niger* s vysokou produkciou kyseliny šťaveľovej. Prítomnosť použitého katalyzátora spôsobila zníženie výťažku biomasy a zvýšenie sekrécie kyseliny šťaveľovej. Zvýšenie sekrécie kyseliny šťaveľovej so znížením veľkosti častíc katalyzátora (< 37 μm) viedlo k zvýšenému biolúhovaniu kovov. Produkcia kyseliny šťaveľovej voľne žijúcimi a symbiotickými hubami môže viesť k vyzrážaniu nerozpustných oxalátov kovov, proces, ktorým huby dokážu prežiť v prítomnosti potenciálne toxických zlúčenín kovov. Mechanizmy biolúhovania *A. niger*, *P. simplicissimum*, *P. purpurogenum* súvisia s produkciou nízko molekulárnych metabolitov, hlavne organických kyselín, ako je glukónová, pyrohroznová, citrónová, šťaveľová, jablčná a jantárová (Amiri et al., 2011; Ren et al., 2009). Ren et al. (2009) skúmali biolúhovanie ťažkých kovov z kontaminovaných pôd v industriálnom území metabolitmi, hlavne slabými organickými kyselinami produkovanými inokulovaným *A. niger*. Výsledky sekvenčnej extrakcie ukázali, že organické kyseliny produkované druhom *A. niger* boli účinné v odstránení vymeniteľnej a uhličitanovej frakcie a oxidov Fe/Mn v prípade Cu, Cd, Pb, Zn a zostávajúce kovy v pôde boli viazané hlavne v stabilnej frakcii. Podľa Gholami et al. (2011) bolo biolúhovanie Al, Co, Mo a Ni v prítomnosti *A. niger* a *P. simplicissimum* približne 20 - 30 % vyššie ako v lúhovaní bez aplikácie druhov, najmä v prípade Co, ktorého vylúhovateľnosť bola až

o 70 % vyššia ako v kontrolnom experimente. Súčasne nárast koncentrácie kyseliny glukónovej a kovov (v prípade *A. niger*) a kyseliny citrónovej a kovov (v prípade *P. simplicissimum*) priamo indikujú dôležitú úlohu kyselín v biolúhovacích procesoch. Aung a Ting (2005) skúmali použitie *A. niger* v biolúhovaní ťažkých kovov z vyhoreného katalyzátora (spent catalyst). Chemické lúhovanie bolo realizované použitím minerálnych kyselín (sírová, dusičná) a organických kyselín (citrónová, šťaveľová, glukónová) ako aj ich zmesi v rovnakých koncentráciách ako sú biologicky produkované. Biolúhovaním sa extrahovalo viac kovov ako chemickým lúhovaním. Mulligan et al. (2004) sa venoval biolúhovaniu ťažkých kovov z nízkokvalitnej rudy použitím *A. niger*. Účinnosť organických kyselín bola zvýšená, keď sa do média pridala kyselina sírová. Braud et al. (2006) uvádzajú zvýšenú extrahovateľnosť kovov z kontaminovaných pôd bioaugmentáciou baktérií (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*) alebo húb (*Aspergillus niger*).

Biolúhovanie taktiež môže zmeniť mineralógiu materiálu, čím mení jeho reaktivitu a kryštalinitu (De Windt a Devillers, 2010). Predpokladá sa, že prostredníctvom extrakcie a opätovnému zrážaniu alkalických zložiek (napr. Ca, Mg, Si) môže biolúhovanie zvýšiť pórovitosť materiálu, zvýšiť špecifický povrch, zmeniť minerálne zloženie lúhovaného materiálu a produkovať nanočastice (Kulkarni et al., 2008; Santos a Van Gerven, 2011; Wang et al., 2011). Chiang et al. (2013) skúmali účinok biolúhovania vybraných druhov baktérií (*Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mucilaginosus*, *Sporosarcina ureae*) a húb (*Aspergillus niger*, *Humicola grisea*, *Penicillium chrysogenum*) na chemické, minerálne a morfologické vlastnosti prírodných a odpadových alkalických materiálov. Biolúhovaním mikroorganizmami došlo k zmene minerálneho zloženia a morfológie materiálov (zvýšenie špecifického merného povrchu). Tento výsledok bol pripísaný pôsobeniu organických kyselín (hlavne kyseliny glukónovej) a exopolysacharidom. Mikroorganizmy (baktérie a huby), ktoré sú schopné odolávať alkalickému prostrediu, produkujú organické kyseliny a exopolysacharidy (EPS), ktorými urýchľujú rozpúšťanie kremičitých materiálov (Vandevivere et al., 1994). Mulligan et al. (2004) považujú acidolýzu za hlavný mechanizmus biolúhovania u *Aspergillus niger*, zatiaľ čo tvorba exopolysacharidov bola zistená u *Bacillus mucilaginosus* (Welch et al., 1999). Významné zmeny väzby ťažkých kovov pred a po biolúhovaní odkaliskového sedimentu autochtónnymi baktériami uvádzajú Liu et al. (2007). Po biolúhovaní zostávali kovy prítomné taktiež hlavne v stabilnej frakcii pre okolité prostredie.

Proces biolúhovania, v ktorom sú mikroorganizmy schopné acidifikovať svoje prostredie, čo vedie k rozpúšťaniu ťažkých kovov, je jednou zo sľubných metód pre odstraňovanie ťažkých kovov z kontaminovaných sedimentov. Použitie organických kyselín redukuje náklady komerčnej dekontaminácie ťažkých kovov a znižuje akékoľvek environmentálne impakty vyplývajúce z kontaminácie kovmi (King a Dudeney, 1987; Strasser et al., 1994; Dronawat et al.,

1995; Grewal a Kalra, 1995; Legisa a Gradisnik-Grapulin, 1995; Wasay et al., 2001; Mulligan et al., 2004; Aung a Ting, 2005; Santhiya a Ting, 2005, 2006; Ren et al., 2009). Wassay et al. (2001) porovnávali účinnosť solí slabých organických kyselín (citrát, tartrát, šťaveľan + citrát) so silnými chelatačnými činidlami (EDTA a DTPA) lúhovať ťažké kovy v kolónach v troch pôdach s rôznou textúrou, ktoré boli znečistené ťažkými kovmi (Cr, Mn, Hg, Pb, Cd, Cu, Zn). EDTA a DTPA síce účinne odstraňovali všetky ťažké kovy, s výnimkou Hg, ale taktiež extrahovali veľké množstvo pôdnych živín a znečistili pôdu adsorpciou na pôdne častice. Citráty a tartráty účinne odstránili ťažké kovy zo všetkých troch znečistených pôd, lúhovali malé množstvo makronutrientov a zlepšili pôdnu štruktúru.

Biologické lúhovanie je vo svete stále viac využívané k extrakcii kovov z odpadových materiálov a koncentrátov po spracovaní rúd, ktorých spracovanie konvenčnými metódami je neekonomické, a ktoré často obsahujú eště významné množstvá kovov. Jednou z možných aplikácií je biohydrometalurgia, ktorá sa dnes uplatňuje pri získavaní medi, zinku, olova, arzénu, antimónu, niklu, molybdénu, zlata, striebra, kobaltu i ďalších kovov. Vzhľadom ku schopnosti niektorých mikroorganizmov previesť kovy do ľahko rozpustných foriem, možno mikrobiálnu aktivitu úspešne využiť taktiež pri získavaní kovov z kontaminovaných odpadových materiálov a z metalurgických odpadov.

Biokryštalizácia a biomineralizácia

Biomineralizácia je proces, v ktorom mikróby sprostredkúvajú biochemické reakcie pri formovaní novej minerálnej asociácie na pevných matriciach (EPA 2003) a tiež pri ktorom mikroorganizmy katalyzujú a sprostredkúvajú anorganické reakcie (EPA 2000). Táto metóda sa vzťahuje na procesy, ktorými organizmy tvoria minerály. Avšak, schopnosť mnohých organizmov tvoriť minerály sa odlišuje od abiotického procesu mineralizácie (Weiner a Dove, 2003). Biomineralizácia je opísaná ako povrchový proces súvisiaci s bunkovými stenami mikroorganizmov, kde dochádza k remineralizácii. Rozpustené kovy lúhované z nevyužitých rudných háld a háld hlušín predstavujú dlhodobý problém životného prostredia. Biologické procesy sú jedinou technológiou, ktorá dokázala *in-situ* remineralizáciu a imobilizáciu vylúhovateľných kovov. Rozpustené kovy môžu byť v pôdach imobilizované v dôsledku prírodných alebo umelých biomineralizačných reakcií (EPA, 1996). Mikrobiálne systémy môžu byť navrhnuté tak, aby tvorili biominerály, ktoré môžu zlúčiť a imobilizovať kontaminanty.

Procesy biomineralizácie sú súčasťou prirodzeného cyklu, v ktorom sú minerály neustále formované, transformované a degradované. *In-situ* biomineralizácia ťaží z toho, že mikroorganizmy zohrávajú hlavnú úlohu v tvorbe prírodnej rudy, ktorá zahŕňa akceleráciu biologických reakcií na sanáciu odpadov. Počas biomineralizácie ťažkých kovov z banských

odpadov mikroorganizmy iniciujú sériu komplexných reakcií. Mechanizmy odstraňovania kovov sú ovplyvňované biologicky katalyzovanými remineralizačnými reakciami (EPA ORD, 2000).

Mikroorganizmy tvoria pri biomineralizácii biominerály, ktoré sú napriek zvyčajne malej veľkosti zrna a tesného spojenia s organickými materiálmi ľahko identifikovateľné ako bežné minerálne druhy. Keďže biominerály, resp. minerálne a organické fázy, sú úzko spojené na molekulárnej úrovni, sú prakticky neoddeliteľné tak konštrukčne ako aj z hľadiska ich funkčných vlastností. Hydroxidy a oxyhydroxidy Fe, uhličitany a fosforečnany vápnika tvorené jedno- a mnohobunkovými organizmami sú uvádzané ako príklady biominerálov a biomineralizačných procesov. Ich špeciálne morfologické a kryštalochemické vlastnosti vytvárajú jedinečné štruktúry na živých formách, ktoré ich vytvárajú (Beniash, 2011).

Biominerály sa formujú dvoma hlavnými mechanizmami: prvý je prostredníctvom formovania minerálu v dopredu vytvorenej organickej matrice (Weiner a Addadi, 1991; 1997; He et al., 2003) a druhý spôsob je cez kooperatívne interakcie medzi makromolekulárnymi zhlukmi a tvoriacimi sa minerálnymi fázami (Cölfen a Mann, 2003; Beniash et al., 2005). Tieto dva mechanizmy sa navzájom nevylučujú a pravdepodobne sú prítomné súčasne v mnohých biomineralizačných procesoch. Ďalším dôležitým znakom mnohých biomineralizačných procesov v rôznych kmeňoch je použitie prechodových metastabilných minerálnych fáz, ktoré majú rad výhod oproti klasickému rastu kryštálov (Beniash et al., 1997; 2009; Weiner et al., 2005; Mahamid et al., 2008; Weiner, 2008).

Biominerály sú geologicky stabilné zlúčeniny, ktoré chemicky viažu kontaminanty a môžu byť navrhnuté tak, aby boli selektívne pre špecifický kontaminant. Metódy biomineralizácie môžu tieto biominerály využiť tiež na podpovrchovú úpravu mobilných kovov tvorbou *in-situ* biominerálnych bariér. Takáto bariéra je vytvorená vstrekovaním živinových a bakteriálnych roztokov do zvodnených vrstiev prostredníctvom série injekčných vrtov. Biominerálna bariéra funguje ako reaktívna zóna pre konkrétne kovové kontaminanty. Kovy sú stabilizované a začlenené do výsledného biominerálneho produktu (EPA ORD, 2000).

Mnoho húb a baktérií produkuje CO_2 normálne počas rastu ako vedľajší produkt pri aeróbnom metabolizme. Využitím tejto schopnosti je možné získať rôzne anorganické minerálne látky na báze uhličitanov bez akéhokoľvek externého zdroja CO_2 (tab. 21). Niektoré druhy mikroorganizmov dokážu vylúčiť špecifické proteíny, ktoré môžu reagovať s exponovanými katiónmi kovu, a môžu tak vytvárať skutočne biogénne minerály, ako kryštály $CaCO_3$, $BaCO_3$ a $SrCO_3$ v neprítomnosti akéhokoľvek vonkajšieho zdroja CO_2 (Rautaray et al., 2003; Ahmad et al., 2004; Rautaray et al., 2004a,b). Rautaray et al. (2003) uvádza, že pôsobenie vodného roztoku $CaCl_2$ na *Rhodococcus* sp. malo za následok syntézu hlavne vateritu a zmiešaných kryštalických fáz $CaCO_3$ kalcit-aragonitu s premenlivou morfológiou.

Tab. 21 Príklady biominerálov syntetizovaných mikroorganizmami

Mikroorganizmus	Biominerál	Zdroj
Baktérie		
Streptomyces acidiscabies E13	Ni-struvit ($Ni(NH_4)(PO_4).6H_2O$)	Haferburg et al. (2008)
Pseudomonas aeruginosa	U-fosforečnanové zlúčeniny	Choudhary a Sar (2011)
Thermophilic sp. HEN-Qn1	$CaCO_3$	Li et al. (2009)
Actinomycéty		
Rhodococcus sp.	$CaCO_3$	Rautaray et al. (2003)
Thermomonospora sp.	$CaCO_3$	Rautaray et al. (2004a)
Thermomonospora sp.	$BaCO_3$	
Huby		
Verticillium sp.	$BaCO_3$	Rautaray et al. (2004a)
Verticillium sp.	$CaCO_3$	
Trichothecium sp.	$CaCO_3$	Ahmad et al. (2004)
Fusarium sp.	$CaCO_3$	Rautaray et al. (2003)
Fusarium oxysporum	$CaCO_3$	Ahmad et al. (2004)
Fusarium oxysporum	$SrCO_3$	Rautaray et al. (2004b)
Fusarium oxysporum	$PbCO_3$	Sanyal et al. (2005)
Fusarium oxysporum	$CdCO_3$	

5.2 Bioremediačný potenciál mikroorganizmov

Bioremediácia je definovaná ako použitie biologických procesov pre rozklad, porušenie, premenu a odstránenie kontaminantov zo zložiek životného prostredia. Ide o prirodzený proces využívajúci metabolické procesy baktérií, húb a rastlín, ktoré sú schopné využiť kontaminanty ako zdroje energie, čím sa dané látky zneškodnia alebo, vo väčšine prípadov, sa zmenia na menej toxické produkty. Svojím pôsobením dokážu mikroorganizmy ovplyvniť toxicitu, rozpustnosť vo vode alebo mobilitu stopových prvkov (Alexander, 1999). Zvýšenie rozpustnosti a mobility sa využíva v bioremediácii nerozpustných prvkov v pôde, pretože biotransformovaný produkt je uvoľnený z pevnej fázy do roztoku. Zníženie rozpustnosti prvku je typické pre odstránenie prvku z pôdy alebo podzemnej vody prostredníctvom imobilizácie, v iných prípadoch sú plynné produkty (polo)kovov odstránené volatilizáciou (Gadd, 2000). Vzhľadom k svojmu objemu majú mikroorganizmy veľký povrch, takže vďaka ich malej veľkosti poskytujú veľkú kontaktnú plochu, ktorá môže interagovať s (polo)kovmi v okolitom prostredí (Ledin, 2000). *In-situ* bioremediácie majú niektoré obmedzenia: nie sú vhodné pre všetky druhy pôd, je ťažké dosiahnuť úplný rozklad/odstránenie kontaminantu a je zložitá kontrola prírodných podmienok (napr. teploty), za ktorých prebiehajú.

Prirodzená atenuácia je bioremediácia, ktorá prebieha bez zásahu človeka. Tento proces závisí od prírodných podmienok a správania pôdnych mikroorganizmov, ktoré sú pôvodné a prirodzene sa vyskytujú v pôde. Zahŕňa množstvo procesov, ktoré prirodzene pôsobia na zníženie množstva, toxicity, mobility, objemu alebo koncentrácie znečisťujúcich látok v životnom prostredí, ako sú napr. biodegradácia, disperzia, sorpcia, riedenie, vyparovanie, chemická alebo biologická stabilizácia, transformácia alebo degradácia kontaminantov (EPA, 1999). Kalogerakis (2006) uvádza, že aj keď bioaugmentácia môže byť užitočná pre počiatočné vyčistenie kontaminovanej pôdy v danom mieste, aktivita pôvodných mikroorganizmov je dostačujúca.

Schopnosť mikrobiálnej populácie odstraňovať znečisťujúce látky v určitom type životného prostredia (napr. pôda, sedimenty, kaly alebo odpadové vody) môže byť zvýšená buď stimuláciou pôvodných mikroorganizmov pridaním živín alebo elektrónových akceptorov – **biostimulácia** alebo zavedením špecifických mikroorganizmov do miestnej populácie – **bioaugmentácia** (Dercová et al., 2015).

Biostimulácia je remediačná metóda, ktorá využíva pôvodné mikrobiálne populácie na sanáciu kontaminovaných pôd a jej princíp spočíva v pridaní živín a iných látok do pôdy s cieľom urýchliť prirodzené procesy atenuácie (Mrozik a Piotrowska-Seget, 2010). Určitým typom biostimulácie mikroorganizmov v pôdach pre zvýšenie mobility arzénu je aj kompostovanie. Aj keď niektoré štúdie uvádzajú, že po pridaní kompostu (napr. kompost pochádzajúci z odpadových kalov a iných mestských zdrojov) do pôd znečistených arzénom došlo k imobilizácii As (Gadepalle et al., 2007), viacero štúdií popisuje zvýšenie mobility As z pôdy po dodaní kompostu vo forme kravského hnoja alebo poľnohospodárskych hnojív (Ueno, 2000 in Akai et al., 2008; Edvantoro et al., 2004). Na sanáciu kontaminovanej pôdy sa používajú rôzne druhy organických doplnkov, napr. hnoj, biosolidy, piliny a drevný popol, komposty pochádzajúce z rôznych zdrojov, čistiarenské kaly, kôra a štiepky alebo odpad z lisovania olív. V prípade hnoja, iba starší hnoj je vhodný pre účely sanácie pôdy, pretože čerstvý hnoj môže poškodiť rastliny v dôsledku vysokého obsahu amoniaku (Cao et al., 2003; Park et al., 2011; Moreno-Jiménez et al., 2010). Pridanie organických doplnkov zlepšuje fyzikálne vlastnosti a úrodnosť pôd znečistených viacerými kontaminantami a uľahčuje vytvorenie zdravého vegetačného krytu (Park et al., 2011). Zvýšenie koncentrácie As, Se a Cu v pórovej vode po aplikácii kompostu uvádza práca Moreno-Jiménez et al. (2010). Dodanie kompostu zvýšilo koncentrácie rozpusteného organického uhlíka v pórovej vode, čo by mohlo vysvetliť pozorovanú mobilizáciu As, Cu a Se. Autori taktiež zistili zvýšenú volatilizáciu As vplyvom pridania kompostu.

Inokulácia znečistenej pôdy, sedimentov alebo kalu pôvodným, alochtónnym alebo geneticky modifikovaným mikroorganizmom so špecifickými degradačnými alebo transformačnými schopnosťami za účelom zvýšenia *in-situ* alebo *ex-situ* bioremediácie sa nazýva **bioaugmentácia**. Používa sa predovšetkým na prekonanie problému s nedostatkom mikróbov schopných odstrániť kontaminant alebo kde je príliš vysoká koncentrácia znečisťujúcich látok (Forsyth et al., 1995; Singer et al., 2005; Stephenson Environmental Services, 2012; Mrozik a Piotrowska-Seget, 2010). Forsyth et al. (1995) odporúčajú použiť bioaugmentáciu aj v pôde obsahujúcej zlúčeniny vyžadujúce viackrokovú remediáciu a na maloplošných miestach, kde náklady na nebiologické metódy sú vyššie ako náklady na bioaugmentáciu.

Za optimálnych lokálnych podmienok je možné zvýšiť mieru degradácie polutantov po pridaní inokula s mikroorganizmom, aj keď vyššia úspešnosť bioaugmentácie je v prípade uzavretých systémov, ako sú napríklad bioreaktory, kde môžu byť podmienky riadené v prospech prežitia a predĺženia aktivity exogénnych mikrobiálnych populácií. Základným predpokladom pre túto intervenciu je, že metabolické kapacity pôvodných mikrobiálnych spoločenstiev prítomných v biotope zvolených pre čistenie sa zvýšia z vonka rozšírením genetickej diverzity, čo vedie k väčšiemu súboru produktívnych biodegradačných reakcií (El Fantroussi a Agathos, 2005).

Vzťah inokulovaného mikroorganizmu s novým biotickým a abiotickým prostredím, pokiaľ ide o prežitie, aktivitu a migráciu, môže byť rozhodujúci vo výsledku akejkoľvek bioaugmentačnej stratégie (El Fantroussi a Agathos, 2005). Medzi abiotické faktory v pôde, ktoré vplývajú na prežitie a degradačnú činnosť introdukovaných mikróbov patria napr. fyzikálno-chemické vlastnosti pôdy, ílové minerály, obsah organickej hmoty, prevzdušnenie, obsah živín, hodnota pH, teplota, vlhkosť a chemická štruktúra, koncentrácia a prístupnosť znečisťujúcich látok (van Veen et al., 1997; Mrozik a Piotrowska-Seget, 2010). Biotické faktory sú často dôležitejšie ako abiotické kvôli vplyvom, ako napr. predácia prvokov a bakteriofágov, antagonistické interakcie, konkurencia s autochtónnymi mikroorganizmami kvôli živinám alebo elektrónovým akceptorom a prítomnosť koreňov, ktoré uvoľňujú organické zlúčeniny. Preto je sterilná pôda všeobecne vhodnejšia pre aplikovanie externých mikroorganizmov ako prirodzené pôdy. Všetky tieto interakcie potenciálne znižujú počet introdukovaných buniek (England et al., 1993; van Veen et al., 1997; El Fantroussi et al., 1999; Sørensen et al., 1999). K biotickým faktorom patrí aj výber správnych mikroorganizmov, ktoré nielen degradujú znečistenie, ale taktiež dokážu úspešne konkurovať pôvodnej mikroflóre (Mrozik a Piotrowska-Seget, 2010). Novú alternatívu bioaugmentácie pre in-situ bioremediácie kontaminovaných prostredí predstavujú zapuzdrené bunky, ktorými je exogénna bakteriálna populácia lepšie chránená a nie je tak ľahko rozptýlená mimo oblasť kontaminácie (Moslemy et al., 2002, 2003).

Stephenson a Stephenson (1992) zhrnuli dôvody zlyhávania bioaugmentácie v praxi: koncentrácia substrátu je príliš nízka, aby podporila rast aplikovaných mikroorganizmov, systém môže obsahovať látky alebo podmienky (napr. teplota), ktoré pôsobia inhibične, konkurenčné pôsobenie iných mikroorganizmov spôsobuje inhibíciu rastu, naočkované mikroorganizmy využívajú skôr iné organické substráty v systéme než znečisťujúce látky, počet organizmov môže byť príliš malý na vykonanie významnej zmeny, použitý organizmus nie je aplikovaný do prostredia, kde je možné účinne spotrebovať požadovaný substrát,. mnohé aplikované druhy nie sú schopné iniciovať odstránenie dostatočne rýchlo, bez určitej doby aklimatizácie.

Existuje niekoľko spôsobov ako vybrať mikroorganizmy vhodné pre bioaugmentáciu. Jednou možnosťou je, že mikroorganizmy sú izolované z daných kontaminovaných pôd a po kultivácii v laboratórnych podmienkach sú čisté adaptované bakteriálne kmene aplikované späť do pôdy. Tento prístup sa nazýva tzv. reinokulácia pôdy s pôvodnými mikroorganizmami. Druhou možnosťou je výber mikroorganizmov z miest s podobným typom kontaminácie a použiť vybrané mikroorganizmy na prečistenie daných pôd (Mrozik a Piotrowska-Seget, 2010). Mnohé mikroorganizmy sú veľmi prispôsobivé, čo sa týka metabolizmu, takže sú schopné degradovať široké spektrum substrátov. Najúčinnejšia eliminácia kontaminantov môže byť dosiahnutá použitím mikrobiálnych inokúl izolovaných z prostredia, kde sa znečistenie vyskytuje v priebehu niekoľkých desiatok rokov (Mrozik a Piotrowska-Seget, 2010).

5.2.1 Biolúhovanie arzénu pôsobením autochtónnej mikroflóry a rodu *Pseudomonas*

Biolúhovanie pomocou heterotrofných druhov baktérií je novou, doposiaľ málo publikovanou možnosťou zvyšovania mobility kovov (Peťková et al., 2013a,b; Vojtková et al., 2013). Z tohto hľadiska predstavuje rod *Pseudomonas* veľmi atraktívnu bakteriálnu skupinu, keďže v porovnaní s ďalšími mikroorganizmami je možno dosiahnuť veľmi zaujímavú účinnosť biolúhovania.

Rod *Pseudomonas* bol popísaný v roku 1894 (Migula, 1894) a je jedným z najrôznorodejších bakteriálnych rodov, ktorého druhy boli izolované po celom svete v rôznych prostrediach, od Antarktídy po trópy. Baktérie sú prirodzene prítomné v sedimentoch, klinických vzorkách, rastlinách, hubách, vode, pôde, v rizosfére rastlín, atď. (Peix et al., 2009). Všeobecne možno povedať, že vhodné stanovište pre pseudomonády sa nachádza v teplotnom rozmedzí 4 –42 °C s hodnotou pH 4 až 8, s obsahom jednoduchých až zložitých organických zlúčenín (Moore et al., 2006). Rod *Pseudomonas* patrí k baktériám s mimoriadne významným bioremediačným potenciálom, pričom je známy pre jeho širokú metabolickú prispôsobivosť a vysokú genetickú

variabilitu. Druhy rodu *Pseudomonas* rýchlo rastú a sú obzvlášť známe pre ich schopnosť metabolizovať rozsiahle množstvo substrátov, vrátane toxických organických chemických látok, ako sú napríklad alifatické a aromatické uhľovodíky. Často sú rezistentné voči antibiotikám, dezinfekčným a čistiacim prostriedkom, ťažkým kovom a organickým rozpúšťadlám. U niektorých kmeňoch bola potvrdená produkcia metabolitov, ktoré stimulujú rast rastlín alebo inhibujú škodcov rastlín (Moore et al., 2006). Druhy rodu *Pseudomonas* sú aeróbne a kyslík je zrejme hlavný limitujúci faktor pre ich habituáciu. V prírode sa druhy vyskytujú ako saprofyty a parazity. Všeobecne platí, že nie sú popredné v anaeróbnych prostrediach a nevyskytujú sa v extrémnych termofilných alebo acidofilných stanovištiach (Moore et al., 2006). Fylogenetická klasifikácia baktérií na základe ich 16S rRNA génov viedla k vytvoreniu troch pododdelení neskôr nazvaných *„alpha“*, *„beta“* a *„gamma“ Proteobacteria* (Woese et al., 1984).

Bakteriálny rod *Pseudomonas* tvorí veľmi významnú skupinu baktérií, ktorá vykazuje obrovskú ekologickú diverzitu (Spiers et al., 2000; Ramos, 2004; Ramos a Filloux, 2010). Zástupci tohto rodu boli izolovaní z najrôznejších ekologických prostredí, opísané sú klinické izoláty z ľudských infekcií (*P. aeruginosa, P. fluorescens, P. monteilii*, *P. oryzihabitans*, *P. stutzeri*), izoláty z fylosféry i rhizosféry rastlín (*P. congelans, P. lurida, P. marginalis*, *P. argentinensis*, *P. panacis*, *P. poae*, *P. savastanoi*, *P. straminea*, *P. syringae*, *P. trivialis*, *P. viridiflava*), z minerálnych vôd *(P. brenneri*, *P. jessenii*, *P. gessardii*, *P. libanensis*, *P. mandelii*, *P. migulae*, *P. rhodesiae*, *P. veronii*), z odpadových a drenážnych vôd (*P. alcaligenes, P. pseudoalcaligenes, P. balearica*, *P. fluorescens*, *P. orientalis*), z pôd kontaminovaných organickými i anorganickými látkami (*P. delhiensis*, *P. fluorescens, P. monteilii, P. mendocina, P. putida*, *P. panipatensis*, *P. pictorum*, *P. stutzeri*), ako patogény rastlín i živočíchov (*P. corrugata*, *P. flavescens*, *P. mediterranea*), ale taktiež izoláty z extrémnych prostredí ako sú napr. ľudské ostatky (*P. moraviensis*), povrch soľných kryštálov (*P. halosaccharolytica*), zo siníc z Antarktídy (*P. proteolytica*), či z povrchu húb (*P. reactans*, *P. tolaasii).*

Rod je geneticky, fyziologicky i morfologicky značne heterogénny, často i v rámci jedného druhu, čo potvrdzuje percentuálne zastúpenie guanínu a cytozínu (G+C) v DNA v rozmedzí 58 – 69 % (Garrity et al., 2005). Väčšinu zástupcov tvoria rovné alebo mierne zakrivené baktérie tyčinkovitého tvaru o rozmeroch 0,5 – 1,0 μm x 1,5 – 5,0 μm, ktoré sa pohybujú pomocou jedného alebo niekoľkých polárnych, vzácne laterálnych bičíkov (výnimku tvorí kmeň *P. mallei*, ktorý je nepohyblivým druhom). Pseudomonády sú gramnegatívne, nesporulujúce, aeróbne baktérie so striktne respiračným metabolizmom, kde terminálnym akceptorom elektrónov je kyslík. V prípade výskytu v anaeróbnom prostredí je ďalším možným akceptorom elektrónov nitrát – schopnosť redukcie nitrátov je charakteristickou vlastnosťou pre tento rod, a len niekoľko kmeňov nie je tohto procesu schopná (napr. väčšina biovarov *P. fluorescens*). Kultivácia

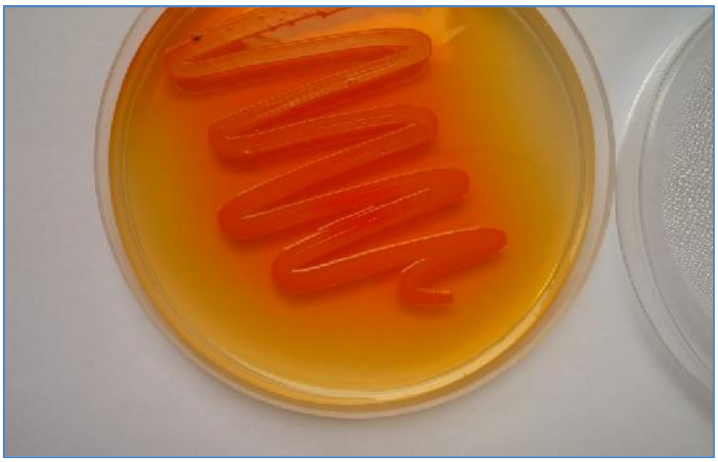
rodu je nenáročná, väčšina druhov nevyžaduje zvláštne rastové faktory a z hľadiska metabolizmu ide prevažne o druhy chemoorganotrofné, len niektoré druhy sú chemolitotrofné so schopnosťou využívať ako zdroj energie H_2 alebo CO_2 (Timmis, 2002; Sedláček, 2007; Rehm, 2008; Bednář et al., 2009).

Zástupcovia rodu *Pseudomonas* sú schopní aerobnej degradácie uhľovodíkov a ich derivátov, ktoré sa do prostredia dostávajú predovšetkým ako finálne produkty priemyslu. Veľká časť týchto látok môže byť pseudomonádami využitá ako zdroj uhlíka. Schopnosť utilizácie najrôznejších uhľovodíkov (predovšetkým aromatických) je z veľkej časti sprostredkovaná pomocou enzýmov oxygenáz, ktoré sú kódované génmi nesenými plazmidmi. K najznámejším z nich patria plazmidy, ktoré boli nazvané podľa génov zaisťujúcich degradáciu špecifických látok: plazmidy TOL (rozklad toluénu, *m*-xylénu a *p*-xylénu), CAM (rozklad kafru), NAH (rozklad naftalénu), SAL (rozklad salicylátu) a OCT (rozklad *n*-oktánov) (Baldwin et al., 2003). Vďaka možnosti horizontálneho prenosu plazmidov, a to i medzi celkom nepríbuznými rodmi baktérií, dochádza k zvyšovaniu počtu druhov s uvedenými degradačnými schopnosťami (Akhmetov et al., 2008). Pseudomonády sú schopné degradovať i zlúčeniny halogénované, napriek tomu, že sú tieto látky veľmi toxické a v prostredí často perzistujú. Tento proces je sprostredkovaný produkciou dehalogenáz, enzýmov štiepiacich halogén-uhlíkovú väzbu halogénových substituentov – halogénaromátov, halogénalkánov, halogénalkoholov a halogénalkánových kyselín. Ich rozklad však prebieha veľmi pomaly, a to v aeróbnom i anaeróbnom prostredí (Fetzner a Lingens, 1994).

Rýchlosť mikrobiálnej degradácie ropných uhľovodíkov je ovplyvnená mnohými faktormi, ktoré majú priamo či nepriamo dopad na rast a metabolizmus mikrobiálnej populácie. Pre rozklad týchto látok je rozhodujúci ich fyzikálny stav – k najintenzívnejšej degradácii dochádza na rozhraní fázy voda – uhľovodík. Ďalšími abiotickými faktormi ovplyvňujúcimi biodegradáciu sú teplota, alkalita či acidita, vlhkosť prostredia, dostupnosť iných zdrojov uhlíkov, rastových faktorov, dusíka a fosforu (Horáková, 2000).

Charakteristickým a historicky významným taxonomickým znakom väčšiny pseudomonád je produkcia pigmentov. Fluorescenčné pseudomonády tvoria majoritnú časť rodu *Pseudomonas* – skupinu I (podľa rRNA homológie). Táto skupina zahŕňa významné druhy schopné biodegradácie širokej škály zlúčenín a produkcie biotechnologicky dôležitých látok (obsahuje známy kmeň *P. putida*). Zástupci rodu *Pseudomonas* produkujú celkovo 4 typy fenazínových pigmentov (pyocyanín, pyorubín, chlororafin, oxifenazin) a pyoverdin (nazývaný tiež fluoresceín) (Garrity et al., 2005). Najznámejším zo všetkých pigmentov rodu *Pseudomonas* je derivát fenazínu – pyocyanín, ktorý je dobre rozpustný vo vode, má modrozelenú farbu a môže difundovať z bakteriálnej kolónie do okolitého média. Ďalšie fenazinové pigmenty sú menej

rozpustné a niekedy kryštalizujú okolo kolónie, napr. zelený chlororafin, ktorý je produkovaný kmeňom *P. chlororaphis* (obr. 20). Žltozelené pyoverdíny (syn. fluoresceíny) sú druhovo špecifickými farbivami, lebo každý druh z fluorescenčných pseudomonád produkuje pyoverdín so špecifickým aminokyselinovým zložením. Tieto farbivá sú taktiež dôležitými pigmentami z hľadiska fyziológie, lebo sú hojne produkované v médiách s nízkym obsahom železa, kde tvoria tzv. sideroféry – zlúčeniny chelatizujúce železo (Meyer et al., 2007). Ich fluorescencia sa pohybuje od bieleho až k modrozelenému sfarbeniu, v závislosti na vlnovej dĺžke UV žiarenia (vlnová dĺžka pre max. excitáciu elektrónov sa pohybuje okolo 400 nm, väčšina fluorescenčných pigmentov je však schopná intenzívnej fluorescencie i pri nižšej vlnovej dĺžke). Táto vlastnosť sa používa k odlíšeniu pyoverdínu od iných fluorescenčných pigmentov. Pri niektorých druhoch sa tvoria pigmenty, ktoré nie sú rozpustné vo vode, ale zotrvávajú asociované s bunkovými štruktúrami. Tieto pigmenty sa zvyčajne nazývajú karotenoidné a boli dokázané u *P. mendocina*, *P. alcaligenes* a u kmeňa *P. paucimobilis* (Jenkis et al., 1979; O´Leary, 1989).



Obr. 20 *Pseudomonas chlororaphis* ZK-1 s produkciou oranžového pigmentu fenazínu (fenazín-1-karboxylát) na trypton-sójovom agare (M290, HiMedia Laboratories, India)

Uvedené bakteriálne farbivá môžu mať antibiotické či protektívne účinky – môžu fungovať ako ochrana proti UV žiareniu či pôsobeniu iných mikroorganizmov (O'Sullivan a O'Gara, 1992; Rekha et al., 2010). Aj keď u niektorých pigmentov nebola ich funkcia doposiaľ celkom objasnená, môže byť ich produkcia veľmi dôležitým diagnostickým znakom, ktorý koreluje s inými taxonomickými vlastnosťami tejto bakteriálnej skupiny (Garrity et al., 2005).

Patogenita baktérií Pseudomonas

Patogenita baktérií *Pseudomonas* je v priamej súvislosti so všeobecným rozšírením tohto bakteriálneho rodu. Tieto baktérie sú častým predstaviteľom nozokomiálnych nákaz, ktoré sa šíria v nemocničných zariadeniach (Hynie, 2001; Votava, 2006). Na patogenite sa zo strany mikróba uplatňujú faktory viazané na bakteriálnu bunku (lipofilné povrchové vrstvy, extracelulárne polysacharidy, membránové lipopolysacharidy) i extracelulárne produkty baktérií (enzýmy, toxíny, bakteriálne pigmenty).

Rod *Pseudomonas* tvorí mukoidné kmene, ktorých extracelulárny polysacharid alginát sa tvorí v enormnom množstve, obaľuje celé mikrokolónie baktérií a účinne ich tak chráni pred obrannými mechanizmami hostiteľa. S lipopolysacharidovými komplexami sú spojené typovo špecifické antigény, protilátky proti nim pôsobia ako opsoníny (Watson et al., 1994).

Medzi extracelulárnymi enzýmami pseudomonád sa v patogenite uplatňujú hlavne proteolytické enzýmy štiepiace kazeín, fibrín, elastín a kolagén. Proteolytické enzýmy poškodzujú steny drobných ciev, čím vyvolávajú hemorágiu až nekrózy, inaktivujú zložky komplementu, a tým bránia ozonizácii, lebo inhibujú fagocytózu (Bednář et al., 2009). U niektorých kmeňov pseudomonád sa môžu toxicky prejavovať i produkované pigmenty – napr. pyocyanín sa uplatňuje ako inhibítor mitochondriálnych enzýmov, znižuje pohyb riasiniek, a tým zhoršuje regeneráciu sliznice dýchacích ciest (Ran et al., 2003; Lau et al., 2004). Pyocyanín je pigment modro-zelenej farby, ktorý produkuje až 60 % kmeňov a je zodpovedný napr. za charakteristické sfarbenie hnisu v infikovanej rane.

U pseudomonád sa uvádza taktiež produkcia ďalších exotoxínov s výraznou cytotoxickou aktivitou porušujúcou bunkové membrány hostiteľa a zvyšujúce ich permeabilitu (Seetharam et al., 1991; Gallant et al., 2000; Morlon-Guyot et al., 2009). Príkladom je produkcia leukocidínu (Scharmann, 1976).

Medzi pseudomonády s preukázanou patogénnou aktivitou sú radené kmene *P. aeruginosa, P. fluorescens, P. luteola*, *P. maltophilia, P. monteilii, P. putida,* menej často taktiež *P. Pickettii* a *P. oryzihabitans.* Kmene s preukázanou patogénnou aktivitou sú obvykle vysoko virulentné a rezistentné na antibiotiká, dokonca u niekoľkých kmeňov je uvádzaná ich agresívna povaha (Wertheim a Markovitz 1992). Preto sa veľmi často pseudomonádové infekcie liečia kombináciou dvoch a viac antibiotík (Bednář et al., 2009).

Taxonómia baktérií rodu Pseudomonas

Rod *Pseudomonas*, ktorý bol prvýkrát popísaný v roku 1894 ako rod gramnegatívnych, tyčinkovitých, polárne-bičíkatých mikroorganizmov so striktne anaerobným metabolizmom (Migula, 1894; Migula 1900), prechádzal po taxonomickej stránke radou zmien. Ako veľmi heterogénna skupina baktérií bol tento rod v minulosti niekoľkokrát reklasifikovaný na základe fenotypových vlastností (Sneath et al., 1981) i chemotaxonomických dát (Oyaizu a Komagata, 1983; Vancanneyt et al, 1996). Pôvodne boli členovia rodu *Pseudomonas* rozptýlení po celej triede *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* a *Gammaproteobacteria* (Palleroni, 1984), avšak teraz je ich výskyt obmedzený výhradne na skupinu *Gammaproteobacteria* (s *P. aeruginosa* ako

typovým druhom); zástupcovia zo skupiny *Alphaproteobacteria* a *Betaproteobacteria* boli postupne prevedení do iných rodov (Kersters et al., 1996, Anzai et al., 2000).

Moderná taxonómia celého rodu, vychádzajúca z DNA-DNA hybridizačných techník a metód génovej sekvenčnej podobnosti molekúl 16S rRNA (Anzai et al., 2000), bola základom opakovaných identifikačných revízií, ktoré ukázali značnú variabilitu medzi doposiaľ popísanými druhmi (Palleroni et al., 1973; Krieg a Holt, 1984). Tento rozsiahly stupeň heterogenity medzi staršími zástupcami rodu *Pseudomonas* sa prejavuje existenciou vzdialene príbuzných druhov, ktoré boli postupne reidentifikované a uvedené do existujúcich alebo novo definovaných rodov. Tieto analýzy a taxonomické prestavby určili základné druhy skupiny I zahŕňajúce typové druhy *P. aeruginosa, P. fluorescens*, *P. putida* a *P. syringae*, pôvodne popisované ako druhy fylogeneticky homogénnej skupiny *Pseudomonas* sensu stricto (v užšom slova zmysle) (Palleroni, 1992; Moore et al., 1996). Pôvodne zaradené druhy do skupiny II až IV boli postupne reklasifikované do rodov *Brevundimonas, Sphingomonas, Burkholderia, Ralstonia, Aminobacter, Comamonas, Acidovorax, Hydrogenophaga, Telluria a Stenotrophomonas* (Palleroni, 1993; Holloway, 1996; Kersters et al., 1996). Táto klasifikácia je celkom v súlade s novými pohľadmi a fylogenetickými informáciami získanými na základe výsledkov sekvenčných štúdií molekúl 16S rRNA uvedených v *Ribosomal Database Project* (Maidack et al., 1996). Moderná taxonómia založená na molekulárnych sekvenciách 16S rRNA uvádza rod *Pseudomonas*, ktorý bol pôvodne označovaný ako typ I (skôr fluorescenčná skupina pseudomonád) s podskupinami *Acinetobacter* a *Teredinibacter*. V bezprostrednej blízkosti fylogenetickej vetve sú potom umiestnené rody *Oceanospirillum* a *Colwellia*. Táto molekulárna definícia rodu *Pseudomonas* vychádza z genotypizácie pomocou molekúl 16S rRNA a môže byť použitá ako základ špecifického taxonomického prístupu pre tento rod. Existujúca nomenklatúra rodu je uvedená v *List of prokaryotic names with standing in nomenclature* a je dostupná online z webového portálu http://www.bacterio.net/p/pseudomonas.html.

V súčasnosti platné taxonomické radenie rodu *Pseudomonas* vychádza z doposiaľ známych publikovaných štúdií (Palleroni, 1992; Garrity et al., 2015; databáza GenBank):

Doména: *Bacteria*
Kmeň: *Proteobacteria*
Trieda: *Gammaproteobacteria*
Rad: *Pseudomonadales*
Čeľaď: *Pseudomonadaceae*
Rod: *Pseudomonas*

Práve kvôli vyššie uvedeným charakteristikám bola účinnosť rodu *Pseudomonas* hodnotená v uvoľňovaní As z reprezentatívnych vzoriek technozemí v modelovej lokalite Zemianske Kostoľany realizáciou biolúhovacích experimentov..

Biolúhovanie arzénu pôsobením autochtónnej mikroflóry a kmeňa Pseudomonas chlororaphis ZK-1

Bakteriálny kmeň *Pseudomonas chlororaphis* je všeobecne považovaný za veľmi adaptabilný druh pseudomonád. Vysoká biologická rozmanitosť u tohto druhu je charakterizovaná kvalitatívnymi a kvantitatívnymi rozdielmi v množstve fenotypových variant, ktoré sú opisované na príkladoch zmien „divokých" S-fenotypov na R-fenotypy alebo viac pigmentované P-fenotypy. Tieto zmeny boli zistené v súvislosti so zmenou zloženia prostredia, so zmenou obsahu živín v médiách i s chemickou aktivitou anabióznych autoinduktorov, podporujúcich vysoký stupeň zachovania životaschopnosti buniek v stresujúcom prostredí (Muliukin et al., 2008).

Bakteriálny rod prešiel za posledné obdobie celou radou taxonomických zmien. Bakteriálny kmeň *P. chlororaphis* spolu s kmeňom *P. aurantiaca* a *P. aureofaciens* boli považované až do roku 1989 za samostatné druhy rodu *Pseudomonas* (Johnson a Palleroni, 1989). Následné molekulárno-genetické analýzy preukázali, že typový kmeň *P. chlororaphis* (DSM 50083^T) vykazuje 99,5 % genovú sekvenčnú podobnosť ku kmeňu *P. aurantiaca* (NCIMB 10068^T) a *P. aureofaciens* (DSM 6698^T) (Peix et al., 2007). Výsledky analýz mastných kyselín a ďalších fenotypových znakov ukázali, že tieto kmene spolu úzko súvisia, i keď medzi nimi existujú isté rozdiely. Všetky tieto výsledky potvrdili predchádzajúce reklasifikačné pokusy a nakoniec vyústili do taxonomického preradenia druhu *P. aurantiaca* a *P. aureofaciens* pod jediný bakteriálny druh – *P. chlororaphis* s tromi samostatnými poddruhmi, pre ktoré boli navrhnuté nasledujúce názvy: *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* s typovým kmeňom DSM 50083^T (= ATCC 9446^T = NCIMB 9392^T), *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* s typovým kmeňom DSM 6698^T (= ATCC 13985^T = NCIMB 9030^T) a *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* s typovým kmeňom NCIMB 10068^T (= ATCC 33663^T = CIP 106718^T) (Peix et al., 2007).

Pseudomonas chlororaphis subsp. *aurantiaca* bol prvýkrát izolovaný v roku 2009 z povrchu stoniek cukrovej trstiny rastúcej v Pakistane (Mehnaz et al., 2009). Identifikácia kmeňa prebehla na základe sekvenčnej analýzy 16S rDNA, následne boli skúmané fyziologické a biochemické vlastnosti. Potvrdilo sa, že bunky tejto baktérie produkujú dva hlavné difuzibilné pigmenty zelenej a oranžovej farby, ktoré spôsobujú typické sfarbenie bakteriálnych kolónií. V okolí kolónií sa živné médium sfarbuje na zeleno s prejavom fluorescencie pod UV lampou.

Taktiež sa preukázalo, že kmeň môže slúžiť ako prírodný zdroj látok proti hubovým fytopatogénom, a to predovšetkým z rodu *Fusarium* a *Colletotrichum* (Tombolini et al., 1999; Chin-A-Woeng et al., 2000; Shepelevich et al., 2012). V metabolických produktoch baktérií boli identifikované dve skupiny bioaktívnych látok, z ktorých jedna je zodpovedná za antimikrobiálny účinok a druhá za antifungiálnu aktivitu. Táto látka je v súčasnosti skúmaná ako nový fungicídny prípravok. Za ďalšie antifungiálne metabolity boli identifikované taktiež

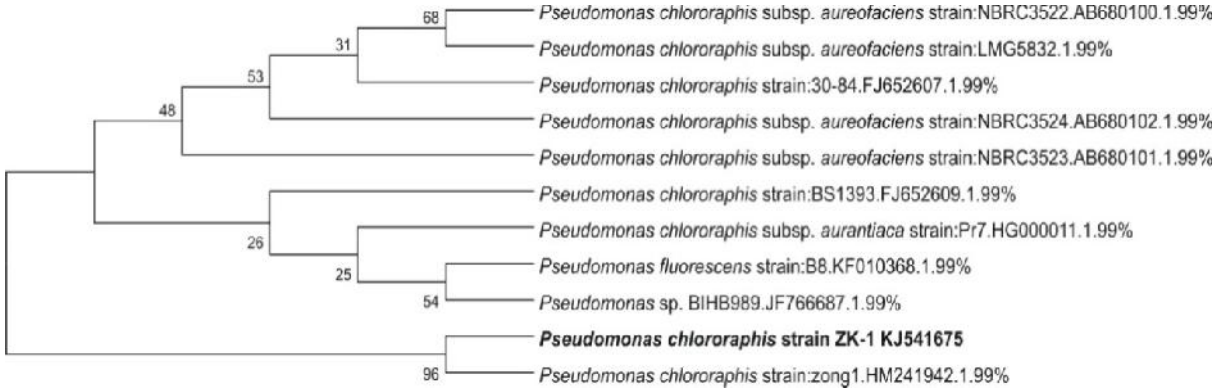
fenazín-1-karboxylová kyselina, 2-hydroxyfenazín a N-hexanoyl-homoserín laktón (Feklistova a Maksimova, 2008; Mehnaz et al., 2009). Okrem vyššie uvedených látok produkuje kmeň i kyselinu indoloctovú a sideroféry (Mandryk et al., 2007).

Hoci je kmeň považovaný za účinný biokontrolný mikroorganizmus v boji proti niektorým hubám (Mark et al., 2006; Liu et al., 2007b), jeho patogenita nebola doposiaľ spoľahlivo preskúmaná. Preto je všeobecne považovaný za nepatogénny bakteriálny druh. Agentúra na ochranu životného prostredia uvádza, že „*Pseudomonas chlororaphis* nepreukazuje toxicitu alebo patogenitu pre človeka, voľne žijúce živočíchy alebo životné prostredie“ (EPA, 2009). Avšak, známe sú vedecké štúdie predkladajúce izoláty *P. chlororaphis* ako rybie patogény s pomerne vysokou mortalitou (Hatai et al., 1975).

Bakteriálny kmeň *Pseudomonas chlororaphis* ZK-1 je novým izolovaným a identifikovaným autochtónnym kmeňom z pochovaných antropogénnych sedimentov z lokality Zemianske Kostoľany, kde obsah As dosahoval 230 $mg.kg^{-1}$.

Genotypová charakteristika kmeňa P. chlororaphis ZK-1

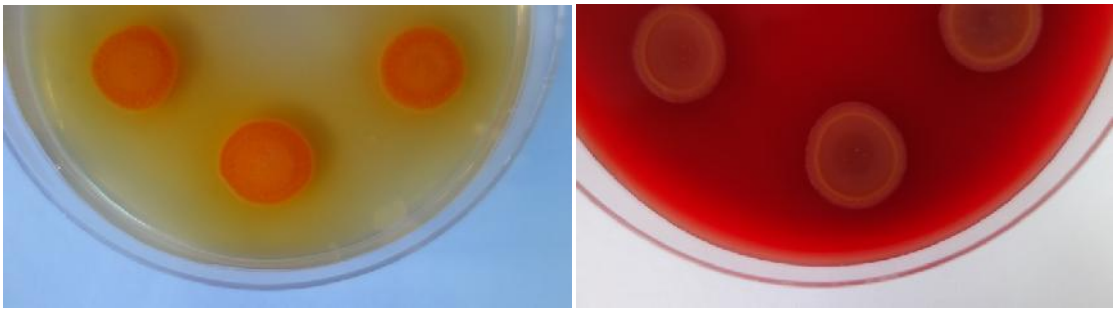
Ribotypizácia realizovaná pomocou endonukleázy *Alu*I odhalila identitu medzi kmeňom *P. chlororaphis* ZK-1 a bakteriálnym kmeňom *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*. Získaná sekvencia bola vložená do databázy GenBank pod prístupovým číslom KJ541675. Najbližším taxonomicky príbuzným kmeňom bol zistený izolát *P. chlororaphis* zong1 (Zhao et al., 2013), ktorý bol zistený ako endofytický kmeň z hľúz na koreňoch strukoviny *Sophora alopecuroides*. Taxonomická pozícia kmeňa *P. chlororaphis* ZK-1 v podobe fylogenetického stromu, ktorý obsahuje všetky typy susedných pseudomonád s podobnostnou úrovňou nad 98,5 % je znázornená na obr. 21.



Obr. 21 Fylogenetický strom znázorňujúci príbuznosť 16*S* rRNA sekvencie druhu *Pseudomonas chlororaphis* ZK-1 s najbližšími druhmi v databáze GenBank

Fenotypová charakteristika kmeňa P. chlororaphis ZK-1

Morfologicky vykazuje baktéria gramnegatívny typ bunky tyčinkovitého tvaru, pohyblivé, jednotlivo aj v nepravidelných zhlukoch. Kmeň tvorí gulaté, hladké, lesklé a ploché kolónie so zahusteným stredom, 1 – 2 mm v priemere. Okraj je súvislý, slizovitej konzistencie, oranžovej farby s výraznou difundáciou farbiva do okolitého média (obr. 22). Zistilo sa, že po 3 až 4 inokuláciách na agarovom nutričnom médiu sa produkcia oranžového farbiva výrazne znižuje a dochádza k rastu kolónií bez pigmentácie, ktorých výskyt je pravdepodobne spojený s mutáciou bakteriálneho kmeňa.



Obr. 22 Tvar a farba kolónií *P. chlororaphis* ZK-1 na pevných agarových médiách: Mueller-Hinton agar (M137, HiMedia Laboratories, India) a krvný agar so 7 % defibrovanou krvou z barana (servisná príprava, LabMediaServis, Česká republika)

Pozitívne biochemické testy: kataláza, kyselina z glukózy oxidatívne, rast pri 37°C, produkcia fluoresceínu a fenazínu, arginín dihydroláza, Simmons test, OF test, malonát sodný, hydrolýza želatíny, Tweenu 80, kaseínu, tyrozínu a lecitínu, kyselina z mannitolu, fruktózy, xylózy a maltózy, oxidáza, hemolýza.

Negatívne biochemické testy: kyselina z glukózy fermentatívne, acetamid, redukcia nitrátov, redukcia nitritov, hydrolýza škrobu a eskulínu, ONPG, DNA, dekarboxylácia lyzínu, dekarboxylácia ornitínu, ureáza, rast v prítomnosti 6,5% NaCl.

Podrobnejšie výsledky biochemickej fenotypizácie s využitím prístroja Biolog™ MicroStation (MicroLogIII 4.20.05) sú prehľadne uvedené v tab. 22.

Tab. 22 Vybrané fenotypové vlastnosti druhov *P. chlororaphis* ZK-1

Biochemické charakteristiky	*P. chlororaphis* ZK-1
Farbenie podľa Grama (*)	-
Farba kolónie (*)	oranžová
Rast pri 4°C	+
Rast pri 37°C	+
Rast pri 41°C	-
Pigmentácia (*)	+
Produkcia fluoresceínu	+
Pyocyanín (**)	-
Rast v NaCl (6,5 % NaCl)	-
Hydrolýza Tweenu 80	+
Hydrolýza škrobu	-
Hydrolýza želatíny	+
Hydrolýza kazeínu	+
Redukcia dusičnanov	-
L-arabinóza	+
D-glukóza	+
Kyselina z xylózy	+
D-manóza	+
D-galaktóza	+
D-fruktóza	+
L-rhamnóza	-
D-trehalóza	+
Sacharóza	+
Maltóza	-
L-alanín	+

(*) farba kolónie a produkcia pigmentov overená na základnom živnom médiu Trypton soya agar (HiMedia Laboratories, India)

(**) produkcia pigmentu pyocyanínu overená na médiu King A (HiMedia Laboratories, India)

Charakteristika rezistencie kmeňa P. chlororaphis ZK-1

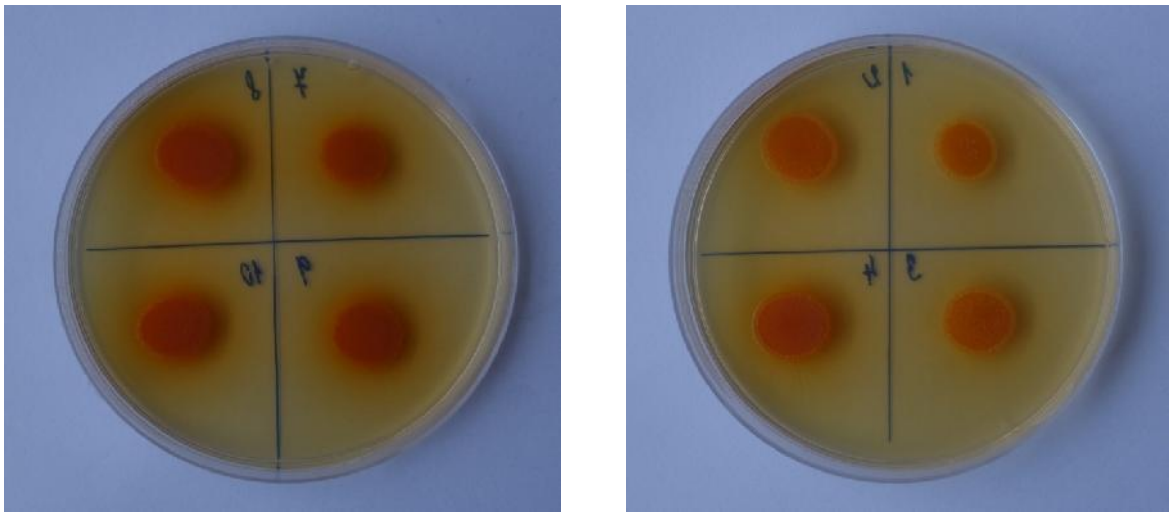
*Senzitivita voči ATB: k*meň bol citlivý na amikacín, aztreonam, karbenicilín, cefepim, cefotaxím, ciprofloxacín, ko-trimoxazol, doxycyklín, gatifloxacín (v ČR doposiaľ neregistrované), gentamicín, kanamycín, levofloxacín, mezlocilín, netilmicín (netilín), norfloxacín, ofloxacín, roxitromycín, tetracyklín a tobramycín.

Rezistencia voči ATB: z testovaných antibiotík bol kmeň rezistentný voči antibiotikám ampicilín, bacitracín, cefalexín, erytromycín, lomefloxacín, meropenem, penicilín – G, streptomycín, tikarcilín, vankomycín (obr. 23).

Rezistencia voči kovom: veľmi vysoká rezistencia (≥ 10 mM.l^{-1}) voči iónom Co^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Li^{+}, Mg^{2+}, Ni^{2+} (obr. 24), Zn^{2+}, ako aj vysoká rezistencia voči As^{3+}, Cr^{4+}, Hg^{2+}, Pb^{2+}.



Obr. 23 Testovanie rezistencie *P. chlororraphis* ZK-1 voči ATB pomocou multidisku (HiMedia Laboratories, India)



Obr. 24. Skúška rezistencie k iónom Ni^{2+}: kontrolná inokulácia na trypton-sójovom agare (M290, HiMedia Laboratories, India)

Vplyv inokulácie kmeňa P. chlororaphis ZK-1 na uvoľňovanie As

Vplyvom posilnenia autochtónnej mikroflóry inokulovaným kmeňom *Pseudomonas chlororaphis* ZK-1 sa podiel uvoľneného arzénu pohyboval v rozmedzí 1,71 – 13,62 hm. % z celkových obsahov v závislosti od vzorky (tab. 23). Najvýraznejší vplyv pridanej kultúry sa prejavil vo vybraných vzorkách č. 2 a 3, kde účinnosť uvoľnenia arzénu do roztoku bola až 2-násobne vyššia oproti kontrolným výluhom, ktoré obsahovali iba pôdny substrát a živné médium. V prípade vzorky č. 1 sa viac prejavilo pôsobenie samotnej autochtónnej mikroflóry ako kmeňa.

Tab. 23 Výsledky biolúhovania As z pôdno-popolových substrátov po inokulácii kmeňa *Pseudomonas chlororaphis* ZK-1 (priemerné hodnoty)

Vzorka	As_{Tot}	Množstvo uvoľneného arzénu vo výluhoch (n = 4)			Obsah arzénu v kontrolných výluhoch*(n = 1)		
	$mg.kg^{-1}$	$\mu g.l^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	%	$\mu g.l^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	%
1	264	45,26	4,53	1,71	45,60	4,56	1,73
2	93	96,28	9,63	10,35	29,72	2,97	3,20
3	193	262,96	26,30	13,62	93,64	9,36	4,85
4	230	40,19	4,02	1,75	34,57	3,46	1,50
5	634	165,74	16,57	2,61	68,76	6,88	1,08
6	377	139,48	13,95	3,70	115,47	11,55	3,06

* pôsobenie samotnej autochtónnej mikroflóry, kontrolné výluhy obsahovali len vzorku substrátu zaliatu čistým živným médiom bez bakteriálneho inokula

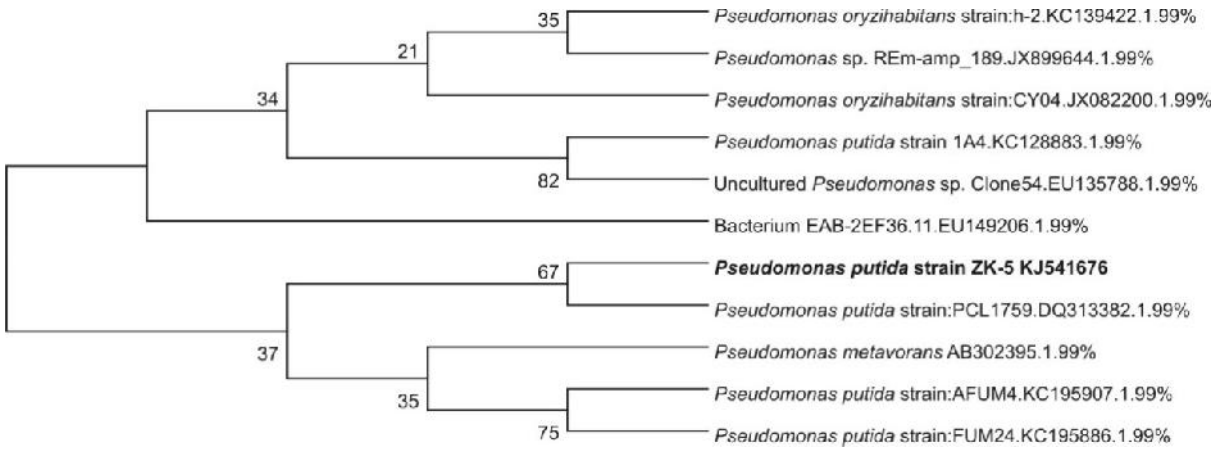
Biolúhovanie As pôsobením autochtónnej mikroflóry a kmeňa Pseudomonas putida ZK-5 (biotyp A)

Pseudmonas putida je kozmopolitný bakteriálny druh, ktorého výskyt je bežný vo vode i v pôde. Kmeň býva taktiež izolovaný z klinických materiálov, ako sú napr. hlieny a moč (Bendář et al., 2009). Kmeň je radený medzi fluorescenčné pseudomonády, pretože produkuje fluoresceín (pyoverdín), avšak neprodukuje žiadne fenazínové pigmenty. Od ostatných fluorescenčných pseudomonád sa *P. putida* odlišuje taktiež rozdielnou schopnosťou rastu v závislosti na teplote – dokáže rásť pri 4 °C, čo predstavuje riziko rastu v chladiacich zariadeniach, a hrozí tak nebezpečenstvo kontaminácie krvných i iných transfúzií. Od *P. aeruginosa* a *P. fluorescens* sa tento druh odlišuje neschopnosťou ztekucovať želatínu a dobrým rastom na vyšších amínoch – benzylamíne, butylamíne, α-amylamíne (obzvlášť rast na benzylamíne je charakteristický a odlišuje kmeň *P. putida* od morfologicky veľmi podobného kmeňa *P. fluorescens*, ktorý na ňom nerastie) (Jedličková, 1981; Sleigh a Timbury, 1990; Bednář et al., 2009). *P. putida* patrí k bakteriálnym kmeňom s vysokou schopnosťou horizontálnej výmeny génov, preto je tento druh schopný degradovať veľké množstvo organických i anorganických látok a je dnes najznámejšou pseudomonádou využívanou k praktickému odstráneniu rôznych kovov z kontaminovaného prostredia (Sharma, 2005). Stanier et al. (1966) delí tento druh do dvoch biotypov. Pri biotype A nie je jednoznačný rast pri 4°C (táto schopnosť rastu však bola preukázaná len u 11 kmeňov z celkových 32 radených do tejto skupiny). Pri 4 °C rastú všetky kmene biotypu B. Biotyp B nedokáže, na rozdiel od biotypu A, utilizovať nikotinát, avšak rastie na médiách s prídavkom L-tryptofánu, L-kynurenínu a antranilátu. Všeobecne možno považovať biotyp B za univerzálnejší kmeň, ktorý dokáže spracovávať oveľa širšie spektrum kontaminujúcich látok oproti biotypu A (galaktóza, fenol, salicylát, naftalén, a ďalšie) (Stanier et al., 1966).

Kmeň *Pseudmonas putida* ZK-5, ktorý zodpovedá biotypu A, je taktiež novým izolovaným a identifikovaným autochtónnym izolátom z pochovaných antropogénnych sedimentov na lokalite Zemianske Kostoľany zo vzorky s obsahom As 264 mg.kg^{-1}.

Genotypová charakteristika kmeňa P. putida ZK-5

Taxonomizácia na základe 16S rRNA preukázala, že najbližším doposiaľ identifikovaným kmeňom je *P. putida* PCL 1759. Tento kmeň bol opísaný ako nový biokontrolný izolát v roku 2007 (Validov et al., 2007). Kmeň bol izolovaný z rhizosféry rajčiat s cieľom nájsť významné druhy baktérií a popísať ich vzájomné biotické vzťahy zaisťujúce prirodzenú biologickú ochranu rastlín s výhľadom na ich budúce aplikácie v modernej záhradníckej praxi. Taxonomické postavenie kmeňa na základe dostupných výsledkov v databáze GenBank uvádza obr. 25.

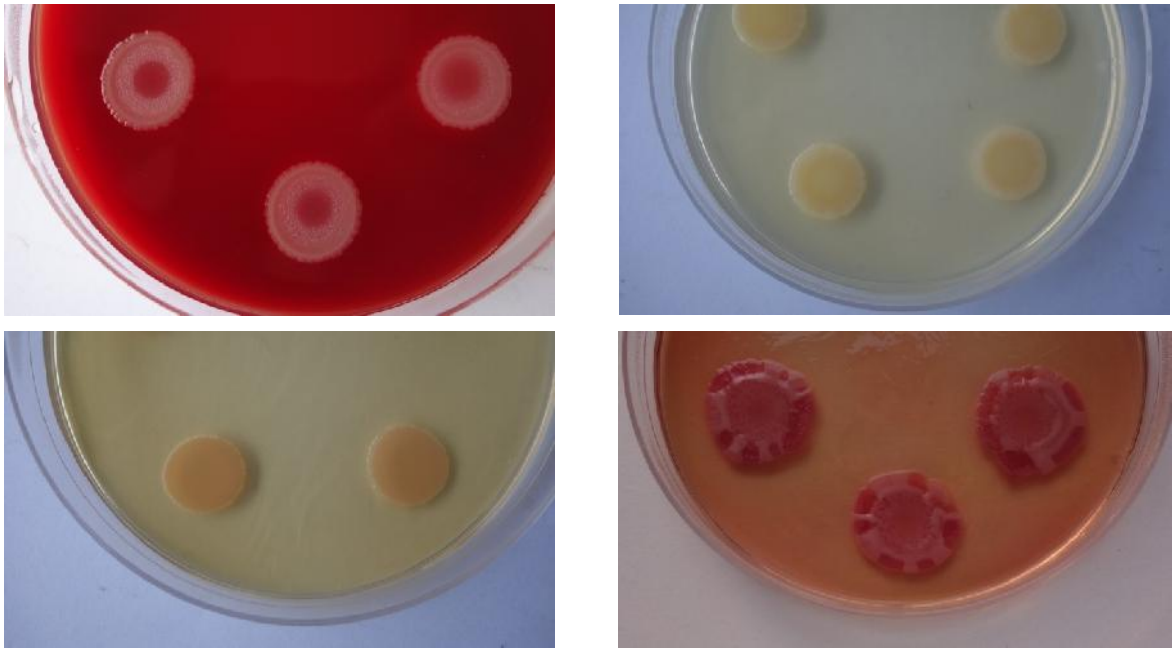


Obr. 25 Fylogenetický strom znázorňujúci príbuznosť 16S rRNA sekvencií druhu *Pseudomonas putida* ZK-5 s najbližšími druhmi v databáze GenBank

Identifikovaný kmeň *Pseudomonas putida* ZK-5 má biele sfarbenie, guľaté, hladké, lesklé a ploché bunky s mierne nepravidelným okrajom. Patrí medzi gram-negatívne baktérie s niekoľkými polárnymi bičíkmi pre pohyb, ktoré využívajú aeróbny metabolizmus (Harwood et al., 1989). Druh je významný pre životné prostredie vďaka svojmu metabolizmu a schopnosti rastu v pôdach a sedimentoch kontaminovaných vysokými obsahmi ťažkých kovov a organických zlúčenín (Wu et al., 2011).

Fenotypová charakteristika kmeňa P. putida ZK-5

Morfologicky vykazuje baktéria gramnegatívny typ bunky a tvoria pohyblivé kokotyčinky až tyčinky, ktoré sa vyskytujú jednotlivo i v nepravidelných zhlukoch. Kolónie sú guľaté, hladké, lesklé, ploché a krémové s mierne nepravidelným okrajom. Konzistencia je mazľavá a slizovitá (obr. 26, 27).



Obr. 26 Morfológia kolónií kmeňa *P. putida* ZK-5 na kultivačných pôdach: zľava hore krvný agar so 7 % defibrovanou krvou z barana (servisná príprava, LabMediaServis, Česká republika), vpravo hore M137 Mueller-Hinton agar, zľava dole M290 trypton-sójový agar a vpravo dole MV581 glukózový agar s kryštálovou violeťou (HiMedia Laboratories, Indie)



Obr. 27 Rast kolónií po viacbodovej inokulácii izolátu ZK-5 na kultivačných médiách: zľava M137 Mueller-Hinton agar, M290 trypton-sójový agar a M134 krvný agar (HiMedia Laboratories, India)

Pozitívne biochemické testy: produkcia kataláz a oxidáz, kyselina z glukózy oxidatívne, rast pri 37 °C, arginín dihydroláza, Simmons test, OF test, hydrolýza tyrozínu, kyselina z fruktózy a xylózy, rast v prítomnosti 6,5% NaCl .

Negatívne biochemické testy: kyselina z glukózy fermentatívne, acetamid, redukcia nitrátov, produkcia fluoresceínu, redukcia nitritov, hydrolýza želatíny, škrobu, Tweenu 80, kazeínu, lecitínu a eskulínu, ONPG, DNA, dekarboxylácia lyzínu, dekarboxylácia ornitínu, ureáza, kyselina z maltózy a mannitolu, hemolýza.

Podrobnejšie výsledky biochemickej fenotypizácie s využitím prístroja Biolog™ MicroStation (MicroLogIII 4.20.05) sú prehľadne uvedené v tab. 24.

Tab. 24 Vybrané fenotypové vlastnosti *P. putida* ZK-5

Biochemické charakteristiky	*P. putida* ZK-5
Farbenie podľa Grama (*)	-
Farba kolónie (*)	biela
Rast pri 4°C	+
Rast pri 37°C	+
Rast pri 41°C	-
Pigmentácia (*)	-
Produkcia fluoresceínu	-
Pyocyanín (**)	-
Rast v NaCl (6,5 % NaCl)	+
Hydrolýza Tweenu 80	-
Hydrolýza škrobu	-
Hydrolýza želatíny	-
Hydrolýza kazeínu	-
Redukcia dusičnanov	-
L-arabinóza	-
D-glukóza	+
Kyselina z xylózy	+
D-manóza	+
D-galaktóza	-
D-fruktóza	+
L-rhamnóza	-
D-trehalóza	-
Sacharóza	-
Maltóza	-
L-alanín	+

(*) farba kolónie a produkcia pigmentov overená na základnom živnom médiu Trypton soya agar (HiMedia Laboratories, India)
(**) produkcia pigmentu pyocyanínu overená na médiu King A (HiMedia Laboratories, India)

Charakteristika rezistencie kmeňa P. putida ZK-5

Senzitivita voči ATB: kmeň preukázal veľmi vysokú citlivosť (senzitivitu) voči antibiotikám amikacín, karbenicilín, cefotaxín, ceftazidím, ceftizoxím, ceftriaxon, doxycyklín, gatifloxacín (v ČR doposiaľ neregistrovaný), gentamicín, imipenem, kanamycín, levofloxacín, netilmicín (netilín), ofloxacín, roxitromycín, streptomycín, tetracyklín, tobramycín.

Rezistencia voči ATB: z testovaných antibiotík bol kmeň rezistentný voči antibiotikám ampicilín, bacitracín, cefalexín, erytromycín, ko-trimoxazol, lomefloxacín, meropenem, vankomycín, penicilín – G.

Rezistencia voči kovom: veľmi vysoká rezistencia (≥ 10 mM/l) voči iónom Li^{+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, a vysoká rezistencia voči As^{3+}, Cr^{4+}, Fe^{2+}.

Vplyv inokulácie kmeňa P. putida ZK-5 na uvoľňovanie As

Účinnosť lúhovania arzénu v skúmaných substrátoch pôsobením autochtónnej mikroflóry posilnenej biolúhovacími schopnosťami kmeňa *Pseudomonas putida* ZK-5 bola vyššia ako v prípade experimentu s *P. chlororaphis* ZK-1 a pohybovala sa v rozmedzí 4,03 - 18,55 hm. % (tab. 25). V prípade druhu *P. putida* ZK-5 bol však pozoruhodný vplyv naočkovaného kmeňa oproti len samotnej autochtónnej mikroflóre. Naočkovaním vzoriek kmeňom *P. putida* ZK-5 sa uvoľnilo v priemere takmer 2-násobne viac arzénu ako pôsobením iba autochtónnych druhov.

Tab. 25 Výsledky biolúhovania As z pôdno-popolových substrátov po inokulácii kmeňa *Pseudomonas putida* ZK-5 (priemerné hodnoty)

Vzorka	As_{Tot}	Množstvo uvoľneného arzénu vo výluhoch (*n* = 4)			Obsah arzénu v kontrolných výluhoch*(*n* = 1)		
	$mg.kg^{-1}$	$\mu g.l^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	%	$\mu g.l^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	%
1	264	179,54	17,95	6,80	91,52	9,15	3,47
2	93	172,48	17,25	18,55	56,22	5,62	6,05
3	193	166,64	16,66	8,63	46,81	4,68	2,43
4	230	218,24	21,82	9,49	34,42	3,44	1,50
5	634	255,37	25,54	4,03	71,95	7,20	1,13
6	377	296,64	29,66	7,87	208,14	20,81	5,52

* pôsobenie samotnej autochtónnej mikroflóry, kontrolné výluhy obsahovali len vzorku substrátu zaliatu čistým živným médiom bez bakteriálneho inokula

Novou a aktuálnou problematikou je aj význam rodu *Pseudomonas* v biovolatilizácii. Zhang et al. (2012) izolovali z morského prostredia baktériu *Pseudomonas putida* SP1, ktorá preukázala vysokú hladinu rezistencie voči ortuti i ďalším kovom (Co, Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) a taktiež voči antibiotikám. Z výsledkov volatilizačných testov s využitím atómovej absorpčnej spektrometrie autori uvádzajú, že izolovaný kmeň *P. putida* SP1 môže volatilizovať takmer 100 % z celkovej ortuti, ktorej bol kmeň vystavený. Uvedené výsledky sú prakticky významné pre štúdium bioremediácie morského prostredia.

Podiel kmeňa *Pseudomonas stutzeri* NT-1 na biotransformácii selénu uvádza Kagami et al. (2013). Získané výsledky porovnávajú autori s účinnosťou ďalších bakteriálnych kmeňov. V tejto štúdii bolo preukázané, že kmeň *P. stutzeri* NT-1 je schopný relevantnej biovolatilizácie selénu prostredníctvom metylovaných zlúčenín v niekoľkonásobne vyššej miere ako porovnávané bakteriálne druhy. Baktéria NT-1 transformovala selén na zlúčeniny

dimetyldiselenid a dimetylselenid. Oxidačný stupeň selénu nemal vplyv na výsledok biovolatilizačného procesu.

V roku 2013 Chen et al. predložili štúdiu, ktorej cieľom bolo využitie transgénneho kmeňa *P. putida* KT2440 k odstráneniu toxického arzénu z kontaminovanej pôdy (Chen et al., 2013). Genotyp kmeňa *P. putida* KT2440 bol modifikovaný vložením transgénu *arsM* pre expresiu enzýmu S-adenozylmetionín-methyl-transferázy pôvodom zo zelenej riasy *Chlamydomonas reinhardtii*. Rekombinantná baktéria výrazným spôsobom metylovala anorganický arzén na jeho menej toxické organozlúčeniny. Výsledky tejto štúdie sú významné pre bioremediáciu arzénu v oblasti životného prostredia a zníženia množstva arzénu v potravinách.

Prehľad ďalších kmeňov rodu *Pseudomonas*, ktoré boli doposiaľ študované v súvislosti s biovolatilizačnými procesmi uvádza tab. 26.

Tab. 26 Prehľad bakteriálnych kmeňov *Pseudomonas* a ich využitie k biovolatilizácii toxických kovov

Bakteriálny druh	Biovolatilizované kovy	Zdroj
Pseudomonas arsenitoxidans	As(III), As(V)	Santini et al. (2000)
Pseudomonas stutzeri NT-1	Se(IV), Se(VI)	Kagami et al. (2013)
Pseudomonas sp.	As(III), As(V), Se(IV)	Shariatpanahi et al. (1981)
Pseudomonas fluorescens	As(V), As(III)	Honshopp et al. (1996)
Pseudomonas fluorescens Tar3	Se(IV), Se(VI)	Siddique et al. (2007)
Pseudomonas fluorescens K27	Sb(III),Te(II)	Gürleyük et al. (1997), Basnayake et al. (2001)
Pseudomonas putida SP1	Hg(I)	Zhang et al. (2012)
Pseudomonas putida KT2440	As(III)	Chen et al. (2013)
P. chlororaphis ZK-1	As(III), V(I), Pb(I)	Šimonovičová et al. (2016)

5.2.2 Biolúhovanie As pôsobením autochtónnej mikroflóry a alochtónneho rodu *Rhodococcus*

Baktérie rodu *Rhodococcus* sú významné mikroorganizmy, a to hlavne vďaka svojím mimoriadnym metabolickým vlastnostiam. Genóm baktérií je vybavený veľkými lineárnymi plazmidmi nesúcimi gény, ktoré kódujú enzýmy schopné degradovať celú škálu cudzorodých a prirozene sa vyskytujúcich zlúčenín, z ktorých niektoré môžu predstavovať dlhodobé riziko pre životné prostredie (Larkin et al., 2006; Bell et al., 1998). Bioremediačný potenciál rodu *Rhodococcus* je obrovský a je známe, že produkty jeho metabolizmu sú karotenoidy, biologicky aktívné látky, organické kyseliny a ďalšie látky (Gürtler et al., 2010).

Taxonómia rodu Rhodococcus

Taxonomické postavenie bakteriálneho rodu *Rhodococcus* v systéme prokaryot nie je doposiaľ celkom jednoznačne vymedzené a je sprevádzané celým radom zmien na úrovni zaradenia rodu ako aj jeho jednotlivých druhov. Aktuálne platná taxonómia rodu vychádza z jeho doteraz známeho fylogenetického postavenia (Sedláček, 2007; databáza GenBank 2016):

Doména: *Bacteria*
Kmeň: *Actinobacteria*
Trieda: *Actinobacteridae*
Rad: *Actinomycetales*
Podrad: *Corynebacterineae*
Čeľaď: *Nocardiaceae*
Rod: *Rhodococcus*

Taxonomické radenie rodu *Rhodococcus* bolo navrhnuté na základe štúdia 92 charakteristických znakov aktinomycét, ktoré boli do tohto rodu zaradené podľa svojej percentuálnej podobnosti (Goodfellow et al., 1977). Skúmané charakteristiky zahrňovali predovšetkým základné morfologické vlastnosti, ďalej utilizačné skúšky, toleranciu k inhibičným zlúčeninám, rezistenciu k rôznym druhom antibiotík, schopnosť rastu v rôznych teplotách a pri rôznej hodnote pH, a mnoho ďalších biochemických testov. Podrobnejšie taxonomické štúdie zahŕňali ešte ďalšie fyziologické analýzy, napríklad využívanie fluorogénnych substrátov k detekcii špecifických enzymatických aktivít (Bell et al., 1998; Googfellow et al., 1990).

Základom reklasifikácie a súčasnej reorganizácie taxonómie bakteriálneho rodu *Rhodococcus* sú genomické štúdie s využitím sekvenčnej analýzy konkrétnych oblastí genómu, predovšetkým 16S rDNA, ktorej stupeň homológie vyjadruje príbuznosť jednotlivých druhov (Bell et al., 1998). Génové sekvencie 16S rDNA sú teraz k dispozícii pre všetky platne popísané druhy *Rhodococcus*. Ich podrobné štúdium ukázalo, že rod *Rhodococcus* tvorí relatívne odlišné kmene, ktoré možno rozdeliť do celkovo piatich samostatných skupín (obr. 28) (Rainey et al., 1995). Prvá skupina obsahuje *R. erythropolis*, *R. glomerulus*, *R. marinonascens* a *R. opacus*, druhá obsahuje *R. rhodochrous*, *R. ruber* a *R. coprophilus* a kmene *R. rhodnii*, *R. fascians* a *R. equi* tvoria každý svoju vlastnú odlišnú vetvu fylogenetického stromu. Autori štúdie takisto dospeli k záveru, že rod *Nocardia* sa skôr vyvinul v rámci rodu *Rhodococcus* ako vedľa neho. Pri ďalšom skúmaní sa zistilo, že druh *R. zopfii* sa nachádza v skupine *R. rhodochrous*, zatiaľ čo *R. percolatus* náleží do skupiny *R. erythropolis* (Briglia et al., 1996). V súčasnosti je názov rodu *Rhodococcus* plne uznaný v schválenom zozname bakteriálneho názvoslovia (*Approved List of Bacterial Names*) ako aj

v aktuálnom vydaní *Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology* (Jones a Goodfellow, 2012), kde je doposiaľ popísaných 30 druhov tohto rodu (Skerman et al., 1980; Gürtler a Seviour, 2010; Jones a Goodfellow, 2012).

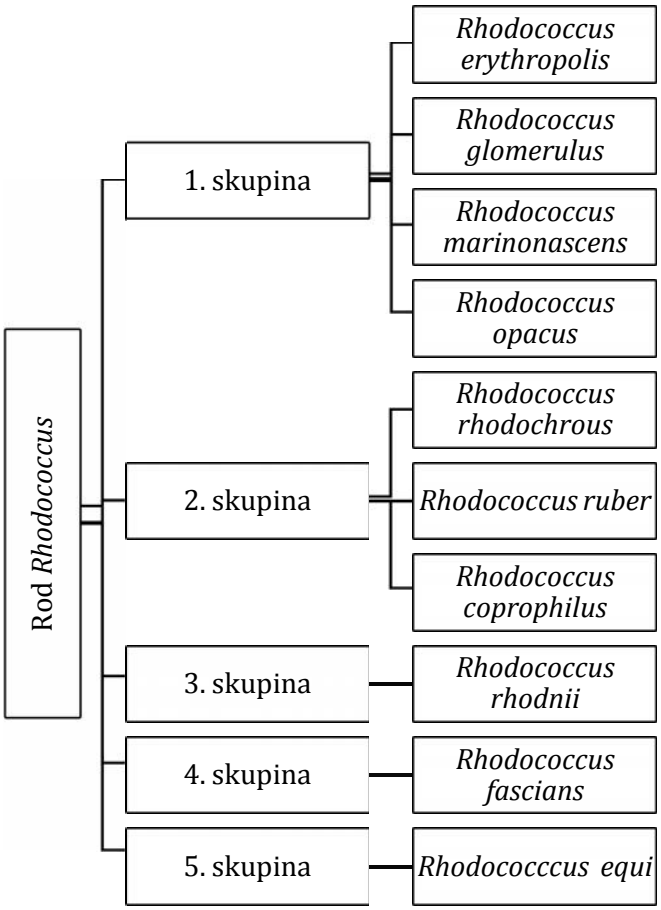
Fyziologické vlastnosti rodu

Baktérie rodu *Rhodococcus* sú prevažne gram-pozitívne baktérie (ale taktiež môžu byť gram-variabilnými druhmi baktérií), sú nepohyblivé, aeróbne, chemoorganotrofné s oxidačným metabolizmom, schopné využívať všeobecne celú radu organických zlúčenín ako jediný zdroj uhlíka a energie. Väčšinou sú acidorezistentné. Zástupci rodu sa môžu vyskytovať vo forme tyčiniek, kokov a dokonca v závislosti na morfologických zmenách sa u starších kultúr môže vytvárať i silno vetvené substrátové mycélium (Vojtková et al., 2012b). Farba nie je vždy červená. Sfarbenie kolónie sa môže líšiť v závislosti na druhu i kultivačných podmienok. Známe sú farebné variety- od bezfarebných cez žltohnedé, krémové, žlté, oranžové až po lososové odtiene (Goodfellow et al., 1998; Gürtler a Seviour, 2010).

Zástupcovia bakteriálneho rodu *Rhodococcus* sú v prostredí veľmi rozšírení. Izolovali sa z veľkého množstva prírodných zdrojov, vrátane kontaminovaných zemín a odpadových substrátov, povrchových i podzemných vôd a z morských sedimentov. Nájdení a vyizolovaní boli taktiež z extrémneho prostredia, napríklad zo suchých púštnych oblastí, z podzemnej vody s nízkym obsahom O_2 (Kuyukina a Ivshina, 2010), zo vzduchu ruskej kozmickej stanice Mir (Li et al., 2004), i z kalov odpadových vôd ako baktérie degradujúce karbandazím (Wang et al., 2010).

Baktérie *Rhodococcus* sú často izolované z prostredia, kde sú prítomné uhľovodíky. Niektoré druhy, najmä *R. rhodochrous* a *R. ruber*, preukázali schopnosť rastu i v prítomnosti plynných uhľovodíkov (propán, bután, acetylén), ktoré využívajú ako vhodný zdroj uhlíka (Ivshina et al., 1994). Niektoré druhy rhodokokov sú schopné degradovať taktiež alifatické a polycyklické uhľovodíky, pyridín, steroidy, lignín, chlórované fenoly, nitrované aromatické zlúčeniny, niektoré pesticídy, dibenzothiofén či pentachlórfenol (De Carvalho et al., 2014). Tieto kmene môžu byť biotechnologicky využívané pre produkciu enzýmov, ktoré slúžia k transformácii xenobiotík (Morton et al., 2001). Vlastnosti rezistencie baktérií *Rhodococcus* a ich metabolické schopnosti k degradácii všetkých týchto látok sú spojené s vlastnosťami genómu, predovšetkým s neobvyklou prítomnosťou viac homológnych katabolických génov vrátane prítomnosti veľkých lineárnych plazmidov (Larkin et al., 2005; De Carvalho et al., 2014). Pri rode *Rhodococcus* boli taktiež zistené plazmidy zabezpečujúce odtok kovových iónov (Sekine et al., 2006; De Carvalho et al., 2014). Veľký počet z nich sú plazmidy konjugatívne alebo mobilizovateľné (Letek et al., 2010). Štúdiom katabolických plazmidov pri druhoch *R. jostii* RHA1 a *R. erythropolis* BD2 bola

potvrdená funkcia niekoľkých transportérov zapojených do exportu kovových iónov (As, Cd, Cu a Hg). Gény pre transport ťažkých kovov však môžu byť taktiež súčasťou nukleotidu a mnohé z nich boli preukázané ako substrátovo zmiešané pre mnoho rôznych zlúčenín (Dabbs a Sole, 1988; Stecker et al., 2003).



Obr. 28 Schéma súčasného taxonomického členenia bakteriálneho rodu *Rhodococcus* (Rainey et al., 1995)

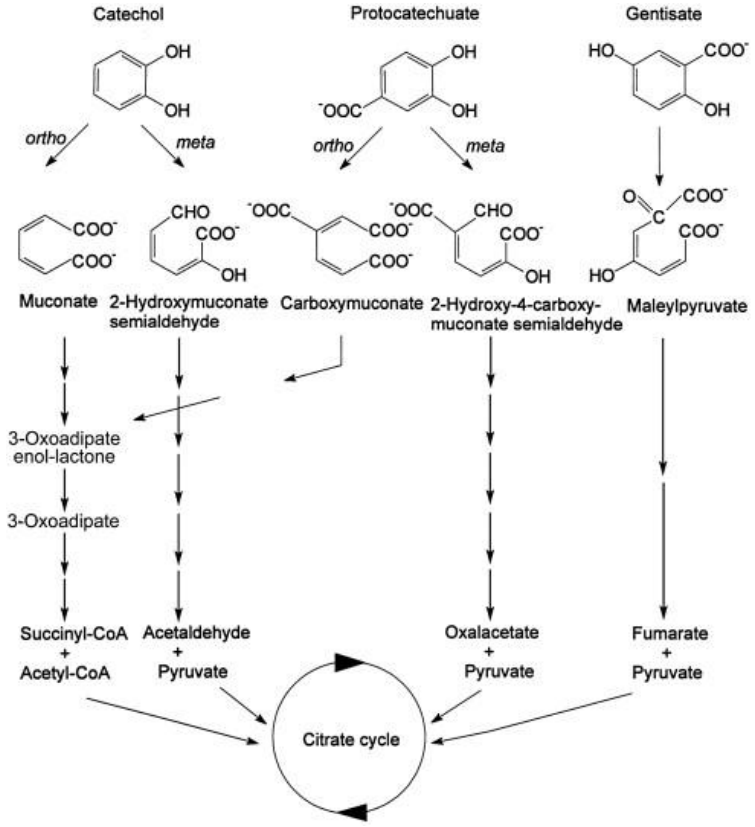
Zástupcovia druhov *Rhodococcus* sú využívaní v procesoch moderných biotechnológií – v priemyselných syntézach a transformáciách. V posledných rokoch dochádza k rozvoju v oblasti klonovacích vektorov, ktoré umožňujú prenos génov v rámci tohto rodu, ale taktiež medzi rodom *Rhodococcus* a inými bakteriálnymi druhmi – napríklad medzi baktériami *Escherichia coli* (Shao et al., 1995; Whyte et al., 2002). S využitím transgénnych manipulácií na molekulárnej génovej úrovni sa využívajú užitočné fenotypové znaky zaujímavých druhov *Rhodococcus*, ktoré môžu byť prenášané aj na iné organizmy (Pei et al., 2014).

Zaujímavým príkladom biotechnologického využitia rhodokokov v praxi je kmeň *R. rhodochrous* J1, ktorý je v Japonsku firmou Nitto Chemistry Industry Company Ltd. využívaný k výrobe viac ako 30 000 ton akrylamínu ročne a ide tak o prvé úspešné priemyselné využitie baktérií *Rhodococcus* v chemickom priemysle (Tao et al., 2009). Vzhľadom k týmto preukázaným

metabolickým schopnostiam rhodokokov vzniká ďalšia možnosť biotechnologického využitia tohto rodu k produkcii celej rady významných látok, ako sú kyselina akrylová, rôzne amidy, vitamíny, nikotínamid a ďalšie látky chemického charakteru (Zhang et al., 2015).

Bioremediácia znečišťujúcich látok

Bioremediácia s využitím baktérií rodu *Rhodococcus* má veľký potenciál v účinnej obnove znečisteného prostredia, pretože ich schopnosť degradovať rôzne chemické zlúčeniny má veľký význam v prírodnej degradácii i cielenej bioremediácii týchto látok (tab. 27). Tento rod sa často prirodzene vyskytuje v rámci autochtónnej mikroflóry kontaminovaného prostredia, kde dokáže pretrvať i za veľmi nepriaznivých podmienok (Kuyukina a Ivshina, 2010). Medzi chemické znečisťujúce látky, ktoré môžu byť degradované týmto bakteriálnym rodom, patria aj perzistentné polycyklické aromatické uhľovodíky (PAH) a polychlórované bifenyly (PCB), ktoré sú považované za obzvlášť nebezpečné v životnom prostredí. Celá rada PCB je významne narušená a čiastočne degradovaná kmeňmi *R. rhodochrous*, *R. glomerulus*, *R. erythropolis* a ďalšími doposiaľ druhovo nezaradenými kmeňmi (Larkin et al., 2006; Martínková et al., 2009; Santo et al., 2013). Biodegradácia aromatických zlúčenín prebieha cez niekoľko centrálnych dráh na citrátový cyklus. Na obr. 29 sú znázornené základné dráhy katabolizmu aromatických zlúčenín pomocou bakteriálneho rodu *Rhodococcus*.



Obr. 29 Centrálne katabolické dráhy aromatických zlúčenín (Martínková et al., 2009)

Tab. 27 Prehľad významných fyziologických a biochemických vlastností baktérií *Rhodococcus* a ich aplikácia v biodegradačných procesoch

Významná vlastnosť	Prejav v prostredí	Výhody v bioremediácii	Zdroj
veľká katabolická diverzita	degradácia širokého rozsahu chemických látok, vrátane alifatických a aromatických uhľovodíkov a ich derivátov, oxygenátov a heterocyklických zlúčenín	komplexná biodegradácia ropy a priemyselných odpadov, biodegradácia xenobiotík	Warhurst a Fewson (1994); van der Geize a Dijkhuizen (2004); Martínková et al. (2009)
aeróbny a mikroaeróbny metabolizmus	perzistencia v prostredí s nedostatkom kyslíka	bioremediácia za extrémnych podmienok (napr. vysoká hustota pôdy, nedostatok pôdneho vzduchu, nedostatok živín, a i.)	Travkin et al. (2002); Vogt et al. (2004); Fahy et al. (2006; 2008a); Joshi et al. (2008)
rast v oligotrofnom prostredí	rast v obmedzenej prítomnosti živín, odolnosť voči nedostatku rastových látok	bioremediácia v prostredí s nízkym obsahom živín (v extrémnom prostredí podzemných vôd)	Ivshina et al. (1981); Warhurst a Fewson (1994); Elo et al., (2000); Mergaert et al. (2001); Priestley et al. (2006); Ohhata et al., (2007)
nízka produkcia katabolitov	biodegradácia kontaminantov nie je potlačovaná prítomnosťou ľahko asimilovateľných živín	bioremediácia v prostredí bohatom na organické látky (odpadové vody)	Warhurst a Fewson (1994)
prispôsobivosť hydrofóbnemu substrátu	hydrofóbny bunkový povrch, vysoká priľnavosť k uhľovodíkom a produkcia biosurfaktantov	rozšírenie biodegradácie hydrofóbnych znečisťujúcich látok	Lang a Philp (1998); Whyte et al. (1999)
tvorba biofilmu	priľnavosť na pevné povrchy, zrýchlená biodegradácia a transformácia kovov	možnosť aplikácie vo forme biokatalyzátorov	Sorkhoh et al. (1995); Di Lorenzo et al. (2005); Borin et al. (2006)
odolnosť proti stresovým podmienkam prostredia	termotolerancia, vysoká resistencia voči hodnote pH, ťažkým kovom a toxickým látkam	bioremediácia v extrémnych a v priemyselných podmienkach prostredia	Whyte et al. (1999); Bej et al. (2000); Aislabie et al. (2006); Ryu et al. (2006), Fahy et al. (2008b)
konkurencieschopnosť v prostredí	vysoká konkurencieschopnosť v spoločenstve (K-stratégovia)	dobre prežíva v konzorciu mikroorganizmov	Juteau et al. (1999); Margesin et al. (2003); Borin et al. (2006)
patogenita a antagonistické vlastnosti	nízky počet známych patogénnych druhov, nedostatok antagonistických vlastností, väčšina druhov je bezpečná pre rastliny	remediácia biologicky bezpečná pre človeka i pre životné prostredie	Bell et al. (1998); Nagy et al. (1995); Uroz et al. (2003); Aoshima et al. (2007)

Známym príkladom biotransformácie kontaminantov pomocou rhodokokov je bioakumulácia toxických iónov kovov vrátane tých rádioaktívnych, ktoré môžu vo vnútri buniek všetkých organizmov tvoriť nešpecifické zlúčeniny negatívne ovplyvňujúce ich metabolizmus. Rôzne kmene rhodokokov môžu hrať významnú úlohu v ich odstraňovaní z odpadových vôd (Dean-Ross et al., 2001; Horáková, 2006; Seo et al., 2009; Janáková et al., 2011; Vojtková et al., 2012).

Vzhľadom k vyššie uvedeným zaujímavým charakteristikám baktérií môžu byť rhodokoky taktiež užitočnými biosenzormi. Rôzne štúdie uvádzajú informácie o začlenení rhodokokmi produkovaných enzýmov do účinných biopreparátov, ktorými je umožnená rýchla detekcia cieľových zlúčenín s hodnotením ich biologickej dostupnosti vrátane relatívnej environmentálnej toxicity. Rod *Rhodococcus* bol skúmaný v súvislosti s výskumom biosenzorov pre detekciu návykových drog, napríklad heroínu. Výskum prebiehal koncom 20. storočia vo Veľkej Británii (Bresler et al., 2000).

Patogénne vlastnosti rodu Rhodococcus

Niektoré druhy rodu *Rhodococcus* sú patogénne a spôsobujú celý rad infekcií vedúcich k ochoreniu rastlín, zvierat i ľudí. K najznámejším patogénom patrí druh *R. equi*, ktorý spôsobuje respiračné ochorenie popísané u žriebät vo veku 2 – 4 mesiacov (Bell et al., 1998; De Carvalho et al., 2014). Baktérie primárne spôsobujú infekcie horných dýchacích ciest, odkiaľ sa môžu rozšíriť taktiež na lymfatické uzliny, lymfatické tkanivá a črevá s doprevádzajúcimi horúčkami. Neliečená infekcia môže pomerne rýchlo postupovať a spôsobiť smrť zadusením. Infekcia šírená z pľúc do čriev vyvolává hnačky. Baktérie boli zistené v pôde a výkaloch mnohých živočíšnych druhov – dobytok, mačky, kozy, kone, psy, jelene, králiky, ovce, vačice, holuby, sliepky a prasatá (Ren a Prescott, 2004; Ribeiro et al., 2005). Okrem pľúc môžu baktérie prenikať i do ďalších orgánov a tkanív, v poranených miestach následne bránia hojivým procesom a podnecujú vznik vredov (potvrdené u dobytka, prasiat, oviec a kôz) (Lűhrmann et al., 2004; Giguére et al., 2011). Ochorenia spôsobené baktériami *R. equi* boli zistené taktiež u ľudí, a to u pacientov s oslabenou imunitou, hlavne u osôb po transplantácii, či s chorobou AIDS, a u ktorých vznikajú nekrotizujúce pneumónie a vážne defekty kože (Watanabe et al., 2000; Ribeiro et al., 2011). Ďalším známym patogénom je *R. glomerulus*, ktorý bol zaznamenaný ako pravdepodobná príčina pooperačných komplikácií po laserovej korekcii zraku (Votava, 2003). Baktérie *R. fascians* vyvolávajú ochorenia krytosemenných i nahosemenných rastlín. Infikované rastliny vykazujú typické príznaky deformácie listov, stoniek a rôzných postranných výhonkov. Ochorenie je známe pod označením „listové hálky“ (obr. 30). Fytopatogenita *R. fascians* súvisí s rýchlosťou expresie bakteriálnych génov pre produkciu toxických zlúčenín, ktoré negatívne ovplyvňujú normálny rast a vývoj rastlín (Goethals et al., 2001; Stes et al., 2010).

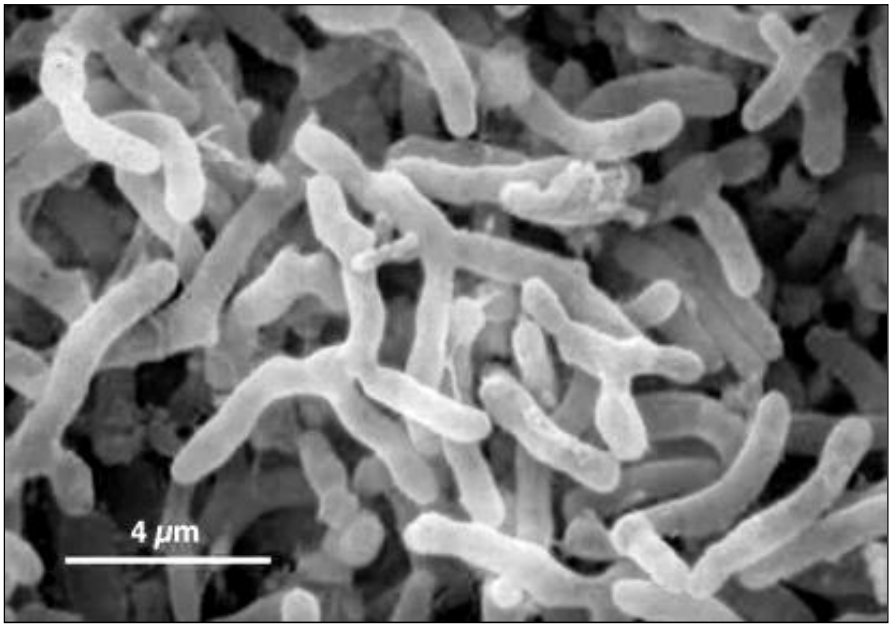


Obr. 30 Príklady infekcií rastlín baktériami *Rhodococcus fascians* (Stes et al., 2010)

Rastlinné infekcie spôsobené *R. fascians* sú známe po celom svete, najviac sú však pozorované v oblastiach mierneho pásma. V súčasnej dobe je známa citlivosť na infekcie spôsobené *R. fascians* u 164 druhov rastlín zahrňujúce byliny i dreviny (Stes et al., 2013). Rastliny môžu byť infikované zo znečistenej pôdy a vody, pri množení zo semien i vegetatívnym rozmnožovaním alebo prostredníctvom prenosu hmyzom (Putnam a Miller, 2007). Účinná metóda k odstráneniu infekcie doposiaľ nebola objavená, preto sú pestovatelia rastlín odkázaní v rámci prevencie nákazy len na osvedčené hygienické postupy.

Biolúhovanie As pôsobením autochtónnej mikroflóry a alochtónneho kmeňa Rhodococcus degradans

Po morfologickej stránke tvorí *R. degradans* grampozitívne, nepohyblivé a nesporulujúce krátke baktérie tyčinkovitého tvaru, ktoré môžu u vyzretých kultúr prechádzať až v ľahko vetviace sa tyčinky s priemernou veľkosťou buniek 0,5 – 3,5 μm. Bunky sa môžu objavovať jednotlivo alebo v nepravidelných skupinách, niekedy tetrád alebo zväzkov. Na pevnom médiu TSA baktérie vytvárajú guľaté, hladké, lesklé a ploché kolónie so súvislým okrajom a svetlo lososovou farbou o rozmeroch 2 – 4 μm (obr. 31, 32).

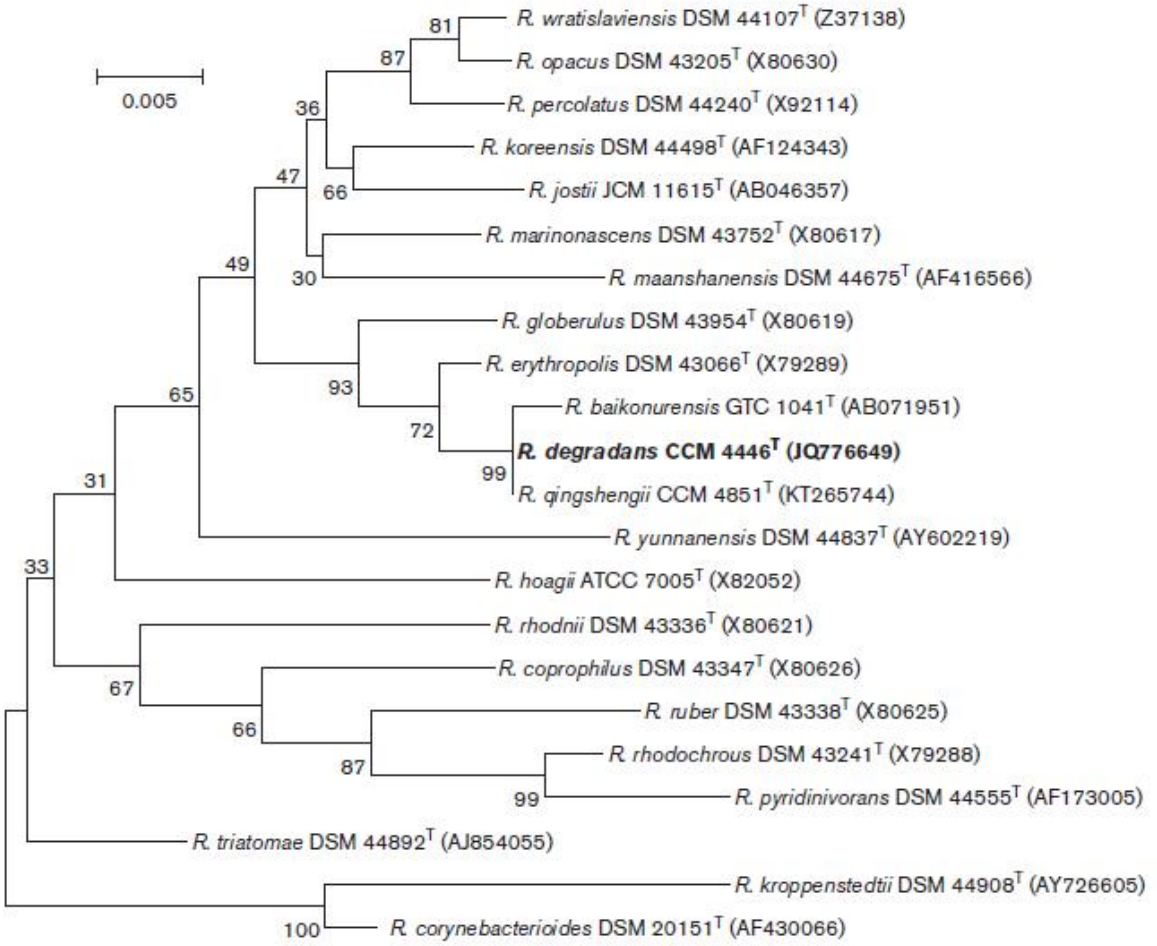


Obr. 31 Morfológia buniek *Rhodococcus degradans* použitím skenovacieho elektrónového mikroskopu SEM (Vojtková, autorská fotografia, 2011)

Bakteriálny kmeň *Rhodococcus degradans* CCM 4446 použitý v tejto štúdii bol získaný z CCM – Českej zbierky mikroorganizmov pri Prírodovedeckej fakulte Masarykovej univerzity v Brne. Kmeň bol pôvodne izolovaný vo Švajčiarsku z pôdy kontaminovanej organickými znečisťujúcimi látkami s obsahom polychlórovaných bifenylov (Damborský a Koča, 1999) a bol zaradený do rodu *Arthrobacter*. Pôvodné taxonomické zaradenie bolo podrobené rozsiahlym genotypovým štúdiom v roku 2016. Fylogenetická pozícia kmeňa bola overovaná využitím génov *gyrB* a *catA*, u ktorých bolo dokázané, že sú vhodné alternatívne fylogenetické markery pre rozlišovanie rodu *Rhodococcus* do jednotlivých druhov (Táncsics et al., 2014). Podrobnejšia analýza génov preukázala, že kmeň *R. degradans* patrí ku skupine *Rhodococcus erythropolis* (Jones a Goodfellow, 2012) s najbližšou sekvenčnou podobnosťou k baktériám *R. qingshengii*, *R. baikonurensis* a *R. globerulus* (Švanová, 2014; Švec et al. 2015). Aktuálna fylogenetická pozícia *R. degradans* na základe sekvenacie génu pre 16S rRNA je vyjadrená na obr. 33 (Švec et al., 2015).



Obr. 32 Nárast bakteriálneho kmeňa *R. degradans* na živnom médiu TSA (Vojtková, autorská fotografia, 2011)



Obr. 33 Fylogenetická pozícia *R. degradans* na základe sekvenácie génu pre 16S rRNA

Biodegradačné schopnosti baktérie *R. degradans* CCM 4446 boli skúmané v mnohých prácach dokumentujúcich jej významné fyziologické funkcie v biodegradácii toxických organických látok zo životného prostredia. Kmeň už skôr preukazoval schopnosť degradácie polychlórovaných bifenylov a nízkomolekulárnych polycyklických aromatických uhľovodíkov (Janáková et al., 2011; Janáková a Vojtková, 2012; Kašáková et al., 2012; Vojtková et al., 2013; Vojtková a Švanová, 2014). Zistilo sa, že produkuje dehalogenázy, ktorými degraduje väzbu medzi uhlíkom a halogénom v halogénovaných alifatických zlúčeninách cez hydrolytický mechanizmus (Scholtz et al., 1988; Damborský a Koča, 1999; Damborský et al., 1997; Poelarends et al., 2000; Martínková et al, 2009). Kmeň bol aplikovaný v procesoch čistenia odpadových vôd z textilnej výroby, obsahujúcich vysoký podiel toxických kovov pochádzajúcich z farbenia textilu a pigmentačných procesov, dispergačné činidlá, anorganické soli, prach-redukujúce látky, zahusťovacie činidlá a pufry (Vojtková et al., 2012). S výnimkou tejto práce, na degradáciu anorganických látok, predovšetkým toxických kovov, bol však kmeň testovaný len veľmi obmedzene (Peťková et al., 2013; Švanová et al., 2015). Z výsledkov testovania baktérie voči iónom kovov boli zistené maximálne hodnoty tolerancie (v koncentrácii kovu 10 mM) pre ióny

kovov Mg^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Li^{+}, Te^{4+}, Bi^{3+}, Se^{+}, naopak najnižšiu odolnosť (v koncentrácii kovu 1 mM) vykázal kmeň pre ióny kovov Cr^{6+} a Tl^{+} (Švanová, 2016). Pri porovnávaní ďalších fenotypových vlastností kmeňa *R. degradans* s údajmi publikovanými k taxonomicky najbližším príbuzným kmeňom – *R. baikonurensis, R. jialingiae,*, *R. qingshengii* djl-6, *R. erythropolis* a *R. glomerulus* (Gray a Thornton, 1928; Goodfellow et al., 1982; Li et al., 2004; Xu et al., 2007; Wang et al., 2010) sa zistili taktiež rozdiely v biochemických reakciách a reakciách rezistencie voči základným antibiotikám (Švanová, 2014; Švanová, 2016).

Rhodococcus degradans CCM 4446 predstavuje alochtónny, čiže nepôvodný kmeň, ktorý bol izolovaný z pôdy kontaminovanej organickými polutantmi a aplikovaný na vzorky technozemí z lokality Zemianske Kostoľany. Podrobnejšie výsledky biochemickej fenotypizácie s využitím prístroja Biolog™ MicroStation (MicroLogIII 4.20.05) sú prehľadne uvedené v tab. 28.

Tab. 28 Vybrané fenotypové vlastnosti druhu *Rhodococcus degradans* CCM 4446

Biochemické charakteristiky	*Rhodococcus degradans* CCM 4446
Farbenie podľa Grama (*)	+
Farba kolónie (*)	svetlo lososová
Rast pri 4°C	-
Rast pri 37°C	+
Rast pri 41°C	-
Pigmentácia (*)	+
Rast v NaCl (10% NaCl)	-
Hydrolýza Tweenu 80	-
Hydrolýza škrobu	-
Hydrolýza želatíny	-
Hydrolýza kazeínu	-
Redukcia dusičnanov	-
L-arabinóza	-
D-glukóza	+
Kyselina z xylózy	+
D-manóza	+
D-galaktóza	-
D-fruktóza	+
L-rhamnóza	-
D-trehalóza	-
Sacharóza	-
Maltóza	-
L-alanín	-

(*) farba kolónie a produkcia pigmentov overená na základnom živnom médiu Trypton soya agar (HiMedia Laboratories, India)

Vplyv inokulácie kmeňa Rhodococcus degradans CCM 4446 na uvoľňovanie As

Pôsobením kmeňa *Rhodococcus degradans* CCM 4446 spolu s autochtónnou mikroflórou sa uvoľnilo 3,57 – 50,87 hm. % arzénu z celkových obsahov v závislosti od lúhovaného substrátu (tab. 29), pričom najlepšie výsledky boli dosiahnuté vo vzorke č. 4. Zaujímavým výsledkom bolo zistenie menšej účinnosti lúhovania arzénu aplikovaním kmeňa *Rhodococcus* voči samotnej autochtónnej mikroflóre vo vzorke č. 6 (podobne ako vo vzorke č. 1 v pokuse s *P. chlororaphis*, tab. 23). Zo získaného výsledku vyplýva veľmi silná aktivita autochtónnej mikroflóry, ktorá je podporená pravidelným obrábaním pôdy a pravdepodobne aj dominanciou arzén-rezistentných kmeňov. Pridaním nutričných látok vo forme živného média bola podporená rastová fáza autochtónnych kmeňov – tieto mikroorganizmy následne vplyvom svojej početnosti a adaptačných schopností na prítomnosť toxických substancií v substráte celkom potlačili vitalitu aplikovaného kmeňa, čo sa vo výsledku prejavilo aj znížením celkovej biolúhovacej aktivity vo vzorkách obohatených o kmeň *Rhodococcus degradans* CCM 4446. (tab. 29).

Tab. 29 Výsledky biolúhovania As z pôdno-popolových substrátov po inokulácii kmeňa *Rhodococcus degradans* CCM 4446 (priemerné hodnoty)

Vzorka	As_{Tot}	Množstvo uvoľneného arzénu vo výluhoch (n = 4)			Obsah arzénu v kontrolných výluhoch* (n = 1)		
	$mg.kg^{-1}$	$\mu g.l^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	%	$\mu g.l^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	%
1	264	291,48	29,15	11,04	93,08	9,31	3,53
2	93	163,53	16,35	17,58	102,71	10,27	11,04
3	193	453,94	45,39	23,52	72,05	7,21	3,73
4	230	1170,00	117,00	50,87	187,03	18,70	8,13
5	634	344,79	34,48	5,44	213,76	21,38	3,37
6	377	134,63	13,46	3,57	151,76	15,18	4,03

* pôsobenie samotnej autochtónnej mikroflóry, kontrolné výluhy obsahovali len vzorku substrátu zaliatu čistým živným médiom bez bakteriálneho inokula

Rhodococcus degradans CCM 4446 preukázal zo skúmaných bakteriálnych kmeňov najvyššiu fyziologickú odolnosť voči vysokému obsahu toxického arzénu v pôdno-popolových substrátoch a prejavil schopnosť jeho biolúhovania do roztoku. I cez inhibičný efekt vyvolaný aktivitou autochtónnych mikroorganizmov v niektorých vzorkách možno považovať kmeň za účinný, pretože zvýšil efekt biolúhovania oproti len samotnej autochtónnej mikroflóre. Preukázané fyziologické schopnosti predurčujú bakteriálny kmeň *Rhodococcus degradans* CCM 4446 pre využitie v moderných biotechnologických procesoch regenerácie životného prostredia.

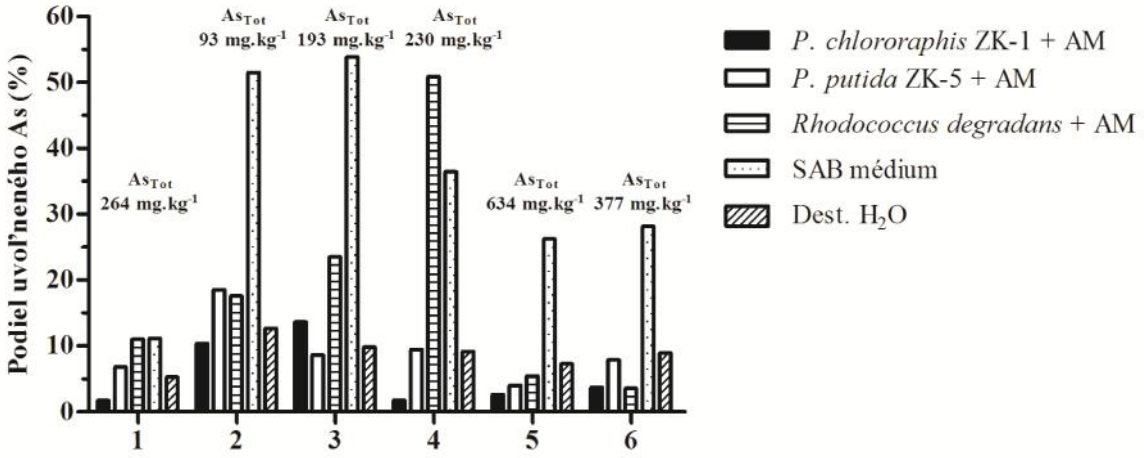
5.2.3 Biostimulácia a bioaugmentácia autochtónnych mikroorganizmov – účinný nástroj bioremediácie technozemí kontaminovaných arzénom

Vďaka pilotným biolúhovacím experimentom bolo možné zhodnotiť potenciálne využitie mikroorganizmov v bioremediácii dlhodobo kontaminovaných pôd na modelovej lokalite Zemianske Kostoľany z viacerých možností. Kľúčovým faktorom pre sanáciu takýchto pôd je, že hoci prítomné (polo)kovy (hlavne arzén) nie sú biologicky degradovateľné, ich prítomnosť a mobilita môžu byť zmenené vplyvom sorpcie, metylácie, komplexácie a zmenami v špeciácii.

Realizáciou biolúhovacích experimentov sa sledovala účinnosť extrahovania As z pôdno-popolových substrátov prostredníctvom biostimulácie pôdnej mikrobioty živným médiom a bioaugmentácie vybranými druhmi mikroorganizmov s predpokladanými vlastnosťami urýchliť odstraňovanie arzénu z kontaminovaných pôd. Bioaugmentácia bola realizovaná dvoma spôsobmi. Prvým spôsobom bolo aplikovanie kmeňov, ktoré sú prirodzene prítomné v daných vzorkách (*P. chlororaphis* a *P. putida*), keďže inokulácia prispôsobených mikrobiálnych populácií izolovaných z kontaminovanej oblasti alebo odpadu je výhodná z hľadiska vyššej odolnosti voči extrémnym podmienkam prostredia a dokonca aj predácii prvokov (Hamer, 1997). Experimenty sa opierali o hypotézu, že zvýšenie hustoty špecifického mikrobiálneho druhu, ktorý je veľmi dobre prispôsobený podmienkam prostredia spolu s prídavkom živín, zníži čas potrebný na odstránenie As, resp. zvýši rýchlosť odstránenia As zo substrátov. Druhým spôsobom bola inokulácia alochtónneho (nepôvodného) druhu – *Rhodococcus degradans* CCM 4446. Pri uvedených druhoch mikroorganizmov treba mať na pamäti, že nejde len o účinok samotného druhu, ale o podiely As uvoľnené do živného média vplyvom posilnenia autochtónnej mikroflóry (AM) v substrátoch o daný druh – bioaugmentácia sprevádzaná biostimuláciou v podobe pridaného živného média. Účinnosť uvoľňovania As pomocou len samotnej autochtónnej mikrobioty bola sledovaná aplikovaním vybraného živného média SAB (Sabouraud médium) na vzorky technozemí – biostimulácia. Pre porovnanie účinnosti biologického a chemického lúhovania sú v obr. 34 uvedené aj výsledky lúhovania substrátov s destilovanou vodou.

Z výsledkov biolúhovacích experimentov vyplýva, že v prípade použitia SAB média je veľmi zaujímavý podiel uvoľneného arzénu vo výluhoch, čiže vplyv len autochtónnej mikroflóry. V priemere až 34,73 hm. % As sa extrahovalo biostimuláciou pôvodnej mikroflóry so SAB živným médiom. Vysoká účinnosť uvoľneného As zo vzoriek súvisela pravdepodobne s chemickým zložením SAB živného média, ktoré obsahovalo až 20 $g.l^{-1}$ dextrózy (D-glukózy). Použitie biostimulácie pre urýchlenie dekontaminácie pôd pilotného územia podporujú aj výsledky experimentov na rovnakých pôdno-popolových vzorkách prezentované v práci Slebodníková (2014), kde boli pre zhodnotenie biolúhovania As použité dva typy živných médií – SAB médium a SAB médium obohatené o glukózu. Pridanie ďalšieho zdroja uhlíka vo forme

glukózy malo pozitívny vplyv na rast biomasy a podporená aktivita mikroorganizmov výrazne zvýšila extrahovateľnosť As.



Obr. 34 Grafické vyjadrenie porovnania účinnosti lúhovania arzénu (% z celkového obsahu) z reprezentatívnych vzoriek technozemí (1-6) aplikovaním vybraných mikroorganizmov, AM – autochtónna mikroflóra

Zefektívnenie procesu biolúhovania pridaním glukózy pre aktivovanie autochtónnych heterotrofných baktérií pozorovali aj Jablonovská et al. (2012). Biolúhovateľnosť ťažkých kovov v médiu bez glukózy prvých 10 dní narastala, ale po vyčerpaní dostupnej organickej hmoty klesol obsah kovov v roztoku. V prípade média s pridaním glukózy bola maximálna extrahovateľnosť ťažkých kovov pozorovaná po 27 dňoch a bola niekoľkonásobne vyššia ako v prípade média bez glukózy.

Hockenhull et al. (1954) uvádzajú glukózu ako vhodný zdroj uhlíka pre zvýšenú produkciu organických kyselín u kmeňa *Penicillium chrysogenum*. Jedným z hlavných dôvodov použitia glukózy je, že predstavuje monosacharid, ktorý je priamo oxidovaný na organické kyseliny (deFiebre a Knight, 1953), zatiaľ čo napr. sacharóza je disacharid, ktorý sa najskôr musí oxidovať na monosacharid a až potom je oxidovaný na organické kyseliny, pričom nie všetky sacharózy sú dôkladne oxidované. Xu a Ting (2004) zistili, že práve koncentrácia sacharózy patrila k dôležitým faktorom, ktoré ovplyvňujú lúhovateľnosť kovov z polietavého popola pri experimente s mikroskopickou hubou *A. niger*. V priebehu rastu huby je totiž sacharóza premenená na fruktózu a glukózu. Konečným produktom je kyselina citrónová alebo glukónová, ktoré sú veľmi dôležité v procese biolúhovania.

V prípade baktérií nebolo posilnenie autochtónnej mikroflóry o druhy izolované z daných substrátov až také účinné a výrazné ako sa očakávalo. Spôsobené to mohlo byť nesprávnym

výberom reprezentatívnych kmeňov, ale aj vplyvom chemického zloženia živných médií, ktoré neobsahovali dostatočné množstvo živín pre zvýšenie aktivity mikroorganizmov v daných substrátoch. Hoci bola pôvodná mikroflóra posilnená o druh *P. chlororaphis* ZK-1 (kmeň izolovaný priamo z daných substrátov), biolúhovaním sa z celkového obsahu arzénu uvoľnilo v priemere len 5,63 hm. % (n = 24). V prípade aplikovania kmeňa *P. putida* ZK-5 (taktiež kmeň izolovaný z daných substrátov) bola síce účinnosť lúhovania arzénu podstatne vyššia ako v prípade *P. chlororaphis* ZK-1, v priemere 9,23 hm. % As z celkového obsahu (n = 24), no porovnateľný účinok lúhovania mala aj destilovaná voda, ktorou sa po 29 dňoch lúhovania extrahovalo v priemere 8,85 hm. % arzénu. Najvyššie podiely arzénu zo skúmaných substrátov sa zo všetkých vybraných kmeňov podarilo uvoľniť pôsobením alochtónneho druhu *Rhodococcus degradans* CCM 4446. Z celkového obsahu arzénu sa do výluhu uvoľnilo v priemere 18,67 hm. % (n = 24). Relatívne vysoký podiel vylúhovaného As po augmentácii vzoriek alochtónnym druhom *Rhodococcus degradans* dáva predpoklad aplikovania kmeňov, ktoré boli izolované v iných typoch kontaminovaného prostredia, ale vďaka svojej vysokej adaptačnej schopnosti a metabolizmu sa vedeli úspešne introdukovať do prostredia, konkurovať pôvodným druhom v boji o živiny a zvýšiť odstraňovanie arzénu z pôdy. Ďalšou možnosťou využitia pôvodných kmeňov je bioaugmentácia nie samotným jedným druhom, ale vytvorenie konzorcia zloženého z bakteriálnych alebo hubových kmeňov a jeho následná inokulácia do pôd. Výhodou vytvoreného konzorcia je vyššia odolnosť voči stresu ako v prípade aplikovania jedného kmeňa.

D'Annibale et al. (2006) hodnotili účinnosť bioaugmentácie pomocou autochtónnych druhov húb v pôdach, ktoré boli historicky kontaminované viac ako 100 rokov. Pôdy kontaminované aromatickými uhľovodíkmi, vrátane chlórovaných benzénov, anilínov, tiofénmi a PAU, a súčasne obsahovali ťažké kovy, neboli dekontaminované pomocou alochtónnych kmeňov húb pravdepodobne z dôvodu zložitých charakteristík pôdy. Avšak, autochtónne kmene, ktoré sa považovali za prirodzenú súčasť znečisteného miesta dlhú dobu, vykazovali schopnosť degradovať vysoké koncentrácie kontaminantov v pôde.

Napríklad Hosokawa et al. (2009) uvádzajú, že alochtónne mikroorganizmy niekedy nie sú najvhodnejšie kmene pre bioaugmentáciu, aj keď mnohé boli izolované a opísané ako účinné v degradácii kontaminantov, pretože alochtónne mikroorganizmy pridané do pôdy majú tendenciu byť účinné len v skorých štádiách bioaugmentácie, počas ktorých je ich populácia najpočetnejšia. Dominancia jednotlivých kmeňov sa v pôde rýchlo stráca v dôsledku abiotických ako aj biotických stresov, pretože pridané mikroorganizmy takmer vždy čelia konkurencii pôvodných organizmov kvôli obmedzeným množstvám živín (Gentry et al., 2004).

Úspech bioaugmentácie závisí hlavne od schopnosti inokúl prežiť v kontaminovanej pôde. Pridanie živín môže viesť k zvýšenému rozvoju pôvodných mikroorganizmov, ktoré sami o sebe

buď biostimulujú proces alebo bránia procesu spotrebovaním pridaných živín alebo zdroja uhlíka (Scullion, 2006). Preto je nutné skúmať ako pridávanie živín tak aj mikroorganizmy určené pre odstránenie znečistenia.

Z výsledkov je zrejmé, že účinnosť biolúhovania arzénu je výrazne ovplyvnená druhovou diverzitou a vitalitou autochtónnych mikroorganizmov, keď jednotlivé druhy môžu byť v synergickom vzťahu s aplikovaným kmeňom a spolupodieľajú sa tak na koexistencii výsledných utilizačných dráh, prípadne v rámci kompetície podporujú rýchlosť biolúhovacieho procesu. Aj pri takých vysokých koncentráciách As, aké boli v pôdach analyzované, sú súčasťou spoločenstva mikroorganizmov rody (napr. *Pseudomonas*, *Bacillus* a *Rhodococcus*), ktoré možno považovať za adaptované na kontamináciu a vo viacerých prácach sa uvádzajú ako organizmy s vysokým bioremediačným potenciálom (Kapoor et al., 1999; Ivshina et al., 2002; Bento et al., 2005; Srivastava a Thakur, 2006; Čerňanský et al., 2006; Urík et al., 2007; Mukherjee et al., 2010; Vojtková a Janáková, 2011; Janáková a Vojtková, 2012; Vojtková et al., 2012a,b; Peťková et al., 2013; Peťková et al., 2014). Keďže sa bioremediácia realizuje hlavne v prirodzenom prostredí s rozmanitými nepopísanými organizmami, väčšina doteraz izolovaných a charakterizovaných mikroorganizmov v laboratórnych podmienkach, ktoré sú uvádzané ako významné v odstraňovaní znečisťujúcich látok, sa v súčasnosti považujú za menej dôležité z hľadiska prínosu pre bioremediáciu v porovnaní s dosiaľ neizolovanými alebo ťažko kultivovateľnými druhmi (Watanabe, 2001; Wagner a Loy, 2002).

6. ZÁVER

Technozeme v regióne Zemianske Kostoľany (západné Slovensko) predstavujú jedinečný systém 50 rokov starej ekologickej záťaže. Uvoľnenie približne 3 miliónov m^3 popola s vysokým obsahom arzénu (As) po pretrhnutí hrádze odkaliska v roku 1965 do okolitého prostredia významne ovplyvnilo nielen abiotické environmentálne aspekty ako sú pôdy, vody a dnové sedimenty, ale aj pôdne mikroorganizmy. Dlhodobá expozícia a selekčný tlak pôsobením zvýšenej koncentrácie arzénu ovplyvnili formovanie špecificky prispôsobených autochtónnych mikroorganizmov. Práca predstavuje komplexný súbor mineralogických, geochemických a mikrobiologických charakteristík špecifického antropogénneho substrátu, a to elektrárenských popolov pochádzajúcich zo spaľovania hnedého uhlia a pochovaných pod poľnohospodárskymi pôdami v pilotnom území Zemianske Kostoľany, ktoré patrí v dôsledku ekologickej havárie odkaliska k najviac znečisteným lokalitám na Slovensku. V rámci mikrobiologického výskumu sa posudzoval taktiež bioremediačný potenciál niektorých vybraných druhov mikroorganizmov uvoľňovať As do prostredia. Na základe výsledkov komplexného štúdia pochovaných elektrárenských popolov sa zistilo, že z potenciálne toxických stopových prvkov je v popoloch a v pôdach kontaminovaných popolmi výrazne zvýšený obsah As (od 93 do 1859 $mg.kg^{-1}$). Čerstvý aj pochovaný elektrárenský popol tvorí hlavne Si, Fe, Al a Ca, ďalej nasledujú Mg, K, Na, Ti a S. K identifikovanými minerálnym fázam v popoloch patrili kremeň, kalcit, mullit, živce, hematit, magnetit, kristobalit, rutil, svetlé sľudy, pyrotit, pyrit, montmorillonit a perovskit. Dominantnú zložku v reprezentatívnych vzorkách tvoria amorfné aluminosilikátové sklá - v priemere až 74 % a vyznačujú sa variabilným zastúpením Si, Al, Ca a Fe. Tieto sklovité fázy dokážu inkorporovať veľkú paletu potenciálne toxických stopových prvkov a sú hlavnou fázou obsahujúcou As. Najvyššie obsahy As boli zistené v najjemnejšej frakcii vzoriek (< 25 μm), v ktorej sa As viaže na agregáty nanočastíc tvorených Al, Si, Ca a Fe, menej na fázy tvorené Fe a Ca. Aj napriek vysokým obsahom As v pôdach bolo na lokalite izolovaných a identifikovaných niekoľko druhov baktérií. Najviac zastúpeným kmeňom bol *Proteobacteria* (60,9 %), kmeň *Firmicutes* tvoril 21,7 % zo všetkých izolátov. Kmeň *Actinobacteria* predstavoval 8,7 % a kmeň *Bacteroidetes* tvoril taktiež 8,7 % z izolovaných druhov. Aplikovaním vybraných druhov mikroorganizmov na pevné substráty v biolúhovacích experimentoch sa zistilo, že bioaugmentáciou substrátov autochtónnymi druhmi baktérií sa uvoľnili relatívne nízke obsahy arzénu – v priemere 5,63 hm. % z As_{Tot} v prípade aplikovaného *Pseudomonas chlororaphis* ZK-1. Inokuláciou druhom *Pseudomonas putida* ZK-5 sa uvoľnilo v priemere 9,23 hm. % z As_{Tot}. Relatívne vysoká extrahovateľnosť As bola zistená v prípade aplikovania alochtónneho kmeňa *Rhodococcus degradans* - v priemere takmer 19 hm. % z As_{Tot}. Biostimulácia pre zvýšenie aktivity pôdnej mikroflóry skúmaných pôdno-popolových vzoriek sa najvýraznejšie prejavila v prípade

použitia SAB média. Extrahovaný podiel arzénu bol v priemere až 34,73 hm. % z As_{Tot}. Okrem testovaných druhov v danej štúdii existuje mnoho iných mikrobiálnych druhov, ktoré predstavujú účinný nástroj v odstraňovaní arzénu aj prostredníctvom rôznych ďalších mobilizačných alebo imobilizačných procesov. Tieto procesy môžu významne ovplyvniť biologickú dostupnosť a toxicitu arzénu. Výsledky z pilotných laboratórnych experimentov ukázali, že odstraňovanie As vplyvom mikroorganizmov z pôd obsahujúcich popol s vysokými obsahmi As predstavuje účinnú metódu bioremediácie kontaminovaných lokalít.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Abaye, D.A., Lawlor, K., Hirsch, P.R., Brookes, P.C. (2005): Changes in the microbial community of an arable soil caused by long-term metal contamination. European Journal of Soil Science, 56, 1, 93-102.

Acevedo, F., Gentina, J.C. (1989): Process engineering aspects of the bioleaching of copper ores. Bioprocess Engineering, 4, 5, 223-229.

Adams, C.S., Mansfield, K.,. Perlot, R.L., Shapiro, I.M. (2001): Matrix regularion of skeletal cell apoptosis: role of calcium and phosphate ions. The Journal of Biological Chemistry, 276, 23, 20316-20322.

Adriano, D.C. (2001): Trace elements in terrestrial environments: Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer Verlag, Berlin, 1-867.

Adriano, D.C., Page, A.L., Elseewi, A.A., Chang, A.C., Straughan, I. (1980): Utilization and disposal of fly ash and other coal residues in terrestrial ecosystems: A review. Journal of Environmental Quality, 9, 3, 333-344.

Ahalya, N., Ramachandra, T.V., Kanamadi, R.D. (2003): Biosorption of heavy metals. Research Journal of Chemistry and Environment, 7, 4, 71-78.

Ahmad, A., Rautaray, D., Sastry, M. (2004): Biogenic calcium carbonate: calcite crystals of variable morphology by the reaction of aqueous Ca^{2+} ions with fungi. Advanced Functional Materials, 14, 11, 1075-1080.

Ainsworth, C.C., Mattigod, S.V., Rai, D., Amonette, J.E. (1993): Detailed physical, chemical, and mineralogical analyses of selected coal and oil combustion ashes. Palo Alto, California: Electric Power Research Institute. EPRI TR-101785, 1-86.

Ainsworth, C.C., Rai, D. (1987): Chemical characterization of fossil fuel combustion wastes. EPRI EA-5321. Electric Power Research Institute, Palo, Alto, 1-148.

Aislabie, J., Saul, D.J., Foght, J.M. (2006): Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. Extremophiles, 10, 171-179.

Akai, J., Kanekiyo, A., Hishida, N., Ogawa, M., Naganuma, T., Fukuhara, H., Anawar, H.N. (2008): Biogeochemical characterization of bacterial assemblages in relation to release of arsenic from South East Asia (Bangladesh) sediments. Applied Geochemistry, 23, 3177-3186.

Akhmetov, L.I., Filonov, A.E., Puntus, I.F., Kosheleva, I.A., Nechaeva, I.A., Yonge, D.R., Petersen, J.N., Boronin, A.M. (2008): Horizontal transfer of catabolic plasmids in the process of naphthalene biodegradation in model soil systems. [Article in Russian]. Mikrobiologiia, 77, 1, 29-39.

Aksu, Z. (2005): Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. Process Biochemistry, 40, 3-4, 997-1026.

Aksu, Z., Kutsal, T., Gun, S., Haciosmanoglu, S., Gholminejad, M. (1991): Investigation of biosorption of Cu(II), Ni(II), and Cr(VI) ions to activated sludge bacteria. Environmental Technology, 12, 10, 915-921.

Al-Abed, S.R., Jegadeesan, G., Purandare, J., Allen, D. (2007): Arsenic release from iron rich mineral processing waste: Influence of pH and redox potential. Chemosphere, 66, 4, 775-782.

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2003): Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky. Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1-740.

Alexander, M. (1999): Biodegradation, bioremediation. Academic Press, San Diego, CA, 1-453.

Amiri, F., Yaghmaei, S., Mousavi, S.M. (2011): Bioleaching of tungsten-rich spent hydro-cracking catalyst using *Penicillium simplicissimum*. Bioresource Technology, 102, 2, 1567-1573.

Anderson, C.R., Cook, G.M. (2004): Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic-contaminated sites in New Zealand. Current Microbiology, 48, 5, 341-347.

Andráš, P., Kušnierová, M., Adam, M., Stankovič, J., Chovan, M., Šlesárová, A. (2004): Biooxidácia rudných minerálov na ložisku Pezinok. Acta Montanistica Slovaca, 9, 4, 442-453.

Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi,H., Oyaizu, H. (2000): Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 4, 1563-1589.

Aoshima, H., Hirase, T., Tada, T., Ichimura, N., Kato, H., Nagata, Y., Myoenzono, T., Taguchi, M., Takahashi, K., Hukuzumi, T., Aoki, T., Makino, S., Hagiya, K., Ishiwata, H. (2007): Safety evaluation of a heavy oil-degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* C2. The Journal of Toxicological Sciences, 32, 1, 69-78.

Atlas krajiny Slovenskej republiky (2002): MŽP SR, Bratislava, Esprit, Banská Štiavnica.

Atlas, R.M., Bartha, R. (1997): Microbial Ecology: Fundamentals and Applications, 4th edition, Benjamin Cummings, 1-640.

Aung, K.M.M., Ting, Y.-P. (2005): Bioleaching of spent fluid catalytic cracking catalyst using *Aspergillus niger*. Journal of Biotechnology, 116, 2, 159-170.

Avery, S.V., Tobin, J.M. (1993): Mechanism of adsorption of hard and soft metal ions to *Saccharomyces cerevisiae* and influence of hard and soft anions. Applied and Environmental Microbiology, 59, 9, 2851-2856.

Baldwin, B.R., Nakatsu, C.H., Nies, L. (2003): Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology, 69, 6, 3350-3358.

Bartoňová, L., Klika, Z., Spears, D.A. (2007): Characterization of unburned carbon from ash after bituminous coal and lignite combustion in CFBs. Fuel, 86, 3, 455-463.

Basnayake, R.S.T., Bius, J.H., Akpolat, O.M., Chasteen, T.G. (2001): Production of dimethyl telluride and elemental tellurium by bacteria amended with tellurite or tellurate. Applied Organometallic Chemistry, 15, 6, 499-510.

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. (2009): Lékařská mikrobiologie. Praha: Triton, 1-560.

Bej, A.K., Saul, D., Aislabie, J. (2000): Cold-tolerant alkane-degrading *Rhodococcus* species from Antarctica. Polar Biology, 23, 2, 100-105.

Beľkova, V.A., Tshadov Bychinsky, I.M., Koteľnikov, N.V. (2000): The behaviour of trace elements at the Cheremkhovo coals combustion. Coal, 5, 43-47.

Bell, A.A., Wheeler, M.H. (1986): Biosynthesis and functions of fungal melanins. Annual Review Phytopathology, 24, 411-451.

Bell, K.S., Philp, D.W.J., Christofi, A.W., Christofi, N. (1998): The genus *Rhodococcus*. Journal of Applied Microbiology. 1998, 85, 2, 195-210

Bell, K.S., Philp, J.C., Aw, D.W.J., Christofi, N. (1998): The genus *Rhodococcus*. Journal of Applied Microbiology, 85, 2, 195-210.

Bencko, V., Rameš, J., Fabiánová, E., Pešek, J., Jakubis, M. (2009): Ecological and human health risk aspects of burning arsenic-rich coal. Environmental Geochemistry and Health, 31, 1, 239-243.

Beniash, E., Aizenberg, J., Addadi, L., Weiner, S. (1997): Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth. Proceedings of the Royal Society B, 264, 1380, 461-465.

Beniash, E., Metzler, R.A., Lam, R.S.K., Gilbert, P.U.P.A. (2009): Transient amorphous calcium phosphate in forming enamel. Journal of Structural Biology, 166, 2, 133-143.

Beniash, E., Simmer, J.P., Margolis, H.C. (2005): The effect of recombinant mouse amelogenins on the formation and organization of hydroxyapatite crystals in vitro. Journal of Structural Biology, 149, 2, 182-190.

Beňová, A. (2004): Mycologic analysis of selected localities in Horná Nitra region affected by mining industry. Phytopedon, Bratislava, 1, 3, 49-52.

Bentley, R., Chasteen, T.G. (2002): Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony and bismuth. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66, 2, 250-271.

Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T. (2005): Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresource Technology, 96, 9, 1049-1055.

Berman, M., Bartha, R. (1986): Levels of chemical versus biological methylation of mercury in sediments. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 36, 1, 401-404.

Bhangare, R.C., Ajmal, P.Y., Sahu, S.K., Pandit, G.G., Puranik, V.D. (2011): Distribution of trace elements in coal and combustion residues from five thermal power plants in India. International Journal of Coal Geology, 86, 4, 349-356.

Birch, L., Bachofen, R. (1990): Complexing agents from microorganisms. Cellular and Molecular Life Sciences, 46, 8, 827-834.

Blais, J.F., Tyagi, R.D., Auclair, J.C. (1993): Bioleaching of metals from sewage sludge: Microorganisms and growth kinetics. Water Research, 27, 1, 101-110.

Blanco, A., Sampedro, M.A., Sanz, B., Llama, M.J., Serra, J.L. (2000): Immobilization of nonviable cyanobacteria and their use for heavy metal adsorption from water. In: Olguin, E.J., Sanchez, G., Hernandez, E. (Eds.): Environmental biotechnology and cleaner bioprocesses, Philadelphia, Taylor & Francis, 1-135.

Blanco, A., Sanz, B., Liama, M.J., Serra, J.L. (1999): Biosorption of heavy metals to immobilised *Phormidium laminosum* biomass. Journal of Biotechnology, 69, 2-3, 227-240.

Blindauer, C.A., Harrison, M.D., Parkinson, J.A., Robinson, A.K., Cavet, J.S., Robinson, N.J.,

Sadler, P.J. (2001): A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 48, 17, 9593-9598.

Bodiš, D., Klukanová, A., Švasta, J., Rapant, S., Gajdoš, V., Hók, J. (2006): Vplyv geologických faktorov na kvalitu života. Správa k záverečnému oponentskému konaniu: „Kvalita života - zdravie, výživa a vzdelávanie. Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava, 1-187.

Bodiš, D., Rapant, S. (eds.) (1999): Geochemický atlas Slovenskej republiky. Časť VI. - Riečne sedimenty. MŽP SR; GS SR, Bratislava, 1-145.

Bolan, N.S., Adriano, D.C., Mahimairaja, S. (2004): Distribution and bioavailability of trace elements in livestock and poultry manure by-products. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 34, 3, 291-338.

Bolanz, R.M., Majzlan, J., Jurkovič, Ľ., Göttlicher, J. (2012): Mineralogy, geochemistry, and arsenic speciation in coal combustion waste from Nováky, Slovakia. Fuel, 94, 125-136.

Bollag, J.M., Berthelin J., Adriano, D.C., Huang, P.M. (2005): Impact of soil mineral- organic component-microorganism interactions on restoration of terrestrial ecosystems. In: Huang, P.M., Violante, A., Bollag, J.M., Vityakon, P. (eds.): Soil abiotic and biotic interactions and the impact on the ecosystem and human welfare, 51-70.

Bool, L.E., Helble, J.J. (1995): A laboratory study of the partitioning of trace elements during pulverized coal combustion. Energy Fuels, 9, 5, 880-887.

Borin, S., Marzorati, M., Brusetti, L., Zilli, M., Cherif, H., Hassen, A., Converti, A., Sorlini, C., Daffonchio, D. (2006): Microbial succession in a compost-packed biofilter treating benzene-contaminated air. Biodegradation, 17, 2, 79-89.

Borovec, Z. (1989): Bioakumulácia kovů a dočišťování vod bakteriami, houbami a řasami. Rudy, 12, 37.

Bosecker, K. (1997): Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. FEMS Microbiology Reviews, 20, 3-4, 591-604.

Bosshard, P.P., Bachofen, R., Brandl, H. (1996): Metal leaching of fly ash from municipal waste incineration by *Aspergillus niger*. Environmental Science and Technology, 30, 10, 3066-3070.

Brady, D., Duncan, J.R. (1994): Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 41, 1, 149-154.

Brady, D., Stoll, A.D., Starke, L., Duncan, J.R. (1994): Chemical and enzymatic extraction of heavy metal binding polymers from isolated cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, 44, 3, 297-302.

Brandl, H. (2008): Microbial leaching of metals. In: Rehm, H.J. & Reed, G. (eds). Biotechnology Set. John Wiley & Sons, 2008, 191-224.

Brandl, H. (2008): Microbial leaching of metals. In: Rehm, H.-J., Reed G. (eds.): Biotechnology Set, Second edition, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. 191-206.

Brandl, H., Krebs,W., Brombacher, C., Bosshard, P.P., Bachofen, R. (1997): Microbiological systems for metal recycling. In: Barrage, A. & Edelmann, X. (eds.): Proceedings of R'97-Recovery, Recycling, Re-Integration, Geneva, vol. 4, 16-20.

Braud, A., Jézéquel, K., Vieille, E., Tritter, A., Lebeau, T. (2006): Changes in extractability of Cr and Pb in a polycontaminated soil after bioaugmentation with microbial producers of biosurfactants, organic acids and siderophores. Water, Air, & Soil Pollution: Focus, 6, 261-279.

Bresler, M.M., Rosser, S.J., Basran, A., Bruce, N.C. (2000): Gene cloning and nucleotide sequencing and properties of a cocaine esterase from *Rhodococcus* sp. strain MB1. Applied and Environmental Microbiology, 66, 3, 904-908.

Briglia, M., Rainey, F.A., Stackebrandt, E., Schraa, G., Salkinoja-Salonen, M.S. (1996): *Rhodococcus percolatu s*sp. nov., a bacterium degrading 2, 4, 6-trichlorophenol. International Journal of Systematic Bacteriology, 46, 1, 23-30.

Brookes, P.C., McGrath, S.P. (1984): Effect of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. Journal of Soil Science, 35, 2, 341-346.

Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W. (2000): Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicology and Environmental Safety, 45, 3, 198-207.

Burgstaller, W., Schinner, F. (1993):. Leaching of metals with fungi. Journal of Biotechnology, 27, 2, 91-116.

Burgstaller, W., Strasser, H., Woebking, H., Schinner, F. (1992): Solubilization of zinc oxide from filter dust with *Penicillium simplicissimum*: bioreactor leaching and

stoichiometry. Environmental Science and Technology, 26, 2, 340-346.

Burgstaller, W., Schinner, F. (1993): Leaching of metals with fungi. Minireview. Journal of Biotechnology, 27, 2, 91-116.

Butt, T.R., Ecker D.J. (1987): Yeast metallothionein and applications in biotechnology. Microbiological Reviews, 51, 3, 351-364.

Cai, L., Liu, G., Rensing, C., Wang, G. (2009): Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. BMC Microbiology, 9, 4, 1-11.

Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Bento, F.M., Frankenberger, W.T. (2005): Diversity of chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. Applied Soil Ecology, 29, 2, 193-202.

Cánovas D., Cases, I., De Lorenso, V. (2003): Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. Environmental Microbiology, 5, 12, 1242-1256.

Cao, X., Ma, L.Q., Shiralipour, A. (2003): Effects of compost and phosphate amendments on arsenic mobility in soils and arsenic uptake by the hyperaccumulator, *Pteris vittata L*. Environmental Pollution, 126, 2, 157-167.

Castro, H.F., Williams, N.H., Ogram, A. (2000): Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. FEMS Micobiology Ecology, 31, 1, 1-9.

Cervantes, C., Ji, G., Ramírez, J.L., Silver, S. (1994): Resistance to arsenic coumpounds in microorganisms. FEMS Microbiology Reviews, 15, 4, 355-367.

Cervantes, C., Ji, G., Ramírez, J.L., Silver, S. (1994): Resistance to arsenic compounds in microorganisms. FEMS Microbiology Reviews, 15, 4, 355-367.

Clegg, C.D., Lovell, R.D.L., Hobbus, P.J. (2003): The impact of grassland management regime on the community structure of selected bacterial groups in soil. FEMS Microbiology Ecology, 43, 263-270.

Cölfen, H., Mann, S. (2003): Higher-order organization by mesoscale self-assembly and transformation of hybrid nanostructures. Angewandte Chemie, 42, 21, 2350-2365.

Colmer, A.R., Hinkle, M.E. (1947): The role of microorganisms in acid mine drainage; a preliminary report. Science, 106, 253-256.

Costa, A.C.A., Leite, S.G.C. (1991): Metal biosorption by sodium alginate immobilized *Chlorerella homosphaera.* Biotechnology Letters, 13, 559-562.

Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., Rofe, A.M. (2002): Metallothionein: the multipurpose protein. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 59, 4, 627-647.

Craig, P.J. (2003): Organometallic compounds in the environment. Second Edition, John Wiley and Sons, Chichester, 1-415.

CSQG, 2007: Canadian Soil Quality Guidelines fot the Protection of Environmental and Human Health. Canadian Environmental Quality Guidelines, Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999, updated 2001, Recommended Canadian Soil Quality Guidelines" (Canadian Council of Ministers of the Environment, 1997, Winnipeg), 1-7.

Cullen, W.R., Reimer, K.J. (1989): Arsenic speciation in the environment. Chemical Reviews, 89, 4, 713-764.

Cursino, L., Mattos, S.V., Azevedo, V., Galarza, F., Bücker, D.H., Chartone-Souza, E., Nascimento, A. (2000): Capacity of mercury volatilization by mer (from *Escherichia coli*) and glutathione S-transferase (from *Schistosoma mansoni*) genes cloned in *Escherichia coli*. Science of the Total Environment, 261, 1-3, 109-113.

Čech, F., Petrík, F. (1967): Nové poznatky o petrografii uhoľných slojov a geologickom vývoji Handlovsko-nováckej panvy. Geologický prúzkum, ročník IX, Praha, 225-228.

Čerňanský, S., Kolenčík, M., Ševc, J., Urík, M., Hiller, E. (2009): Fungal volatilization of trivalent and pentavalent arsenic under laboratory conditions. Bioresource Tehcnology, 100, 2, 1037-1040.

Čerňanský, S., Urík, M., Ševc, J., Khun, M. (2007): Biosorption and biovolatilization of arsenic by heat-resistant fungi. Environmental Science and Pollution Research, 14, 1, 31-35.

Čerňanský, S., Urík, M., Ševc, J., Šimonovičová, A., Littera P. (2006): Mikroskopické vláknité huby v oblasti Pezinok-Kolársky vrch – ich druhové zastúpenie a schopnosť biovolatilizácie arzénu. Acta Environmentalica Universitatis Comenianae, Bratislava, 14, 2, 11-18.

ČMS (2011): Čiastkový monitorovací systém - Geologické faktory. Správa za obdobie 2002-2009. Čiastková záverečná správa, ŠGÚDŠ, Bratislava, 321-460.

ČMS (2013): Čiastkový monitorovací systém, Geologické faktory, Podsystém 07: Monitorovanie riečnych sedimentov. Správa za rok 2012 (Kordík, J., Slaninka, I., Bodiš, D.), ŠGÚDŠ, Bratislava, 1-67.

Čurlík J. (2003): Mapa kontaminácie pôd v regióne Horná Nitra. Záverečná správa, ŠGÚDŠ, Bratislava, 1-69.

Čurlík, J., Šurina, B. (1998): Príručka terénneho prieskumu a mapovania pôd. VÚPÚ, Bratislava, 1-134.

D'Annibale, A., Rosetto, F., Leonardi, V., Federici, F., Petruccioli, M. (2006): Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. Applied Environmental Microbiology, 72, 1, 28-36.

Dabbs, E.R., Sole G.J. (1998): Plasmid-borneresistance to arsenate, arsenite, cadmium, and chloramphenicol in a *Rhodococcus* species. Molecular & General Genetics, 211, 1, 148-154.

Dai, S., Zhao, L., Peng, S., Chou, Ch.-L., Wang, X., Zhang, Y., Li, D., Sun, Y. (2010): Abundances and distribution of minerals and elements in high-alumina coal fly ash from the Jungar Power Plant, Inner Mongolia, China. International Journal of Coal Geology, 81, 4, 320-332.

Damborský, J., Koča, J. (1999): Analysis of the reaction mechanism and substrate specifity of haloalkane dehalogenases by sequential and structural comparisons. Protein Engineering, 12, 11, 989-998.

Damborský, J., Nyandoroh, M.G., Němec, M., Holoubek, I., Bull, A.T., Hardman, D.J. (1997): Some biochemical properties and the classification of a range of bacterial haloalkane dehalogenases. Biotechnology and Applied Biochemistry, 26, 1, 19-25.

Das, S.K., Das, A.R, Guha, A.K. (2007): A study on the adsorption mechanism of mercury on *Aspergillus versicolor* biomass. Environmental Science and Technology, 41, 24, 8281-8287.

Davies, J.S., Westlake, D.W. (1979): Crude oil utilization by fungi. Canadian Journal of Microbiology 25, 2, 146-156.

Davison, R.L., Natusch, D.F.S., Wallace, J.R., Evans Jr., C.A. (1974): Trace elements in fly ash. Dependence of concentration on particle size. Environmental Science and Technology, 8, 13, 1107-1113.

De Carvalho, C.C., Costa, S.S., Fermandes, P., Couto, I., Viveiros, M. (2014): Membrane transport systems and the biodegradation potential and pathogenicity of genus *Rhodococcus.* Frontiers in Physiology, 5, 133.

De Windt, L., Devillers, P. (2010): Modeling the degradation of Portland cement pastes by biogenic organic acids. Cement and Concrete Research, 40, 8, 1165-1174.

Dean-Ross, D., Moody, J.D. Freeman, J.P., Doerge, D.R., Cerniglia, C.E. (2001): Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus* species. FEMS Microbiology Letters, 204, 1, 205-211.

DeFiebre, C.W., Knight, S.G. (1953): The oxidation of glucose by *Penicillium chrysogenum*. Journal of Bacteriology, 66, 2, 170-172.

Demnerová, K., Macková, M. (2006): Geneticky modifikované organismy v ekosystému. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 1-30.

Dercová, K., Lászlová, K., Dudášová, H., Murínová, S., Balaščáková, M., Škarba, J. (2015): Hierarchia výberu bioremediačných technológií: možnosti využitia potenciálu bakteriálnych degradérov. Chemické listy, 109, 281-290.

Di Lorenzo, A., Varcamonti, M., Parascandola, P. VIignola, R., Bernardi, A., Sacceddu, P., Sisto, R., De Alteriis, E. (2005): Characterization and performance of a toluene-degrading biofilm developer on pumice stones. Microbial Cell Factories, 4, 4. doi:10.1186/1475-2859-4-4

Diaz-Bone, R.A., Van De Wiele, T.R. (2009): Biovolatilization of metal(loid)s by intestinal microorganisms in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. Environmental Science and Technology, 43, 14, 5249-5256.

Díaz-Raviña, M., Bååth, E. (1996): Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. Applied and Environmental Microbiology, 62, 8, 2970-2977.

Diniz, V., Volesky, B. (2005): Biosorption of La, Eu and Yb using *Sargassum biomass*. Water Research, 39, 1, 239-247.

Dismukes, E.B. (1994): Trace element control in electrostatic precipitators and fabric filter. Fuel Processing Technology, 39, 1-3, 403-416.

Donahoe, R.J. (2004): Secondary mineral formation in coal combustion byproduct disposal facilities: implications for trace element sequestration. In: Gieré, R., Stille, P. (Eds): Energy, Waste and the Environment: A Geochemical Perspective. Geological Society, London, Special Publications, 236, 641-658.

Drijber, R.A., Doran, J.W., Parkhurst, A.M., Lyon, D.J. (2000): Changes in soil microbial community structure with tillage under long-term wheat-fallow management. Soil Biology and Biochemistry, 32, 1419-1430.

Dronawat, S.N., Svihla, C.K., Hanley, T.R. (1995): The effects of agitation and aeration on the

production of gluconic acid by *Aspergillus niger*. Applied Biochemistry Biotechnology, 51-52, 1, 347-354.

Dudas, M.J. (1981): Long-term leachability of selected elements from fly ash. Environmental Science and Technology,15, 7, 840-843.

Dudas, M.J., Warren, C.J. (1987): Submicroscopic model of fly ash particles. Geoderma, 40, 1-2, 101-114.

Duxbury, T., Bicknell, B. (1983): Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. Soil Biology and Biochemistry, 15, 3, 243-250.

Dwivedy, K.K., Mathur, A.K. (1995): Bioleaching – Our experience. Hydrometallurgy, 38, 1, 99-109.

Eary, L.E., Rai, D., Mattigod, S.V., Ainsworth, C.C. (1990): Geochemical factors controlling the mobilization of inorganic constituents from fossil fuel combustion residues: II. Review of the minor elements. Journal of Environmental Quality, 19, 2, 202-214.

Edvantoro, B.B., Naidu, R., Megharaj, M., Merrington, G., Singleton, I. (2004): Microbial formation of volatile arsenic in cattle dip site soils contaminated with arsenic and DDT. Applied Soil Ecology, 25, 207-217.

Edwards, K.J., Bond, P.L., Druschel, G.K., McGuire, M.M., Hamers, R.J., Banfield, J.F. (2000): Geochemical and biological aspects of sulfide mineral dissolution: lessons from Iron Mountain, California. Chemical Geology, 169, 3-4, 383-397.

Egorova, D.O., Demakov, V.A., Plotnikova, E.G. (2011): Destruction of mixture of tri-hexa-chlorinated biphenyls by *Rhodococcus* genus strains. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya, 47, 6, 655-662.

Ehrlich, H.L. (1997): Microbes and metals. Mini-review. Applied Microbiology and Biotechnology, 48, 687-692.

El Fantroussi, S., Agathos, S.N. (2005): Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? Current Opinion in Microbiology, 8, 3, 268-275.

El Fantroussi, S., Belkacemi, M., Top, E.M., Mahillon, J., Naveau, H., Agathos, S.N. (1999): Bioaugmentation of a soil bioreactor designed for pilot-scale anaerobic bioremediation studies. Environmental Science and Technology, 33, 17, 2992-3001.

Ellis, R.J., Morgan, P., Weightman, A.J., Fry, J.C. (2003): Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. Applied and Environmental Microbiology, 69, 6, 3223-3230.

Elo, S., Maunuksela, L., Salkonoja-Salonen M., Smolander, A., Haahtela, K. (2000): Humus bacteria of Norway spruce stands: plant growth promoting properties and birch, red fescue and alder colonizing capacity. FEMS Microbiology Ecology, 31, 2, 143-152.

England, L.S., Lee, H., Trevors, J.T. (1993): Bacterial survival in soil: Effect of clays and protozoa. Soil Biology and Biochemistry, 25, 5, 525-531.

EPA ORD (2000): In situ Treatment of Soil and Groundwater Contaminated with Chromium. Technical Resource Guide. US EPA, Office of Research and Development, Washington, D.C., 1-98.

EPA (1996): Seminar publication: Managing Environmental Problems at Inactive and Abandoned Metals Mine Sites. US EPA, Office of Research and Development, Washington, D.C., 1-91.

EPA (1999): Monitored Natural Attenuation of Petroleum Hydrocarbons, Remedial Technology. US EPA, Office of Research and Development, Washington, D.C., 1-3.

EPA (2000): Wastewater Technology Fact Sheet: Chemical Precipitation. US EPA, Office of Water, Washington, D.C., 1-8.

EPA (2003): The Superfund Innovative Technology Evaluation Program. Technology Profiles Eleventh Edition. Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio, 1-522.

EPA (2009): *Pseudomonas chlororaphis* strain 63-28 (006478) [online].[cit. 2014-04-30]. Dostupné z: http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/registration/fs PC-006478 01-Apr-01.pdf

EPRI (Electric Power Research Institute) (1998): Identification of arsenic species in coal ash particles. Final Report, TR- 109002, California, 1-285.

EPRI (Electric Power Research Institute)(2006): Weathering processes and secondary minerals formed in coal ash. Technical report. Palo Alto, CA and Southern Company Services, Inc., Birmingham, AL: 2006. 1012582, 1-50.

Eskenazy, G.M. (1995): Geochemistry of arsenic and antimony in Bulgarian coals. Chemical Geology, 119, 1-4, 239-254.

Fahy, A., Ball, A.S., Lethbridge, G., McGenity, T.J., Timmis, K.N. (2008): High benzene concentrations can favour Gram-positive bacteria in groundwaters from a contaminated aquifer. FEMS Microbiology Ecology, 65, 3, 526-533.

Fahy, A., McGenity, T.J., Timmis, K.N., Ball, A.S. (2006): Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. FEMS Microbiology Ecology, 58, 2, 260-270.

Faragó, T., Peťková, K., Jurkovič, Ľ., Molnárová, M. (2014): Dynamika uvoľňovania arzénu z technozeme iniciálnej s obsahom elektrárenského popola (lokalita Zemianske Kostoľany). Acta Environmentalica Universitatis Comenianae (Bratislava), 22, 1, 5-13.

Feklistova, I.N., Maksimova, N.P. (2008): Isolation of *Pseudomonas aurantiaca* strains capable of overproduction of phenazine antibiotics. *Mikrobiologiia.* [Article in Russian]. 2077, 2, 176-180.

Fetzner, S., Lingens, F. (1994): Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics and bitechnological applications. Microbiological Reviews, 58, 4, 641-685.

Fhitri, M., Zunita, Z., Latiffah, H., Noordin, M. M. (2012): Occurencce of *Rhodococcus equi* in soil and reces in selected stud farms in Malaysia. Malaysian Journal of Veterinary Research, 3, 2, 35-40.

Figueira, M.M., Volesky, B., Ciminelli, V.S.T. (1997): Assessment of Interference in biosorption of heavy metal. Biotechnology & Bioengineering, 54, 4, 344-350.

Filali, B.K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F.Z., Talbi, M., Blaghen, M. (2000): Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Current Microbiology, 41, 3, 151-156.

Finnerty, W. R. (1992): The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. Annual Review of Microbiology, 46, 193-218.

Fishman, N.S., Rice, C.A., Breit, G.N., Johnson, R.D. (1999): Sulfur-bearing coatings on fly ash from a coal-fired power plant: composition, origin, and influence on ash alteration. Fuel, 78, 2, 187-196.

Fogarty, R.V., Tobin, J.M. (1996): Fungal melanins and their interactions with metals. Enzyme and Microbial Technology, 19, 4, 311-317.

Fogel, S., Welch, J.W., Maloney, D.H. (1988): The molecular genetics of copper resistance in *Saccharomyces cerevisiae* – a paradigm for non-conventional yeasts. Journal of Basic Microbiology, 28, 3, 147-160.

Font, O., Moreno, N., Querol, X., Izguierdo, M., Alvarez, E., Diez, S., Elvira, J., Antenucci, D., Nugteren, H., Plana, F., López, A., Coca, P., Peña, F.G. (2010): X-ray powder diffraction-based method for the determination of the glass content and mineralogy of coal (co) combustion fly ashes. Fuel, 89, 10, 2971-2976.

Forsyth, J.V., Tsao, Y.M., Bleam, R.D. (1995): Bioremediation: when is augmentation needed? In: Hinchee, R.E., Fredrickson, J., Alleman, B.C. (Eds.): Bioaugmentation for site remediation. Columbus, OH, Battelle Press, 1-261.

Fowler, B.A. (1977): Toxicology of environmental arsenic. In: Goyer, R.A., Mehlman, M.A., (Eds.): Toxicology of trace elements. Advances in Modern Toxicology, Vol. 2, Washington, D.C.: Hemisphere, 79-122.

Francis, A.J., Dodge, C.J., Gillow, J.B. (1992): Biodegradation of metal citrate complexes and implications for toxic-metal mobility. Nature, 356, 140-142.

Frankenberger, W.T.Jr., Arshad, M. (2001): Bioremediation of selenium-contaminated sediments and water. Biofactors, 14, 1-4, 241-254.

Frankenberger, W.T., Benson, S. (1994): Selenium in the Environment. New York: Marcel Dekker Inc. CRC Press, 1-480.

Frankovská, J., Matys, M., Masarovičová, M., Slaninka, I., Kordík, J., Jurkovič, Ľ., Záhorová, Ľ. (2008): Čiastkový monitorovací systém geologických faktorov. Podsystém 03: Antropogénne sedimenty charakteru environmentálnych záťaží. Záverečná správa za rok 2007, ŠGÚDŠ, Bratislava, 1-65.

Frankovská, J., Kordík, J., Slaninka, I., Jurkovič, Ľ., Greif, V., Šottník, P., Dananaj, I., Mikita, S., Dercová, K., Jánová, V. (2010): Atlas sanačných metód environmentálnych záťaží. ŠGÚDŠ, Bratislava, 1-360.

Frey, B., Stemmer, M., Widmer, F., Luster, J., Sperisen, Ch. (2006): Microbial activity and community structure of a soil after heavy metal contamination in a model forest ecosystem. Soil Biology and Biochemistry, 38, 7, 1745-1756.

Fu, Y.Z., Viraraghavan, T. (2001): Removal of CI Acid Blue 29 from an aqueous solution by *Aspergillus niger*. AATCC Review, 1, 1, 36-40.

Furimsky, E. (2000): Characterization of trace element emissions from coal combustion by equilibrium calculations. Fuel Processing Technology, 63, 1, 29-44.

Gadd, G.M. (1990): Fungi and yeasts for metal accumulation. In: Ehrlich, H.L., Brierley, C.L. (Eds.): Microbial mineral recovery, McGraw-Hill Inc, New York, vol. 6b, 249-275.

Gadd, G.M. (1993): Tansley Review No. 47. Interactions of fungi with toxic metals. New Phytologist, 124, 1, 25-60.

Gadd, G.M. (1999): Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. Advances in Microbial Physiology, 41, 47-92.

Gadd, G.M. (2000): Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. Current Opinion in Biotechnology, 11, 3, 271-279.

Gadd, G.M. (2004): Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. Geoderma, 122, 2-4, 109-119.

Gadd, G.M. (2007): Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. Mycological Research, 111, 1, 3-49.

Gadd, G.M. (2010): Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bio-remediation. Microbiology, 156, 3, 609-643.

Gadd, G.M., Gharieb, M.M., Ramsay, L.M., Sayer, J.A., Whatley, A.R., White, C. (1993): Fungal processes for bioremediation of toxic metal and radionuclide pollution. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 71, 4, 364-366.

Gadd, G.M., Sayer, J.A. (2000): Influence of fungi on the environmental mobility of metals and metalloids. In: Loveley, D.R. (Ed.): Environmental Microbe-Metal Interactions, ASM Press, Washington, DC, 237-256.

Gadd, G.M., White, C. (1993): Microbial treatment of metal pollution - a working biotechnology? Trends in Biotechnology, 11, 8, 353-359.

Gadepalle, V.P., Ouki, S.K., Van Herwijnen, R., Hutchings, T. (2007): Immobilization of heavy metals in soil using natural and waste materials for vegetation establishment on contaminated sites. Soil and Sediment Contamination, 16, 2, 233-251.

Gallant, C.V., Raivio, T.L., Olson, J.C., Woods, D.E., Storey, D.G. (2000): *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis clinical isolates produce exotoxin A with altered ADP-ribosyltransferase activity and cytotoxicity. Microbiology, 146, 8, 1891-1899.

Gao, S., Burau, R.G. (1997): Environmental factors affecting rates of arsine evolution from and mineralization of arsenicals in soil. Journal of Environmental Quality, 26, 3, 753-763.

Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D. (2004): Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. Annual Review of Phytopathology, 42, 243-270.

Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T. (2005): Pseudomonadales. In: Garrity, G., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.R. (eds.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2: The *Proteobacteria*, Part B: The *Gammaproteobacteria*. Springer US, 323-392.

Gentry, T.J., Rensing, C., Pepper, I. (2004): New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 34, 5, 447-494.

Gentzis, T., Goodarzi, F. (1997): Trace element geochemistry of the Obed Mountain deposit coals, Alberta, Canada. Fuel, 76, 14-15, 1491-1501.

Gharieb, M.M., Sayer, J.A., Gadd, G.M. (1998): Solubilization of natural gypsum ($CaSO_4.2H_2O$) and the formation of calcium oxalate by *Aspergillus niger* and *Serpula himantioides*. Mycological Ressearch, 102, 7, 825-830.

Gholami, R.M., Borghei, S.M., Mousavi, S.M. (2011): Fungal leaching of hazardous heavy metals from a spent hydrotreating catalyst. World Academy of Science, Engineering and Technology, 52, 726-731.

Giguère, S., Cohen, N.D., Keith Chaffin, M., Hines, S.A., Hondalus, M.K., Prescott, J.F., Slovis, N.M. (2011): *Rhodococcus equi*: clinical manifestations, virulence, and immunity. Journal of Veterinary Internal Medicine, 25, 6, 1221-1230.

Godlewska-Zylkiewicz, B. (2003): Biosorption of platinum and palladium for their separation/preconcentration prior to graphite furnace atomic absorption spectrometric determination. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 58, 8, 1531-1540.

Gokcen, N.A. (1989): The As (Arsenic) system. Bulletin of Alloy Phase Diagrams, 10, 1, 11-22.

Gomes, N.C.M., Camargos, E.R.S., Dias, J.C.T., Linardi, V.R. (1997): Gold and silver accumulation by *Aspergillus niger* from cyanide-containing solution obtained from the gold mining industry. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14, 1, 149.

Gomez-Caminero, A., Howe, P., Hughes, M., Kenyon, E., Lewis, D.R., Moore, M., Ng, J., Aitio, A., Becking, G. (2001): Environmental health criteria 224: Arsenic and arsenic compounds. World Health Organization, Geneva, 1-114.

Gonzalez, R., Gentina, J.C., Acevedo, B.F. (2004): Biooxidation of a gold concentrate in a continuous stirred tank reactor: mathematical model and optimal configuration. Biochemical Engineering Journal, 19, 1, 33-42.

Goodarzi, F., Huggins, F.E. (2001): Monitoring the species of arsenic, chromium and nickel in milled coal, bottom ash and fly ash from a pulverized coal-fired power plant in western Canada. Journal of Environmental Monitoring, 3, 1, 1-6.

Goodarzi, F. (2006): Assessment of elemental content of milled coal, combustion residues, and stack emitted materials: Possible environmental effects for a Canadian pulverized coal-fired power plant. International Journal of Coal Geology, 65, 1-2, 17-25.

Goodarzi, F., Sanei, H., Stasiuk, L.D., Bagheri-Sadeghi, H., Reyes, J. (2006): A preliminary study of mineralogy and geochemistry of four coal samples from northern Iran. International Journal of Coal Geology, 65, 1-2, 35-50.

Goodarzi, F., Grieve, D.A., Sanei, H., Gentzis, T., Goodarzi, N.N. (2009): Geochemistry of coals from the Elk Valley coalfield, British Columbia, Canada. International Journal of Coal Geology, 77, 3-4, 246-259.

Goodfellow, M., Alderson, G. (1977): The Actinomycete-genus *Rhodococcus*: A home for the *'rhodochrous'* complex. Journal of General Microbiology, 100, 1, 99-122.

Goodfellow, M., Alderson, G., Chun, J. (1998): Rhodococcal systematics: problems and developments. Antonie van Leeuwenhoek, 74, 1, 3-20.

Goodfellow, M., Thomas, E.G. Ward, A.C., James, A.L. (1990): Classification and identification of the rhodococci. Zentralblatt für Bakteriologie, 274, 3, 299-315.

Gorbushina, A.A., Whitehead, K., Dornieden, T., Niesse, A., Schulte, A., Hedges. J.I. (2003): Black fungal colonies as units of survival: hyphal mycosporines synthesized by rock-dwelling microcolonial fungi. Canadian Journal of Botany, 81, 2, 131-138.

Grantina, L., Seile, E., Kenigsvalde, K., Kasparinskis, R., Tabors, G., Nikolajeva, V., Jungerius, P., Muiznieks, I. (2011): The influence of the land use on abundance and diversity of soil fungi: comparison of conventional and molecular methods of analysis. Environmental and Experimental Biology, 9, 9-21.

Grewal, H.S., Kalra, K.L. (1995): Fungal production of citric acid. Biotechnology Advances, 13, 2, 209-234.

Groudeva, V.I., Krumova, K., Groudev, S.N. (2007): Bioleaching of a rich-in-carbonates copper ore at alkaline pH. Advanced Materials Research, 20-21, 103-106.

Grund, E., Denecke, B., Eichenlaub, R. (1992): Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. Applied and Environmental Microbiology, 58, 6, 1874-1877.

Guo, X., Zheng, C.-G., Jia, X.-H. (2004): Mobility of arsenic in coal fly ash of different particle. Journal of Combustion Science and Technology, 10, 4, 299-302.

Gürleyük, H., Van Fleet-Stalder, V., Chasteen, T.G. (1997): Confirmation of the biomethylation of antimony compounds. Applied Organometallic Chemistry, 11, 6, 471-483.

Gürtler, V., Seviour, R.J. (2010): Systematics of Members of the Genus *Rhodococcus* (Zopf 1891) Emend Goodfellow et al. 1998. In: Alvarez, H.M. (ed.): Biology of *Rhodococcus.* Springer, 1-28.

GVSRS – Guidelines values for Soil remediation strategies, Department of Housing and Environment, The Netherlands.

Hackley, P.C., Warwick, P.D., González, E. (2005): Petrology, mineralogy and geochemistry of mined coals, western Venezuela. International Journal of Coal Geology, 63, 1-2, 68-97.

Haferburg, G., Kloess, G., Schmitz, W., Kothe, E. (2008): "Ni-struvite" - A new biomineral formed by a nickel resistant *Streptomyces acidiscabies*. Chemosphere, 72, 517-523.

Hamer, G. (1997): Microbial consortia for multiple pollutant biodegradation. Pure and Applied Chemistry, 69, 11, 2343-2356.

Han, M.H., Yun, Y.S. (2007): Mechanistic understanding and performance enhancement of biosorption of reactive dyestuffs by the waste biomass generated from amino acid fermentation process. Biochemical Engineering Journal, 36, 1, 2-7.

Hansen, L.D., Silberman, D., Fisher, G.L. (1981): Crystalline components of stack-collected, size-fractionated coal fly ash. Environmental Science and Technology, 15, 9, 1057-1062.

Hansford, G.S., Miller, D.M. (1993): Biooxidation of a gold-bearing pyrite-arsenopyrite concentrate. FEMS Microbiology Reviews, 11, 1-3, 175-181.

Haq, R., Shakoori, A.R. (2000): Microorganisms resistant to heavy metals and toxic chemicals as indicators of environmental pollution and their use in bioremediation. Folia Biologica (Krakow), 48, 3-4, 143-147.

Harwood, C.S., Fosnaugh, K., Dispensa, M. (1989): Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior. Journal of Bacteriology, 171, 7, 4063-4066.

Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., Boudabous, A. (1998): Resistance of environmental bacteria to heavy metals. Bioresource Technology, 645, 7-15.

Hassen, A., Saidi, N., Cherifh, M., Boudabous, A. (1998): Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. Bioresource Technology, 65, 1-2, 73-78.

Hatai, K., Egusa, S., Nakajima, M., Chikahata, H. (1975): *Pseudomonas chlororaphis* as a fish pathogen. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 41, 11, 1203.

Hausinger, R.P. (1987): Nickel utilization by microorganisms. Microbiological Reviews, 51, 1, 22-42.

Hay, R.L. (1966): Zeolites and zeolitic reactions in sedimentary rocks. Geological Society of America Special Papers, 85, 1-122.

He, B., Liang, L., Jiang, G. (2002): Distributions of arsenic and selenium in selected Chinese coal mines. Science of The Total Environment, 296, 1-3, 19-26.

He, G., Dahl, T., Veis, A., George, A. (2003): Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. Nature Materials, 2, 8, 552-558.

He, Z., Gao, F., Zhong, H., Hu, Y. (2009): Effects of L-cysteine on Ni–Cu sulfide and marmatite bioleaching by *Acidithiobacillus caldus*. Bioresource Technology, 100, 3, 1383-1387.

Hemmings, R.T., Berry, E.E. (1987): On the glass in coal fly ashes: Recent advances. Materials Research Society Symposium Proceedings, 113, 3-38.

Henke, K.R., Hutchison, A. (2009): Arsenic chemistry. In: Henke, K.R. (Ed.): Arsenic. Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment. John Wiley and Sons, Ltd., Publication, USA, 1-575.

Hiller, E., Jurkovič, Ľ., Kordík, J., Slaninka, I., Jankulár, M., Majzlan, J., Göttlicher, J., Steininger, R. (2009): Arsenic mobility from anthropogenic impoundment sediments – Consequences of contamination to biota, water and sediments, Poša, Eastern Slovakia. Applied Geochemistry, 24, 11, 2175-2185.

Hockenhull, D.J.D., Herbert, M., Walker, A.D., Wilkin, G.D., Winder, F.G. (1954): Organic acid metabolism of *Penicillium chrysogenum*, I. Lactate and Acetate. Biochemical Journal, 56, 1, 73-82.

Holloway, B.W. (1996): *Pseudomonas* genetics and taxonomy. In: Nakazawa, T., Furukawa, K., Haas, D., Silver, S. (eds.): Molecular Biology of *Pseudomonads*. Washington, D.C., ASM Press, American Society for Microbiology, 22-32.

Honschopp, S., Brunken, N., Nehrhorn, A., Breunig, H.J. (1996): Isolation and characterization of a new arsenic methylating bacterium from soil. Microbiological Research, 151, 1, 37-41.

Horáková, D. (2000): Bioremediace. VŠCHT Praha, 1. vyd., 1-81.

Hosokawa, R., Nagai, M., Morikawa, M., Okuyama, H. (2009): Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. World Journal of Microbiology, 25, 1519-1528.

Hower, J.C., Robertson, J.D., Thomas, G.A., Wong, A.S., Schram, W.H., G.M., Graham, U.M., Rathbone, R.F., Robl, T.L. (1996): Characterization of fly ash from Kentucky power plants. Fuel, 75, 4, 403-411.

Hraško, J., Linkeš, V., Šály, R., Šurina, B. (1993): Pôdna mapa Slovenska 1:400000. VÚPOP, Bratislava.

Hulett Jr., L.D., Weinberger, A.J., Northcutt, K.J., Ferguson, M. (1980): Chemical species in fly ash from coal-burning power plants. Science, 210, 4476, 1356-1358.

Hussein, H., Farag, S., Moawad, H. (2004): Isolation and characterisation of *Pseudomonas* resistant to heavy metals contaminants. Arab Journal of Biotechnology, 7, 1, 13-22.

Hynie, S. (2001): Farmakologie v kostce. Triton, Praha, 1-520.

Chakraborti, N., Lynch, D.C. (1983): Thermodynamics of roasting arsenopyrite. Metallurgical Transactions B, 14, 2, 239-251.

Challenger, F. (1945): Biological methylation. Chemical Reviews, 36, 3, 315-361.

Chancey, R.T., Stutzman, P., Juenger, M.C.G., Fowler, D.W. (2010): Comprehensive phase characterization of crystalline and amorphous phases of a Class F fly ash. Cement and Concrete Research, 40, 1, 146-156.

Chander, K., Brookes, P.C., Harding, S.A. (1995): Microbial biomass dynamics following addition of metal-enriched sewage sludges to a sandy loam. Soil Biology and Biochemistry, 27, 11, 1049-1421.

Chang, J.S., Hong, J. (1994): Biosorption of mercury by the inactivated cells of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. Biotechnology & Bioengineering, 44, 8, 999-1006.

Chapon, V., Piette, L., Vesvres, M.-H., Coppin, F., Le Marrec, C., Christen, R., Theodorakopoulos, N., Février, L., Levchuk, S., Martin-Garin, A., Berthomieu, C., Sergeant, C. (2012): Microbial diversity in contaminated soils along the T22 trench of the Chernobyl experimental

platform. Applied Geochemistry, 27, 1375-1383.

Chen, J., Qin, J., Zhu, Y.G., De Lorenzo, V., Rosen, B.P. (2013): Engineering the soil bacterium *Pseudomonas putida* for arsenic methylation. Applied and Environmental Microbiology, 79, 14, 4493-4495.

Chen, S.-Y., Lin, J.-G. (2000): Influence of solid content on bioleaching of heavy metals from contaminated sediment by *Thiobacillus* spp. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 75, 649-656.

Chen, X., Shi, J., Cheen, Y., Xu, X., Xu, S., Wang, Y. (2006): Tolerance and biosorption of copper and zinc by *Pseudomonas putida* CZ1 isolated from metal-polluted soil. Canadian Journal of Microbiology, 52, 4, 308-316.

Chiang, Y.W., Santos, R.M., Monballiu, A., Ghyselbrecht, K., Martens, J.A., Mattos, M.L.T., Van Gerven, T., Meesschaert, B. (2013): Effects of bioleaching on the chemical, mineralogical and morphological properties of natural and waste-derived alkaline materials. Minerals Engineering, 48, 116-125.

Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V., Mulders, I.H., Dekkers, L.C., Lugtenberg, B.J. (2000): Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. MPMI (Molecular Plant-Microbe Interactions), 13, 12, 1340-1345.

Chodak, M., Gołębiewski, M., Morawska-Płoskonka, J., Kuduk, K. (2013): Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. Applied Soil Ecology, 64, 7-14.

Chojnacka, K. (2010): Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. Environment International, 36, 3, 299-307.

Choudhary, S., Sar, P. (2011): Uranium biomineralization by a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from contaminated mine waste. Journal of Hazardous Materials, 186, 336-343.

Ibrahim, Z. (1993): Characterisation of silver resistant bacteria from a mining environment. Ph.D. Thesis. Universiti Teknologi Malaysia, Faculty of Science..

Ibrahim, Z., Ahmad, W.A., Baba, A.B. (2001): Bioaccumulation of silver and the isolation of metal-binding protein from *P. diminuta*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 44, 3, 223-225.

Ivshina, I.B., Kuyukina, M.S., Krivoruchko, A.V., Plekhov, O.A., Naimark, O.B., Podorozhko, E.A., Lozinsky, V.I. (2013): Biosurfactant-enhanced immobilization of hydrocarbon-oxidizing *Rhodococcus ruber* on sawdust. Applied Microbiology and Biotechnology, 97, 12, 5315-5327.

Ivshina, I.B., Peshkur, T.A., Korobov, V.P. (2002): Efficient uptake of cesium ions by *Rhodococcus* cells. Microbiology, 71, 3, 357-361.

Ivshina, I.B., Kamenskikh, T.N., Liapunov Y.E. (1994): IEGM Catalogue of Strains of Regional Specialised Collection of Alkanotropic Microorganisms. Moscow: Russian Academy of Sciences, http://www.iegmcol.ru/

Ivshina, I.B., Obring, A.A. Nesterenko, O.A., Kasumova, S.A. (1981): Bacteria of the *Rhodococcus* genus from the ground water of oil-bearing deposits in the Perm region near the Urals. Microbiology, 50, 709-717.

Jablonovská, K., Pállová, Z., Štyriaková, I. (2012): Bioleaching of Zn, Ni and Fe from contaminated sediments of water reservoir Ružín I with using heterotrophic bacterial strains. Acta Montanistica Slovaca, 17, 1, 47-50.

Jadhav, R.A., Fan, L.S. (2001): Capture of gas-phase arsenic oxide by lime: kinetic and mechanistic studies. Environmental Science and Technology, 15, 35, 4, 794-799.

Jakob, R., Roth, A., Haas, K., Krupp, E.M., Raab, A., Smichowski, P., Gómez, D., Feldmann, J. (2010): Atmospheric stability of arsines and the determination of their oxidative products in atmospheric aerosols (PM_{10}): evidence of the widespread phenomena of biovolatilization of arsenic. Journal of Environmental Monitoring, 12, 2, 409-416.

Janáková, I., Vojtková, H. (2012): Application of flotation and biodegradation to eliminate persistent organic pollutants in the influent stream of Cerny Prikop. In: Mendez-Vilas, A. (ed).: Microbes in Applied Research. World Scientific Publishing, Singapore, 2012, 28-32.

Janáková, I., Vojtková, H., Fečko, P. (2011): Application of flotation and bacterial leaching to eliminate persistent organic pollutants in the influent stream of Cerny Prikop. In: 11th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2011. STEF92 Technology Ltd., Sofia, vol. 1. 1069-1076.

Janáková, I., Vojtková, H. (2012): Application of flotation and bioremediation to eliminate persistent organic pollutants in the influent stream of Cerny Prikop (Czech Republic). In: Mendez-Vilas, A. (ed.): Microbes in Applied

Research: Current advances and challenges. World Scientific Publishing, London, 28-32.

Jandačka, J., Mikulík, M. (2008): Ekologické aspekty spaľovania biomasy a fosílnych palív. Vydavateľstvo Georg, Žilina, 1-120.

Jang, L., Zhou, H., Peng, X., Ding, Z. (2008): Bio-oxidation of galena particles by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Particuology, 6, 2, 99-105.

Jankowski, J., Ward, C.R., French, D., Groves, S. (2006): Mobility of trace elements from selected Australian fly ashes and its potential impact on aquatic ecosystems. Fuel, 85, 2, 243-256.

Jankulár, M., Hiller, E., Jurkovič, Ľ., Veselská, V., Majzlan, J. (2009): Arsenic and zinc in impoundment materials and related stream sediments from a polluted area in eastern Slovakia: distribution, mobility, and water quality. Journal of Hydrology and Hydromechanics, 57, 3, 200-211.

Jedličková, Z. (1981): *Pseudomonas aeruginosa.* Studie ČSAV. Academia, Praha. 1-131.

Jegadeesan, G., Al-Abed, S.R., Pinto, P. (2008): Influence of trace metal distribution on its leachability from coal fly ash. Fuel, 87, 10-11, 1887-1893.

Jenkis, Ch.L., Andrewes, A.G., Mcquade,T.J., Starr, M.P. (1979): The pigment of *Pseudomonas paucimobilis* is a carotenoid (nostoxanthin), rather than a brominated aryl-polyene (xanthomonadin). Current Microbiology, 3, 1, 1-4.

Johnson, D.B. (2008): Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms: key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates. The Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 18, 6, 1367-1373.

Johnson, J.L., Palleroni, N.J. (1989): Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. International Journal of Systematic Bacteriology, 39, 3, 230-235.

Jones, A., Goodfellow, M. (2012): Genus II. *Rhodococcus* (Zopf 1891) Emend Goodfellow et al. 1998. In: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Volume 5: The Actinobacteria, Part A. Springer, 1-65.

Jones, K.B., Ruppert, L.F., Swanson, S.M. (2012): Leaching of elements from bottom ash, economizer fly ash, and fly ash from two coal-fired power plants. International Journal of Coal Geology, 94, 337-348.

Joshi, T., Iyengar, L., Singh, K., Garg, S. (2008): Isolation, identification and application of novel bacterial consortium TJ-1 for the decolourization of structurally different azodyes. Bioresource Technology, 99, 15, 7115–7121.

Joshi-Tope, G., Francis, A.J. (1995): Mechanism of biodegradation of metal-citrate complexes by *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Bacteriology, 177, 8, 1989-1993.

Jurkovič, Ľ., Veselská, V., Gučková, V., Frankovská, J. (2008): Geochemické zhodnotenie kontaminácie pôd arzénom v oblasti Zemianskych Kostolian. Acta Environmentalica Universitatis Comenianae, Bratislava, 16, 1, 47-55.

Jurkovič, Ľ., Hiller, E., Veselská, V., Peťková, K. (2011): Arsenic concentrations in soil impacted by dam failure of coal-ash pond in Zemianske Kostolany, Slovakia. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 86, 4, 433-437.

Jurkovič, Ľ., Peťková, K., Veselská, V., Voleková, B., Hiller, E., Šimonovičová, A., Vojtková, H., Majzlan, J., Bolanz, R., Čerňanský, S., Molnárová, M., Faragó, T., Slebodníková, Z. (2014): Mineralogické, geochemické a mikrobiologické vlastnosti pochovaných antropogénnych sedimentov na modelovej lokalite z pohľadu potenciálnej remediácie environmentálnej záťaže. In: Vzdelávacie semináre – sanácie v teórii a praxi. Zborník prednášok z odborného seminára Kontaminanty v životnom prostredí. SAH, Bratislava, 32-35.

Juteau, P., Larocque, P., Rho, D., Leduy, A. (1999): Analysis of the relative abundance of different types of bacteria capable of toluene degradation in a compost biofilter. Applied Microbiology and Biotechnology, 52, 6, 863-868.

Kaduková, J., Horváthová, H. (2012): Biosorption of copper, zinc and nickel from multi-ion solutions. Nova Biotechnologica et Chimica, 11, 2, 125-132.

Kagami, T., Natari, T., Kuroda, M., Notaguchi, E., Yamashita, M., Sei, K., Soda, S., Ike, M. (2013): Effective selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from the aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. Water Research, 47, 3, 1361-1368.

Kalogerakis, N. (2006): Bioaugmentation - is it really needed for the bioremediation of contaminated sites? Protection and Restoration of the Environment VIII, Chania, Greece, 1-8.

Kandeler, E., Kampichler, C., Horak, O. (1996): Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. Biology and Fertility of Soils, 23, 299-306.

Kang, Y., Liu, G., Chou, Ch.-L., Wong, M.H., Zheng, L., Ding, R. (2011): Arsenic in Chinese coals: Distribution, modes of occurrence, and environmental effects. Science of the Total Environment, 412-413, 1-13.

Kapoor, A., Viraraghavan, T. (1995): Fungal biosorption – an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. Bioresource Technology, 53, 195-206.

Kapoor, A., Viraraghavan, T. (1997): Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. Biosource Technology, 61, 3, 221-227.

Kapoor, A., Viraraghavan, T., Cullimore, D.R. (1999): Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, 70, 1, 95-104.

Karayigit, A.I., Spears, D.A., Booth, C.A.(2000): Antimony and arsenic anomalies in the coal seams from the Gokler Coalfield, Gediz, Turkey. International Journal of Coal Geology, 44, 1, 1-17.

Karlson, U., Frankenberger, W.T. (1990): Volatilization of selenium from agricultural evaporation pond sediments. The Science of the Total Environment, 92, 41-54.

Kašáková, H., Vojtková, H., Jablonka, R. (2012). Biodegradation of oil sludge using bacterial organisms. In: 12th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2012. STEF92 Technology Ltd., Sofia, Vol. 2, 435-440.

Keegan, T., Hong, B., Thornton, I., Farago, M., Jakubis, P., Jakubis, M., Pesch, B., Ranft, U., Nieuwenhuijsen, M.J., The Expascan Study Group (2002): Assessement of environmental arsenic levels in Prievidza district. Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology, 12, 3, 179-185.

Kerin, E.J., Gilmour, C.C., Roden, E., Suzuki, M.T., Coates, J.D., Mason, R.P. (2006): Mercury methylation by dissimilatory iron-reducing bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 72, 12, 7919-7921.

Kernátsová, J., Vaněková, H., Harčová, E., Ivanov, M., Fordinál, K. (2005): 05 - Klimatický vývoj kvartéru na Hornej Nitre a jeho vplyv na živé ekosystémy. Časť B: Paleoklimatické zmeny počas kvartérneho vývoja. Úloha výskumu a vývoja „Vplyv geologických faktorov na kvalitu života“ podprogramu „Vplyv stavebných materiálov, konštrukcií a geologických faktorov na kvalitu života“ štátneho programu výskumu a vývoja „Kvalita života - zdravie, výživa a vzdelávanie“. Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava, 1-127.

Kersters, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M., Schleifer, K.H. (1996): Recent changes in classification of pseudomonads: An overview. Journal Systematic and Applied Microbiology, 19, 4, 465-477.

Khoo, K.M., Thing, Y.P. (2001): Biosorption of gold by immobilized fungal biomass. Biochemical Engineering Journal, 8, 1, 51-59.

Killingley, J., McEvoy, S., Dokumcu, C., Stauber, J., Dale, L. (2000): Trace element leaching from fly ash from Australian power stations. End of grant report, Australian coal association research program, project C8051, CSIRO division of energy technology, 1-98.

Kim, A.G. (2006): The effect of alkalinity of Class F PC fly ash on metal release. Fuel, 85, 10-11, 1403-1410.

King, A.B., Dudeney, A.W.L. (1987): Bioleaching of nepheline. Hydrometallurgy, 19, 1, 69-81.

Klukanová, A., Ondrejka, P., Wagner, P., Pauditš, P., Jelínek, R., Liščák, P., Bednárik, M., Maas, P. (2005): 01 - Inžinierskogeologické faktory. Úloha výskumu a vývoja „Vplyv geologických faktorov na kvalitu života“ podprogramu „Vplyv stavebných materiálov, konštrukcií a geologických faktorov na kvalitu života“ štátneho programu výskumu a vývoja „Kvalita života - zdravie, výživa a vzdelávanie“. Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava, 1-78.

Kolenčík, M., Čerňanský, S., Urík, M., Littera, P., Molnárová, M., Gardošová, K., Štubňa, J., Vojtková, H., Chlpík, J. (2012): Solubilization of toxic metal mineral by the *Aspergillus niger* strain and oxalic acid. Fresenius Environmental Bulletin, 21, 8a, 2289-2297.

Kolenčík, M., Čerňanský, S., Urík, M., Littera, P., Ševc, J., Molnárová, M., Gardošová, K., Bačík, P. (2011a): Chemické a mikrobiálne lúhovanie Mn z polyfázovej zlúčeniny arzeničnanov, oxidov a hydrooxidov mangánu. Acta Environmentalica Universitatis Comenianae (Bratislava), 19, 1, 187-193.

Kolenčík, M., Urík, M., Gardošová, K., Littera, P., Matúš, P. (2011b): Chemické a mikrobiálne lúhovanie zinku a arzénu z adamitu. Chemické listy, 105, 12, 961-965.

Kolenčík, M., Urík, M., Bujdoš, M., Gardošová, K., Littera, P., Puškelová, Ľ., Gregor, M., Matúš, P. (2013): Lúhovanie hliníka, železa, cínu, kobaltu a zlata z elektronických odpadov pôsobením organických kyselín a mikroskopickej vláknitej huby *Aspergillus niger*. Chemické listy, 107, 2, 182-185.

Kolker, A., Huggins, F.E., Palmer, C.A., Shah, N., Crowley, S.S., Huffman, G.P., Finkelman, R.B. (2000): Mode of occurrence of arsenic in four

US coals. Fuel Processing Technology, 63, 2-3, 167-178.

Konstantinidis, K.T., Isaacs, N., Fett, J., Simpson, S., Long, D.T., Marsh, T.L. (2003): Microbial diversity and resistance to copper in metal-contaminated lake sediment. Microbial Ecology, 45, 191-202.

Kostakis, G. (2009): Characterization of the fly ashes from the lignite burning power plants of northern Greece based on their quantitative mineralogical composition. Journal of Hazardous Materials, 166, 2-3, 972-977.

Koukouzas, N.K., Zeng, R., Perdikatsis, V., Xu, W., Kakaras, E.K. (2006): Mineralogy and geochemistry of Greek and Chinese coal fly ash. Fuel, 85, 16, 2301-2309.

Koukouzas, N., Hämäläinen, J., Papanikolaou, D., Tourunen, A., Jäntti, T. (2007): Mineralogical and elemental composition of fly ash from pilot scale fluidised bed combustion of lignite, bituminous coal, wood chips and their blends. Fuel, 86, 14, 2186-2193.

Koukouzas, N., Ward, C. R., Papanikolaou, D., Li, Z., Ketikidis, C. (2009): Quantitative evaluation of minerals in fly ashes of biomass, coal and biomass-coal mixture derived from circulating fluidised bed combustion technology. Journal of Hazardous Materials, 169, 1-3, 100-107.

Kozdrój, J., van Elsas, J.D. (2001): Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. Applied Soil Ecology, 17, 31-42.

Krčmová, K., Rapant, S. (2007): Environmental exposure to arsenic and associated health risk for residents in Horná Nitra region: A geochemical and medical research. Mineralia Slovaca, 39, 1, 75-80.

Krebs, W., Brombacher, Ch., Bosshard, P.P., Bachofen, R., Brandl, H. (1997): Microbial recovery of metals from solids. FEMS Microbiology Reviews, 20, 605-617.

Krieg, N.R., Holt, J.G. (Ed.) (1984): Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 1. Baltimore: Williams & Wilkins

Krishna, M.P., Varghese, R., Babu, A.V., Hatha, A.A.M. (2012): Bioaccumulation of cadmium by *Pseudomonas* sp. isolated from metal polluted industrial region. Environmental Research, Engineering and Management, 3, 61, 58-64.

Kukier, U., Ishak, Che F., Sumner, M.E., Miller, W.P. (2003): Composition and element solubility of magnetic and non-magnetic fly ash fractions. Environmental Pollution, 123, 2, 255-266.

Kulkarni, S., Syed, A., Singh, S., Gaikwad, A., Patil, K., Vijayamohanan, K., Ahmad, A., Ogale, S. (2008): Silicate nanoparticles by bioleaching of glass and modification of the glass surface. Journal of Non-Crystalline Solids, 354, 29, 3433-3437.

Kurosawa, K., Boccazzi, P., de Almeida, N.M., Sinskey, A.J. (2010): High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD630 using a high glucose concentration for triacylglycerol production, 147, 3-4, 212-218.

Kušnierová, M., Fečko, P. (2001): Minerálne biotechnológie I. v ťažbe a úprave sulfidických ložísk. VŠB – Technická univerzita Ostrava, 1-143.

Kutchko, B.G., Kim, A.G. (2006): Fly ash characterization by SEM-EDS. Fuel, 85, 17-18, 2537-2544.

Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B. (2010): *Rhodococcus* biosurfactants: biosynthesis, properties, and potential applications. In: Alvarez, H.M. (ed.) Biology of *Rhodococcus*. Springer, 291-313.

Lang, S., Philp, J.C. (1998): Surface-active lipids in rhodococci. Antonie van Leeuwenhoek, 74, 1, 59-70.

Larkin, M.J., Kulakov, L.A., Allen, C.C. (2006): Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology and genetic adaption. Advances in Applied Microbiology, 59, 1-29.

Larkin, M.J., Kulakov, L.A., Allen, C.C. (2005): Biodegradation and *Rhodococcus*-masters of catabolic versatility. Current Opinion in Biotechnology, 16, 3, 282-290.

Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran,H., Kong, F. (2004): The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends in Molecular Medicine, 10, 12, 599-606.

Ledin, M. (2000): Accumulation of metals by microorganisms - processes and importance for soil systems. Earth-Science Reviews, 51, 1-4, 1-31.

Legisa, M., Gradisnik-Grapulin, M. (1995): Sudden substrate dilution induces a higher rate of citric acid production by *Aspergillus niger*. Applied and Environmental Microbiology, 61, 7, 2732-2737.

Leitner, J., Mikulec, J. (1991): Thermodynamic analysis of the deposition of GaAs epitaxial layers prepared by the MOCVD method. Journal of Crystal Growth, 112, 437-444.

Letek, M., González, P., Macarthur, I., Rodríguez, H., Freeman, T.C., Valero-Rello, A., Blanco, M., Buckley, T., Cherevach, I., Fahey, R., Hapeshi, A., Holdstock, J., Leadon, D., Navas, J., Ocampo, A., Quail, M.A., Sanders, M., Scortii, M.M.,

Prescott, J.F., Fogarty, U., Meijer, W.G., Parkhill, J., Bentley, S.D., Vázquez-Boland, J.A. (2010): The genome of a pathogenic *Rhodococcus*: cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions. PLoS Genetics, 6(9), e1001145.

Li, D., He X., Tao, Y., Wan, X. (2011): *Pseudomonas alcaliphila* MBR and its application in bioreduction and biosorption. Patent US20110269169 A1 (Chinese patent application CN200810044958.5). Chengdu Institute of Biology, Chiness Acdemy of Sciencess, 2011.

Li, P., Wu, C., Wu, Q., Li, J., Li, H. (2009): Biosynthesis of different morphologies of $CaCO_3$ nanomaterial assisted by thermophilic strains HEN-Qn1. Journal of Nanoparticles Research, 11, 903-908.

Li, Y., Kawamura, Y., Fujiwara, N., Naka, T., Liu, H.S., Huang, X.X., Kobayashi, K., Ezaki, T. (2004): *Rothiaaeria* sp. nov., *Rhodococcus baikonurensis* sp. nov. and *Arthrobacter russicus* sp. nov., isolated from air in the Russian space laboratory Mir. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 54, 3, 827-835.

Li, Z., Ward, C.R., Gurba, L.W. (2007): Occurrence of non-mineral inorganic elements in low-rank coal macerals as shown by electron microprobe element mapping techniques. International Journal of Coal Geology. 70, 1-3, 137-149.

Lilova, K., Karamanev, D., Flemming, R.L., Karamaneva, T. (2007): Biological oxidation of metallic copper by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Biotechnology and Bioengineering, 97, 2, 308-345.

Liu, H.L., Chiu, C.W., Cheng Y.C. (2003): The effects of metabolites from the indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans* and temperature on the bioleaching of cadmium from soil. Biotechnology and Bioengineering, 83, 6, 638-645.

Liu, H.L., Chen, B.Y., Lan, Y.W., Cheng, Y.C. (2004): Biosorption of Zn(II) and Cu(II) by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*. Chemical Engineering Journal, 97, 2-3, 195-201.

Liu, G., Vassilev, S. V., Gao, L., Zheng, L., Peng, Z. (2005): Mineral and chemical composition and some trace element contents in coals and coal ashes from Huaibei coal field, China. Energy Conversion and Management, 46, 13-14, 2001-2009.

Liu, Y.G., Zhou, M., Zeng, G.M., Li, X., Xu, W.H., Fan, T. (2007a): Effect of solids concentration on removal of heavy metals from mine tailings via bioleaching. Journal of Hazardous Materials, 141, 1, 202-208.

Liu, H., He, Y., Jiang, H., Peng, H., Huang,, X., Zhang, X., Thomashow, L.S., Xu, Y. (2007b): Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere. Current Microbiology, 54, 4, 302-306.

Lofts, S., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Tipping, E. (2004): Deriving soil critical limits for Cu, Zn, Cd, and Pb: A method based on free ion concentrations. Environmental Science and Technology 38, 13, 3623-3631.

Loseto, L.L., Siciliano, S.D., Lean, D.R. (2004): Methylmercury production in High Arctic wetlands. Environmental Toxicology and Chemistry, 23, 1, 17-23.

Lovley, D.R. (1993): Dissimilatory metal reduction. Annual Review of Microbiology, 47, 263-290.

Lu, S.G., Chen, Y.Y., Shan, H.D., Bai, S.Q. (2009): Mineralogy and heavy metal leachability of magnetic fractions separated from some Chinese coal fly ashes. Journal of Hazardous Materials, 169, 1-3, 246-255.

Lührmann, A., Mauder, N., Sydor, T., Fernandez-Mora, E., Schulze-Luehrnmann, J., Takai, S., Haas, A. (2004): Necrotic death of *Rhodococcus equi*-infected macrophagesis regulated by virulence-associated plasmids. Infection and Immunity, 72, 2, 853-862.

Luptáková, A., Kaduková, J. (2002): Možnosti biologického odstraňovania medi z odpadových vôd. Chemické Listy, 96, 805-808.

Lyalikova, N.N., Vedenina, I.Y.A, Romanova, A.K. (1976): Assimilation of carbon dioxide by a culture of *Stibiobacter senarmontii*. [Article in Russian]. Mikrobiologiia, 45, 552-554.

Macaskie, L.E. (1990): An immobilized cell bioprocess for removal of heavy metals from aqueous flows. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 49, 4, 330-334.

Macaskie, L.E., Dean, A.C.R. (1990): Metal-sequestering biochemicals. In: Volesky, B. (Ed.): Biosorption of heavy metals, CRC Press, Boca Raton, FL, 199-248.

Macdonald, C.A., Yang, X., Clark, I.M., Zhao, F.J., Hirsch, P.R., McGrath, S.P. (2010): Relative impact of soil, metal source and metal concentration on bacterial community structure and community tolerance. Soil Biology and Biochemistry, 42, 1408-1417.

Mack, C., Wilhelmi, B., Duncan, J.R., Burgess, J.E. (2007): Biosorption of precious metals. Biotechnology Advances, 25, 3, 264-271.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2000): Brock biology of microorganisms. 9th Edition; Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1-992.

Mahamid, J., Sharir, A., Addadi, L., Weiner, S. (2008): Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: Indications for an amorphous precursor phase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 35, 12748-12753.

Maheswari, S., Murugesan, A.G. (2009): Remediation of arsenic in soil by *Aspergillus nidulans* isolated from an arsenic-contaminated site. Environmental Technology, 30, 9, 921-926.

Mahuli, S., Agnihotri, R., Chauk, S., Ghosh-Dastidar, A., Fan, L.-S. (1997): Mechanism of arsenic sorption by hydrated lime. Environmental Science and Technology, 31, 11, 3226-3231.

Machajová, Z., Verbich, F., Sýkorová, I. (2000): Geologická a petrografická charakteristika ložiska Handlová. Acta Montanistica Slovaca, 5, 3, 261-264.

Maidack, B.L., Olsen, G.J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M.J., Woese, C.R. (1996): The ribosomal database project (RDP). Nucleic Acids Research, 24, 1, 82-85.

Malik, A. (2004): Metal bioremediation through growing cells. Environmental International, 30, 2, 261-278.

Mandal, B.K., Suzuki, K.T. (2002): Arsenic round the world: A review. Talanta, 58, 201-235

Mandryk, M.N., Kolomiets,,E.I., Dey, E.S. (2007): Characterization of antimicrobial compounds produced by *Pseudomonas aurantiaca* S-1. Polish Journal of Microbiology, 56, 4, 245-250.

Manz, O.E. (1998): Coal fly ash: A retrospective and future look. Energeia. University of Kentucky, Center for Applied Energy Research, 9, 2, 1-6.

Margesin, R., Labbé, D., Schinner, F., Greer, C.W., Whyte, L.G. (2003): Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. Applied and Environmental Microbiology, 69, 6, 3085-3092.

Margesin, R., Płaza, G.A., Kasenbacher, S. (2011): Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. Chemosphere, 82, 1583-1588.

Margoshes, M., Vallee, B.L. (1957): A cadmium protein from equine kidney cortex. Journal of the American Chemical Society, 79, 17, 4813-4814.

Mark, G.L., Morrissey, J.P., Higgins,P., O'Gara, F. (2006): Molecular based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. FEMS Microbiology Ecology, 56, 2, 167-177.

Martinez-Tarrazona, M.R., Spears, D.A. (1996): The fate of trace elements and bulk minerals in pulverized coal combustion in a power station. Fuel Processing Technology, 47, 1, 79-92.

Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nešvera, J., Křen, V. (2009): Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus.* Environment International, 35, 1, 162-177.

Mason, R.P. (2012): The methylation of metals and metalloids in aquatic systems. Chapter 11. In: Dricu, A. (ed.): Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment. InTech, 1-32.

Mastalerz, M., Drobniak, A. (2007): Arsenic, cadmium, lead, and zinc in the Danville and Springfield coal members (Pennsylvanian) from Indiana. International Journal of Coal Geology, 71, 1, 37-53.

Máthé, I., Benedek, T., Táncsics, A., Palatinszky, M., Lányi, S., Márialigeti, K. (2012): Diversity, activity, antibiotic and heavy metal resistance of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils located in Harghita County (Romania). International Biodeterioration and Biodegradation, 73, 41-49.

McCaig, A.E., Glover, L.A., Prosser, J.J. (2001): Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. Applied and Environmental Microbiology, 67, 4554-4559.

McKinney, R.E. (2004): Environmental Pollution Control Microbiology. A Fifty-Year Perspective. CRC Press, doi: 10.1201/9780203025697.fmatt

Medina, A., Gamero, P., Querol, X., Moreno, N., De León, B., Almanza, M., Vargas, G., Izquierdo, M., Font, O. (2010): Fly ash from a Mexican mineral coal I: Mineralogical and chemical characterization. Journal of Hazardous Materials, 181, 1-3, 82-90.

Mehnaz, S., Baig, D.N., Jamil, F., Weselowski, B., Lazarovits, G. (2009): Characterization of a phenazine and hexanoyl homoserine lactone producing *Pseudomonas aurantiaca* strain PB-St2, isolated from sugarcane stem. Journal of Microbiology and Biotechnology, 19, 12, 1688-1694.

Mehra, R.K., Winge, D.R. (1991): Metal ion resistance in fungi. Molecular mechanisms and their regulated expression. Journal of Cellular Biochemistry, 45, 1, 30-40.

Mecháček, E., Petrík, F. (1967): Distribúcia stopových prvkov v uhoľných slojoch handlovsko-nováckeho ložiska. Geologický prúzkum, 8, 266-268.

Mergaert, J., Verhelst, A., Cnockaert, M.C., Tan, T.L., Swings, J. (2001): Characterization off a cultative oligotrophic bacteria from polar seas by analysis of their fatty acids and 16S rDNA sequences. Systematic and Applied Microbiology, 24, 1, 98-107.

Meyer, J., Schmidt, A., Michalke, K., Hansel, R. (2007): Volatilisation of metals and metalloids by the microbial population of an alluvial soil. Systematic and Applied Microbiology, 30, 3, 229-238.

Meyer, J.M., Geoffroy, V.A.,Baida, N.,Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak,W., Palleroni, N.J. (2002): Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. Applied and Environmental Microbiology, 68, 6, 2745-2753.

Migula, N. (1894): Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe 1, 235-238.

Migula, W. (1900): System der Bakterien: Handbuch der Morphologie, Entwickelungs-geschichte und Systematik der Bakterien. Verlag von Gustav Fischer, Jena, 875-954.

Migula, W. (1984): Über ein neues System der Bakterien. Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe, 1, 235-238.

Michalke, K., Wickenheiser, E.B., Mehring, M., Hirner, A.V., Hensel, R. (2000): Production of volatile derivatives of metal(loid)s by microflora involved in anaerobic digestion of sewage sludge. Applied and Environmental Microbiology, 66, 7, 2791-2796.

Mikulková, R., Buchancová, J., Kubík, J., Valachová, J. (2007): Aký je obsah arzénu v biologickom materiáli pri dlhoročnej práci u baníkov hornonitrianskych baní? České pracovní lékařství, 1, 17-21.

Mishra, D.P., Das, S.K. (2010): A study of physico-chemical and mineralogical properties of Talcher coal fly ash for stowing in underground coal mines. Materials Characterization, 61, 11, 1252-1259.

Moffett, B.F., Nicholson, F.A., Uwakwe, N.C., Chambers, B.J., Harris, J.A., Hill, T.C.J. (2006): Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. FEMS Microbiology Ecology, 43, 13-19.

Mohapatra, D., Mishra, D., Chaudhury, G.R., Das, R.P. (2008): Removal of arsenic from arsenic rich sludge by volatilization using anaerobic microorganisms treated with cow dung. Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 17, 3, 301-311.

Mohapatra, D.K., Mohanty, L., Mohanty, R.C., Mohapatra, P.K. (1997): Biotoxicity of mercury to *Chlorella vulgaris* as influenced by amino acids. Acta Biologica Hungarica, 48, 4, 497-504.

Moore, E.R.B., Mau, M., Arnscheidt, A., Böttger, E.C., Hutson, R.A., Collins, M.D., Van De Peer, Y., De Wachter, R., Timmis, K.N. (1996): The determination and comparison of the rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of natural intrageneric relationships. Systematic and Applied Microbiology, 19, 4, 478-492.

Moore, E.R.B., Tindall, B.J., Martins Dos Santos, V.A.P., Pieper, D.H., Ramos, J.-L., Palleroni, N.J. (2006): Nonmedical: *Pseudomonas*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, R. (Eds.): The Prokaryotes, Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. Springer, 646-703.

Moreno, N., Querol, X., Andrés, J.M., Stanton, K., Towler, M., Nugteren, H., Janssen-Jurkovicová, M., Jones, R. (2005): Physico-chemical characteristics of European pulverized coal combustion fly ashes. Fuel, 84, 11, 1351-1363.

Moreno-Jiménez, E., Manzano, R., Esteban, E., Peñalosa, J. (2010): The fate of arsenic in soils adjacent to an old mine site (Bustarviejo, Spain): mobility and transfer to native flora. Journal of Soils and Sediments, 10, 301-312.

Morlon-Guyot, J., Méré, J., Bonhoure, A., Beaumelle, B. (2009): Processing of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A is dispensable for cell intoxication. Infection and Immunity, 77, 7, 3090-3099.

Morton, A.C., Begg, A.P., Anderson, G.A., Takai, S., Lämmler, C., Browning, G.F. (2001): Epidemiology of *Rhodococcus equi* strains on Thoroughbred horse farms. Applied and Environmental Microbiology, 67, 5, 2167-2175.

Moslemy, P, Neufeld, R.J., Millette, D., Guiot, S.R. (2003): Transport of gellan gum microbeads through sand: an experimental evaluation for encapsulated cell bioaugmentation. Journal of Environmental Management, 69, 3, 249-259.

Moslemy, P., Neufeld, R.J., Guiot, S.R. (2002): Biodegradation of gasoline by gellan gum-

encapsulated bacterial cells. Biotechnology and Bioengineering, 80, 2, 175-184.

Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z. (2010): Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. Microbiological Research, 165, 363-375.

Mukherjee, A., Das, D., Mondal, S.K., Biswas, R., Das, T.K., Boujedaini, N., Khuda-Bukhsh, A.R. (2010): Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73, 172-182.

Mukhopadhyay, P.K., Lajeunesse, G., Crandlemire, A.L. (1996): Mineralogical speciation of elements in an eastern Canadian feed coal and their combustion residues from a Canadian power plant. International Journal of Coal Geology, 32, 1-4, 279-312.

Muliukin, A.L., Kozlova, A.N., El´-Registan, G.I. (2008): Properties of the phenotypic variants of *Pseudomonas aurantiaca* and *P. fluorescens*. Mikrobiologiia. [Article in Russian], 77, 6, 766-776.

Müller, A.K., Westergaard, K., Christensen, S., Sørensen, S.J. (2001): The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. FEMS Microbiology Ecology, 36, 11-19.

Mulligan, C.N., Kamali, M., Gibbs, B.F. (2004): Bioleaching of heavy metals from a low-grade mining ore using *Aspergillus niger*. Journal of Hazardous Materials, 110, 1-3, 77-84.

Muzzarelli, R.A.A., Tanfani. F., Scarpini. G.F., Muzzarelli, M.G. (1979): ESR characterization of chitins and chitosans. Biochemical and Biophysical Research Communications, 89, 706-712.

Nagashetti, V., Mahadevaraju, G.K., Muralidhar, T.S., Javed, A., Trivedi, D., Bhusal, K.P. (2013): Biosorption of heavy metals from soil by *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering, 2, 6, 22-24.

Nagy, I., Schoofs, G., Compernolle, F., Proost, P., Vanderleyden, J., De Mot, R. (1995): Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S-ethyldipropylcarbamothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 involve an inducible cytochrome P-450 system and aldehyde dehydrogenase. Journal of Bacteriology, 177, 3, 676-687.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. (2003): Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science, 54, 4, 655-670.

Niu, H., Volesky, B. (2003): Characteristics of anionic metal species biosorption with waste crab shells. Hydrometallurgy, 71, 1-2, 209-215.

Nusslein, K., Tiedje, J.M. (1999): Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. Applied and Environmental Microbiology, 65, 3622-3626.

O´Leary, W. (1989): Practical Handbook of Microbiology. CRC Press, Boca Raton, 58-66.

Ohhata, N., Yoshida, N., Egami, H., Katsugari, T., Tani, Y., Takagi, H. (2007): An extremely oligotrophic bacterium, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4, isolated from crude oil. Journal of Biotechnology, 189, 19, 6824-6831.

Ochiai, E. (1977): Bioinorganic chemistry: An introduction. Allyn and Bacon, Boston, 1-515.

Openshaw, S.C., Miller, W.L., Bolch, W.E., Bloomquist, D. (1992): Utilization of Coal Fly Ash. Florida Center For Solid and Hazardous Waste Management. Report, 1-74.

O'Sullivan, D.J., O'Gara, F. (1992): Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 56, 4, 662-676.

Oyaizu, H., Komagata, K. (1983): Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. The Journal of General and Applied Microbiology, 29, 1, 17-40.

Oyetibo, G.O., Ilori, M.O., Obayori, O.S., Amund, O.O. (2013): Biodegradation of petroleum hydrocarbons in the presence of nickel and cobalt. Journal of Basic Microbiology, 53, 11, 917-927.

Paknikar, K.M., Palnitkar, U.S., Puranik, P.R. (1993): Biosorption of metal from solution by mycelial waste *Penicillium chrysogenum.* In: Torma, A.E., Apel, M.L., Brierley, C.L. (eds.): Biohydrometallurgical Technologies, Vol. II. Warrendale: Mineral, Metal and Materials Society, 125-132.

Palleroni, N.J. (1984): Genus I. *Pseudomonas* (Migula 1894). In: Krieg, N.R., Holt, G. (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 141-199.

Palleroni, N.J. (1992): Present situation of the taxonomy of aerobic pseudomonads. In: Galli, E., Silver, S., Witholt, B. (eds.). *Pseudomonas*: molecular biology and biotechnology. ASM

Press, Washington, D.C, American Society for Microbiology, 105-115.

Palleroni, N.J. (1993): *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 64, 3-4, 231-251.

Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R., Doudoroff, M. (1973): Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 23, 4, 333-339.

Palmiter, R.D. (1998): The elusive function of metallothioneins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 95, 15, 8428-8430.

Pandey, V.Ch., Singh, N. (2010): Impact of fly ash incorporation in soil systems. Agriculture, Ecosystems and Environment, 136, 1-2, 16-27.

Pandey, V.Ch., Singh, J.S., Singh, R.P., Singh, N., Yunus, M. (2011): Arsenic hazards in coal fly ash and its fate in Indian scenario. Resources, Conservation and Recycling, 55, 9-10, 819-835.

Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E., Vega, M. (2003): Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. Anaytical and Bioanalytical Chemistry, 376, 1, 26-32.

Park, J.H., Lamb, D., Paneerselvam, P., Choppala, G., Bolan, N., Chung, J.W. (2011): Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. Journal of Hazardous Materials, 185, 2-3, 549-574.

Pathak, A., Dastidar, M.G., Sreekrishnan, T.R. (2009): Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: A review. Journal of Environmental Management, 90, 8, 2343-2353.

Pažická, A., Brčeková, J., Klimko, T., Jurkovič, Ľ., Peťková, K., Kordík, J., Slaninka, I. (2014): Charakteristika geogénneho a antropogénneho pôvodu potenciálne toxických stopových prvkov vo vybratých riečnych sedimentoch Slovenska na základe geochemického a mineralogického hodnotenia prostredia terciéru Západných Karpát. Mineralia Slovaca, 46, 3-4, 117-126.

Pažická, A., Ballová, M. (2013): Mobilizovateľný podiel vybraných stopových prvkov z riečnych sedimentov na modelových lokalitách SR. In: Geochémia 2013, ŠGÚDŠ, Bratislava, 138-139.

Pearce, R.B., Callow, M.E., Macaskie, L.E. (1998): Fungal volatilization of arsenic and antimony and the sudden infant death syndrome. FEMS Microbiology Letters, 158, 261-265.

Pei, X., Yang, L., Xu, G., Wang, Q., Wu, J. (2014): Discovery of a new Fe-type nitrile hydratase efficiently hydrating aliphatic and aromatic nitriles by genome mining. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 99, 26-33.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E. (2009): Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. Infection, Genetics and Evolution, 9, 6, 1132-1147.

Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Ramírez-Bahena, M.H., Mateos, P.F., Santa-Regina, I., Rodríguez-Barrueco, C. Martínez-Molina, AE., Velázquez, E.. (2007): Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* as a synonym of *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiac*a subsp. nov., comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57, 6, 1286-1290.

Pennanen, T., Perkiömäki, J., Kiikkilä, O., Vanhala, P., Neuvonen, S., Fritze, H. (1998): Prolonged, simulated acid rain and heavy metal deposition: separated and combined effects on forest soil microbial community structure. FEMS Microbiology Ecology, 27, 3, 291-300.

Pérez Silva, R.M, Abalos-Rodríguez, A., Gómez Montes De Oca, J.M., Cantero Moreno, D. (2009): Biosorption of chromium, copper, manganese and zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum. Bioresource Technology, 100, 4, 1533-1538.

Pérez, R.M., Abalos, A., Gómez, J.M., Cantero, D. (2007): Biosorption of heavy metals by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a petroleum contaminated site. Advanced Materials Research, Vol. 20-21, 615-618.

Pesch, B., Ranft, U., Jakubis, P., Nieuwenhuijsen, M.J., Hergemöller, A., Unfried, K., Jakubis, M., Miskovic, P., Keegan, T., The EXPASCAN Study Group (2002): Environmental arsenic exposure from a coal-burning power plant as a potential risk factor for nonmelanoma skin carcinoma: results from a case-control study in the district of Prievidza, Slovakia. American Journal of Epidemiology, 155, 9, 798-809.

Peťková, K., Lalinská-Voleková, B., Jurkovič, Ľ., Veselská, V. (2011): Chemické a minerálne zloženie elektrárenských popolov (lokalita Zemianske Kostolany). Mineralia Slovaca, 43, 4, 377-386.

Peťková, K., Vojtková, H., Švanová, P., Jurkovič, Ľ. Molnárová, M., Remenár, M. (2013): Využitie kmeňa *Rhodococcus* sp. k znižovaniu toxicity antropogénnych sedimentov. In: Geochémia 2013. Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava, 140-142.

Peťková, K., Jurkovič, Ľ., Šimonovičová, A., Čerňanský, S., Molnárová, M., Vojtková, H. (2013a): Štúdium biolúhovania, bioakumulácie a biovolatilizácie arzénu z antropogénnych sedimentov hubou *Aspergillus niger*. Workshop of Young Researchers VŠB–TUO 2013. VŠB - TU Ostrava, 11-13.

Peťková, K., Jurkovič, Ľ., Vojtková, H., Molnárová, M., Čerňanský, S. (2013b): Biolúhovanie ťažkých kovov z kontaminovaných pôd vybranými druhmi baktérií rodu *Pseudomonas*. In: Sanační technologie XVI. Vodní zdroje Ekomonitor, Chrudim, 152-155.

Peťková, K., Jurkovič, Ľ., Šimonovičová, A., Molnárová, M., Slebodníková, Z. (2014a): Bioremediačný potenciál odstraňovania anorganických polutantov použitím *Aspergillus niger*. Waste Forum, 1, 25-28.

Peťková, K., Vojtková, H., Jurkovič, Ľ., Ferianc, P., Remenár, M. (2014b): Isolation and identification of bacteria isolates from arsenic contaminated anthroposoils. In: 14th International Multidisciplinary Scientific GeoConference, SGEM 2014. STEF92 Technology Ltd., Sofia, Book 5, Vol. 1, 399-404.

Piotrowska-Seget, Z., Cycoń, M., Kozdrój, J. (2005): Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. Applied Soil Ecology, 28, 237-246.

Plesch, G., Tatiersky, J. (2004): Systematická anorganická chémia. OMEGA INFO, Bratislava, 1-139.

Poelarends, G.J., Zandstra, M., Bosma, T., Kulakov, L.A., Larkin, M.J., Marchesi, J.R., Weightman, A.J., Janssen, D.B. (2000): Haloalkane-utilizing *Rhodococcus* strains isolated from geographically distinct locations possess a highly conserved gene cluster encoding haloalkane catabolism. Journal of Bacteriology, 182, 10, 2725-2731.

Potolokov, V.N., Efremov, V.A., Zhukov, E.G., Pashinkin, A.S., Potolokov, N.A., Fedorov, V.A. (2003): Preparation of high-purity arsenic via hydrogen reduction of arsenic trichloride. Inorganic Materials, 39, 1, 15-21.

Premuzic, E.T., Francis, A.J., Lin, M., Schubert, J. (1985): Induced formation of chelating agents by *Pseudomonas aeruginosa* grown in presence of thorium and uranium. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 14, 6, 759-768.

Prescott, J.F. (1991): *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. Clinical Microbiology Reviews, 4, 1, 20-34.

Priestley, J.T., Coleman, N.V., Duxbury, T. (2006): Growth rate and nutrient limitation affect the transport of *Rhodococcus* sp. strain DN22 through sand. Biodegradation, 17, 6, 571-576.

Putnam, M.L., Miller, M.L. (2007): *Rhodococcus fascians* in herbaceous perennials. Plant Disease Journal, 91, 9, 1064-1076.

Querol, X., Fernández-Turiel, J.L., López-Soler, A. (1995): Trace elements in coal and their behaviour during combustion in a large power station. Fuel, 74, 3, 331-343.

Rainey, F.A., Burghardt, J., Kroppenstedt, R.M., Klatte, S., Stackebrandt, E. (1995): Phylogenetic analysis of genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for the evolunationary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. Microbiology, 141, 523-528.

Rajendran, P., Muthukrishnan, J., Gunasekaran, P. (2003): Microbes in heavy metal remediation. Indian Journal of Experimental Biology, 41, 9, 935-944.

Ramos, J.L., Filloux, A. (2010): *Pseudomonas.* Volume 6: Molecular Microbiology, Infection and Biodiversity. Springer, 1-287.

Ramos, R.J (2004): *Pseudomonas,* Volume 1. Genomics, life style and molecular architecture. Springer US, 1-835.

Ran, H., Hassett, D.J., Lau, G.W. (2003): Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 100, 24, 14315-14320.

Rao, C.R.N., Iyengar, L., Venkobachar, C. (1993): Sorption of copper(II) from aqueous phase by waste biomass. Journal of Environmental Engineering, 119, 2, 369-377.

Rapant, S., Krčmová, K., Cvečková, V., Repčoková, Z. (2005): 03 Geochemické faktory - čiastková záverečná správa. Kvalita života - zdravie, výživa, vzdelávanie. ŠGÚDŠ, Bratislava, 1-84.

Rautaray, D., Ahmad, A., Sastry, M. (2003): Biosynthesis of $CaCO_3$ crystals of complex morphology using a fungus and an actinomycete. Journal of the American Chemical Society, 125, 48, 14656-14657.

Rautaray, D., Ahmad, A., Sastry, M. (2004a): Biological synthesis of metal carbonate minerals using fungi and actinomycetes. Journal of Materials Chemistry, 14, 2333-2340.

Rautaray, D., Sanyal, A., Adyanthaya, S.D., Ahmad, A., Sastry, M. (2004b): Biological synthesis of strontium carbonate crystals using the fungus *Fusarium oxysporum*. Langmuir, 20, 16, 6827-6833.

Rehm, B.H.A. (ed.). (2008): *Pseudomonas*. Model organism, pathogen, cell factory. Wiley-VCH Verlag, Weinheim. 1-424.

Rehman, M., Anwar, M.A., Iqbal, M., Akhtar, K., Khalid, A.M., Ghauri, M.A. (2009): Bioleaching of high grade Pb-Zn ore by mesophilic and moderately thermophilic iron and sulphur oxidizers. Hydrometallurgy, 97, 1-2, 1-7.

Rekha, P.V., John, A.S., Shankar, T. (2010): Antibacterial activity of *Pseudomonas fluorescens* isolated from rhizosphere soil. International Journal of Biological Technology, 1, 3, 10-14.

Ren, J., Prescott, J.F. (2004): The effect of mutation on *Rhodococcus equi* virulence plasmid gene expression and mouse virulence. Veterinary Microbiology, 103, 3, 219-230.

Ren, W.X., Li, P.J., Geng, Y., Li, X.J. (2009): Biological leaching of heavy metals from a contaminated soil by *Aspergillus niger*. Journal of Hazardous Materials, 167, 1-3, 164-169.

Rezza, I., Salinas, E., Elorza, M., Sanz de Tosetti, M., Donati, E. (2001): Mechanisms involved in bioleaching of an aluminosilicate by heterotrophic microorganisms. Process Biochemistry, 36, 495-500.

Ribeiro, M.G., Seki, I., Yasuoka, K., Kakuda, T., Sasaki, Y., Tsubaki, S., Takai, S. (2005): Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, 87-kb type I, and a new variant, 87-kb type III. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 28, 1, 53-61.

Riberio, M.G., Takai, S., De Vargas, A.C., Mattos-Guaraldi, A.L., Ferreira Camello, T.C., Ohno, R., Da Silva, A.V. (2011): Identification of virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi* in humans with and without acquired immunodeficiency syndrome in brazil. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 85, 3, 510-513.

Rizzo, D.M., Blanchette, R.A., Palmer. M.A. (1992): Biosorption of metal ions by *Armillaria rhizomorphs.* Canadian Journal of Botany, 70, 8, 1515-1520.

Roane, T.M., Kellogg, S.T. (1996): Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. Canadian Journal of Microbiology, 42, 6, 593-603.

Roane, T.M., Pepper, I.L. (2000): Microbial responses to environmentally toxic cadmium. Microbial Ecology, 38, 358-364.

Roane, T.M., Rensing, Ch., Pepper, I.L., Maier, R.M. (2009): Chapter 21: Microorganisms and metal pollutants. In: Pepper, I.L., Gerba, Ch.P., Gentry, T., Maier, R.M. (Eds.): Environmental Microbiolgy (Second edition), Academic Press, 421-441.

Robinson, N.J., Whitehall, S.K., Clavet, J.S. (2001): Microbial metallothioneins. Advances in Microbial Physiology, 44, 183-213.

Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M.L., González, F., Muñoz, J.A. (2003): New information on the sphalerite bioleaching mechanism at low and high temperature. Hydrometallurgy, 71, 1-2, 57-66.

Rome, L., Gadd, G.M. (1987): Copper adsorption by *Rhizopus arrhizus*, *Cladospoium resinae* and *Penicillium italicum*. Applied Microbiology and Biotechnology, 26, 1, 84-90.

Romera, E., González, F., Ballester, A., Blázquez, M.L., Muñoz, J.A. (2006): Biosorption with algae: A statistical review. Critical Reviews in Biotechnology, 26, 4, 223-235.

Roy, W.R., Griffin, R.A., Dickerson, D.R., Schuller, R.M. (1984): Illinois Basin coal fly ashes. 1. Chemical characterization and solubility. Environmetal Science and Technology, 18, 10, 734-739.

Rozhodnutie MP SR č. 531/1994-540 o najvyšších prípustných hodnotách škodlivých látok v pôde a určení organizácií oprávnených zisťovať skutočné hodnoty týchto látok. Vestník MP SR, XXVI, 1, 3-10.

Ryu, H.W., Joo, Y.H., An, Y.J., Cho, K.S. (2016): Isolation and characterization of psychrotrophic and halotolerant *Rhodococcus* sp. YHLT-2. Journal of Microbiology and Biotechnology, 16, 4, 605-612.

Sakaguchi, T., Nakajima, A. (1987): Accumulation of uranium by biopigments. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 40, 2, 133-141.

Sakulpitakphon, T., Hower, J.C., Schram, W.H., Ward, C.R. (2004): Tracking mercury from the mine to the power plant: geochemistry of the Manchester coal bed, Clay County, Kentucky. International Journal of Coal Geology, 57, 2, 127-141.

Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I. (1995): Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. Biotechnology, 13, 5, 468-474.

Sand, W., Rohde, K., Sobotke, B., Zenneck, C. (1992): Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. Applied and Environmental Microbiology, 58, 1, 85-92.

Sandaa, R.A., Torsvik, V., Enger, Ø. (2001): Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. Soil Biology and Biochemistry, 33, 287-295.

Sandaa, R.A., Torsvik, V., Enger, O., Daae, F.L., Castberg, T., Hahn, D. (1999): Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. FEMS Microbiology Ecology, 30, 237-251.

Sanford, R.A., Klein, D.A. (1988): Environmental bioremediation for organometallic compounds: Microbial growth and arsenic volatilisation from soil and retorted shale. Applied Organometallic Chemistry, 2, 159-169.

Santhiya, D., Ting, Y.-P. (2005): Bioleaching of spent refinery processing catalyst using *Aspergillus niger* with high-yield oxalic acid. Journal of Biotechnology, 116, 2, 171-184.

Santhiya, D., Ting, Y.-P. (2006): Use of adapted *Aspergillus niger* in the bioleaching of spent refinery processing catalyst. Journal of Biotechnology, 121, 1, 62-74.

Santini, J.M., Sly, L.I., Schnagl, R.D., Macy, J.M. (2000): A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. Applied and Environmental Microbiology, 66, 1, 92-97.

Santo, M., Weitsman, R., Sivan, A. (2013): The role of the copper-binding enzyme – laccase - in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. International Biodeterioration and Biodegradation, 84, 204-210.

Santos, R.M., Van Gerven, T. (2011): Process intensification routes for mineral carbonation. Greenhouse Gases: Science and Technology, 1, 4, 287-293.

Sanyal, A., Rautaray, D., Bansal, V., Ahmad, A., Sastry, M. (2005): Heavy-metal remediation by a fungus as a means of production of lead and cadmium carbonate crystals. Langmuir, 21, 7220–7224.

Sayer, J.A., Cotter-Howells, J.D., Watson, C., Hillier, S., Gadd, G.M. (1999): Lead mineral transformation by fungi. Current Biology, 9, 13, 691-694.

Scullion, J. (2006): Remediating polluted soils. Naturwissenschaften, 93, 2, 51-65.

SE, a.s. (2010): Elektrárne Nováky. Slovenské elektrárne, a.s. člen skupiny ENEL, Bratislava, Brožúra, 1-8.

Seames, W.S. (2003): An initial study of the fine fragmentation fly ash particle mode generated during pulverized coal combustion. Fuel Processing Technology, 81, 2, 109-125.

Seames, W.S., Wendt, J.O.L. (2000): The partitioning of arsenic during pulverized coal combustion. Proceedings of the Combustion Institute, 28, 2305-2312.

Sedláček, I. (2007): Taxonomie prokaryot. 1. vyd., Masarykova univerzita, Brno, 1-270.

Seetharam, S., Chaudhary, V.K., Fitzgerald, D., Pastan, I. (1991): Increased cytotoxic activity of *Pseudomonas* exotoxin and two chimeric toxins ending in KDEL. The Journal of Biological Chemistry, 266, 17376-17381.

Seidel, H., Ondruschka, J., Morgenstem, P., Stottmeister, U. (1998): Bioleaching of heavy metals from contaminated aquatic sediments using indigenous sulfur-oxidizing bacteria: A feasibility study. Water Science and Technology, 37, 6-7, 387-394.

Sekine, M., Tanikawa, S., Omata, S., Saito, M., Fujisawa, T., Tsukatani, N., Tajima, T., Sekigawa, T., Kosugi, H., Matsuo, Y., Nishiko, R., Imamura, K., Ito, M., Narita, H., Tago, S., Fujita, N., Harayama, S. (2006): Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4. Environmental Microbiology, 8, 2, 334-346.

Semenza, M., Viera, M., Curutchet, G., Donati, E. (2002): The role of *Acidithiobacillus caldus* in the bioleaching of metal sulfides. Latin American Applied Research, 32, 4, 303-306.

Senesi, N., Sposito, G., Martin, J.P. (1987): Copper (II) and iron (III) complexation by humic acid-like polymers (melanins) from soil fungi. Science of The Total Environment, 62, 241-252.

Senior, C.L., Helble, J.J., Sarofim, A.F. (2000a): Emissions of mercury, trace elements, and fine particles from stationary combustion sources. Fuel Processing Technology, 65-66, 263-288.

Senior, C.L., Zeng, T., Che, J., Ames, M.R., Sarofim, A.F., Olmez, I., Huggins, F.E., Shah, N., Huffman, G.P., Kolker, A., Mroczkowski, S., Palmer, C., Finkelman, R. (2000b): Distribution of trace elements in selected pulverized coals as a function of particle size and density. Fuel Processing Technology, 63, 2-3, 215-241.

Senior, C.L., Lignell, D.O., Sarofim, A.F., Mehta, A. (2006): Modeling arsenic partitioning in coal-

fired power plants. Combustion and Flame, 147, 3, 209-221.

Shao, L., Jones, T., Gayer, R., Dai, S., Li, S., Jiang, Y., Zhang, P. (2003): Petrology and geochemistry of the high-sulphur coals from the Upper Permian carbonate coal measures in the Heshan Coalfield, southern China. International Journal of Coal Geology, 55, 1, 1-26.

Shao, Z., Dick, W.A., Behki, R.M. (1995): An improved *Escherichia coli* – *Rhodococcus*s huttlevector and plasmid transformation in *Rhodococcus*s pp. Using electroporation. Letters in Applied Mirobiology, 21, 4, 261-266.

Shariatpanahi, M., Anderson, A.C., Abdelghani, A.A., Bdelghani, A., Englande, J., Hughes, J., Wilkinson, R.F. (1981): Biotransformation of the pesticide, sodium arsenate. Journal of Environmental Science and Health. Part B, Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes, 16, 1, 35-47.

Sharma, P.D. (2005): Environmental microbiology. Alpha Science International Ltd., Harrow, 1-372.

Shepelevich, V.V., Kiprianova, E.A., Iaroshenko, L.V., Avdeeva, L.V. (2012): Sensitivity of *Pseudomonas chlororaphis* to antibiotics and chemical tools of plant protection. Mikrobiolohichnyi zhurnal [Article in Russian], 74, 6, 24-28.

Shi, Z., Cao, Z., Qin, D., Zhu, W., Wang, Q., Li, M., Wang, G. (2013): Correlation Models between Environmental Factors and Bacterial Resistance to Antimony and Copper. PLoS ONE, 8(10), e78533.

SHMÚ (2014): Správa o kvalite ovzdušia a podiele jednotlivých zdrojov na jeho znečisťovaní v Slovenskej republike za rok 2012. SHMÚ, MŽP SR, Bratislava, 1-73.

Shumate II, S.E., Strandberg, G.W. (1985): Accumulation of metals by microbial cells. In: Moo-Young, M., Robinson, C.N., Howell, I.A. (Eds.): Comprehensive Biotechnology, vol. 4, Pergamon Press, New York, 1-235.

Scharmann, W. (1976): Cytotoxic effects of leukocidin from *Pseudomonas aeruginosa* on polymorphonuclear leukocytes from cattle. Infection and Immunity,13, 3, 836-843.

Scheetz, B.E. (2004): Chemistry and mineralogy of coal fly ash: basis for beneficial use. In: Proceedings of State Regulation of Coal Combustion By-Product Placement at Mine Sites: A Technical Interactive Forum. Vories, K.C., Harrington, A. (Eds.), Pennsylvania, 35-42.

Scheetz, B.E., Menghini, M.J., Hornberger, R.J., Owen, T.D., Schueck, J. (1997): Beneficial use of coal ash in Anthracite and Bituminous mine reclamation and mine drainage pollution abatement in Pennsylvania. In: Proceedings of Air & Waste Management Association's 90th Annual Meeting & Exhibition, Toronto, Ontario, Kanada, 1-24.

Schippers, A., Sand, W. (1999): Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. Applied and Environmental Microbiology, 65, 1, 319-321.

Scholtz, R., Messi, F., Leisinger, T., Cook, A.M. (1988): Three dehalogenases and physiological restraints in the biodegradation of haloalkanes by *Arthrobacter* sp. strain HA1. Applied and Environmental Microbiology, 54, 12, 3034-3038.

Siddique, T., Arocena, J.M., Thring, R.W., Zhang, Y. (2007): Bacterial reduction of selenium in coal mine tailings pond sediment. Journal of Environmental Quality, 36, 3, 621-627.

Singer, A.C., van der Gast, C.J., Thompson, I.P. (2005): Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. Trends in Biotechnology, 23, 2, 74-77.

Singh, M., Müller, G., Singh, I.B. (2002): Heavy metals in freshly deposited stream sediments of rivers associated with urbanisation of the Ganga plain, India. Water, Air, and Soil Pollution, 141, 1-4, 35-54.

Singh, V., Chauhan, P.K., Kanta, R., Dhewa, T., Kumar, V. (2010): Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metals contaminants. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 3, 2, 164-167.

Singh, R., Bishnoi, N.R., Kirrolia, A., Kumar, R. (2013): Synergism of *Pseudomonas aeruginosa* and Fe0 for treatment of heavy metal contaminated effluents using small scale laboratory reactor. Bioresource Technology, 127, 49-58.

Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A. (1980): Approved lists of bacterial names. International Journal of Systematic Bacteriology, 30, 225-420.

Slebodníková, Z. (2014): Aplikácia biolúhovacích metód pri experimentálnej remediácii kontaminovaných pôd obsahujúcich elektrárenské popoly. Diplomová práca, Katedra geochémie, PRIF UK, Bratislava, 1-71.

Sleigh, J.D., Timbury, M.C. (1990): Medical Bacteriology. 3rd Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Slovenská energetika (2011): Z odpadu cenný produkt. Slovenské elektrárne, 6, 36, 1-3.

Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G. (2002): A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. Applied Geochemistry, 17, 517-568.

Smith, R.D. (1980): The trace element chemistry of coal during combustion and the emissions from coal-fired plants. Progress in Energy and Combustion Science, 6, 1, 53-119.

Sneath, P.H.A., Stevens, M., Sackin, M.J. (1981): Numerical taxonomy of *Pseudomonas* based on published records of substrate utilization. Antonie van Leeuwenhoek, 47, 5, 423-448.

Societas Pedologica Slovaca, (2014): Morfogenetický klasifikačný systém pôd Slovenska. Výskumný ústav pôdoznalectva a ochramy pôd, NPPC Nitra, 1-96.

Soedarmanto, I., Zhicai, W., Setyamahanani, A., Lämmler, C. (1998): Pheno- and genotyping of *Rhodococcus equi* isolated from faeces of healthy horses and cattle. Research in Veterinary Science, 64, 3, 181-185.

Solisio, C., Lodi, A., Veglió, F. (2002): Bioleaching of zinc and aluminium from industrial waste sludges by means of *Thiobacillus ferrooxidans*. Waste Management, 22, 6, 667-675.

Song, X., Xu, Y., Li, G., Zhang, Y., Huang, T., Hu, Z. (2011): Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. Marine Pollution Bulletin, 62, 10, 2122-2128.

Sørensen, S.J., Schyberg, T., Rønn, R. (1999): Predation by protozoa on *Escherichia coli* K12 in soil and transfer of resistance plasmid RP4 to indigenous bacteria in soil. Applied Soil Ecology, 11, 79-90.

Sorkhoh, N.A., Al-Hasan, R.H., Khanafer, M., Radwan, S.S. (1995): Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil. Journal of Appllied Bacteriology, 78, 2, 194-199.

Sosak-Swiderska, B. (2010): The soil fungi communities and risk assessment of heavy metal contaminated soils management. Geophysical Research Abstracts, 12, 14357.

Spears, D. (2000): Role of clay minerals in UK coal combustion. Applied Clay Science, 16, 1-2, 87-95.

Spears, D.A., Martinez-Tarrazona, M.R. (2004): Trace elements in combustion residues from a UK power station. Fuel, 83, 17-18, 2265-2270.

Spiers, A.J., Buckling, A., Rainey, P.B. (2000): The causes of *Pseudomonas* diversity. Microbiology, 146, 10, 2345-2350.

Sposito, G. (1984): The Surface Chemistry of Soils. Oxford University Press, New York, 1-234.

Srivastava, P.K., Vaish, A., Dwivedi, S., Chakrabarty, D., Singh, N., Tripathi, R.D. (2011): Biological removal of arsenic pollution by soil fungi. Science of the Total Environment, 409, 12, 2430-2442.

Srivastava, S., Thakur, I.S. (2006): Evaluation of bioremediation and detoxification potentiality of *Aspergillus niger* for removal of hexavalent chromium in soil microcosm. Soil Biology and Biochemistry, 38, 1904-1911.

Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., Doudoroff, M. (1966): The aerobic *Pseudomonads*: a taxonomy study. Journal of General Microbiology, 43, 2, 159-271.

Stecker, C., Johann, A., Herzberg, C. Averhoff, B., Gottschalk, G. (2003): Complete nucleotide sequence and genetic organization of the 210-kilobase linear plasmid of *Rhodococcus erythropolis* BD2. Journal of Bacteriology, 185, 17, 5269-5274

Stephenson Environmental Services (2012): Review of effective microorganisms (EM) and bioaugmentation factors for wastewater and biosolids treatment. The Regional Municipality of Halton, 1-22.

Stephenson, D., Stephenson, T. (1992): Bioaugmentation for enhancing biological wastewater treatment. Biotechnology Advances, 10, 4, 549-559.

Sterling, R.O., Helble, J.J. (2003): Reaction of arsenic vapor species with fly ash compounds: kinetics and speciation of the reaction with calcium silicates. Chemosphere, 51, 10, 1111-1119.

Stes, E., Francis, I., Pertry, I., Dolzblasz, A., Depuydt, S., Vereecke, D. (2013): The leafy gall syndrome induced by *Rhodococcus fascians.* FEMS Microbiology Letters, 342, 2, 187-194.

Stes, E., Holsters, M., Vereecke, D. (2010): Phytopathogenic strategies of *Rhodococcus fascians.* In: Alvarez, H.M. (ed.) Biology of *Rhodococcus*. Springer, 315-329.

Stork, A., Jury, W.A., Frankenberger, W.T. (1999): Accelerated volatilization rates of selenium from different soils. Biological Trace Element Research, 69, 3, 217-234.

Strandberg, G.W., Shumate, S.E., Parrott, J.R. (1981): Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas*

aeruginosa. Applied and Environmental Microbiology, 41, 1, 237-245.

Strasser, H., Burgstaller, W., Schinner, F. (1994): High-yield production of oxalic acid for metal leaching processes by *Aspergillus niger*. FEMS Microbiology Letters, 119, 3, 365-370.

Stýblo, M., Drobná, Z., Jasper, I., Lin, S., Thomas, D.J. (2002): The Role of Biomethylation in Toxicity and Carcinogenicity of Arsenic: A Research Update. Environmental Health Perspectives, 110, 5, 767-771.

Suárez-Ruiz, I., Flores, D., Marques, M.M., Martinez-Tarazona, M.R., Pis, J., Rubiera, F. (2006): Geochemistry, mineralogy and technological properties of coals from Rio Maior (Portugal) and Peñarroya (Spain) basins. International Journal of Coal Geology, 67, 3, 171-190.

Sulovský, P. (2002): Mineralogy and chemistry of conventional and fluidised bed coal ashes. Bulletin of the Czech Geological Survey, 77, 1, 1-11.

Sykes, R., Lindqvist, J.K. (1993): Diagenetic quartz and amorphous silica in New Zealand coals. Organic Geochemistry, 20, 6, 855-866.

Šimon, L. (Ed.) (1997): Vysvetlivky ku geologickej mape Vtáčnika a Hornonitrianskej kotliny (1:50 000), GSSR, Vydavateľstvo Dionýza Štúra, Bratislava, 1-281.

Šimonovičová, A., Peťková, K., Jurkovič, Ľ., Ferianc, P., Vojtková, H., Remenár, P., Kraková, L., Pangallo, D., Hiller, E., Čerňanský, S. (2016): Autochthonous microbiota in arsenic-bearing technosols from Zemianske Kostoľany (Slovakia) and its potential for bioleaching and biovolatilization of arsenic. Water, Air, and Soil Pollution, 227, 9, art. no. 336.

Šimonovičová, A., Piecková, E., Ferianc, P., Hanajík, P., Horváth, R. (2013): Environmentálna mikrobiológia. 1. vyd. Univerzita Komenského v Bratislave, 1-276.

Špaldon, F., Turčániová, Ľ. (1998): Tuzemské uhoľné zásoby a možnosti ich využitia pre potreby Slovenska. Acta Montanistica Slovaca, 3, 3, 199-203.

Švanová, P. (2014): Geographic distribution of *Rhodococcus* sp. and its characteristics in the remediation processes of contaminated ecosystems. In: 14th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2014. STEF92 Technology Ltd., Sofia, Book 6, Vol. 1, 365-372.

Švanová, P., Hlavňová, R., Vojtková, H. (2015): Snižování toxicity reálných vzorků průmyslových odpadů přímou aplikací bakteriálních kmenů *Rhodococcus* sp. a *Cupriavidu smetallidurans*. Environmentální změny v krajině jako důsledek těžby nerostných surovin: sborník vědeckých příspěvků z mezinárodní konference. VŠB – Technická univerzita Ostrava, 65-69.

Švanová, P. (2016): Genotypové a fenotypové vlastnosti bakteriálního kmene *Rhodococcus degradans* a možnosti jeho biotechnologických aplikací v metodách biotěžby kovů. VŠB – Technická univerzita Ostrava, 1-101.

Švec, P., Černohlávková, J., Busse, H.J., Vojtková, H., Pantůček, R., Cnockaert, M., Sedláček, I. (2015): Classification of strain CCM 4446^T as *Rhodococcus degradans* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65, 12, 4381-4387.

Tabak H.H., Lens, P., Van Hullebush, E.D., Dejonghe, W. (2005): Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides – 1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 5, 115-156.

Takeuchi, F., Iwahori, K., Kamimura, K., Negishi, A., Maeda, T., Suqio, T. (2001): Volatilization of mercury under acidic conditions from mercury-polluted soil by a mercury-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* SUG 2-2. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 65, 9, 1981-1986.

Tamaki, S., Frankenberger Jr, W.T. (1992): Environmental biochemistry of arsenic. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 124, 79-110.

Táncsics, A., Benedek, T., Farkas, M., Máthé, I., Márialigeti, K., Szoboszlay, S., Kukolya, J., Kriszt, B. (2014): Sequence analysis of 16S rRNA, *gyr*B and *cat*A genes and DNA-DNA hybridization reveal that *Rhodococcus jialingiae* is a later synonym of *Rhodococcus qingshengii.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64, 1, 298-301.

Tang, Q., Liu, G., Yan, Z., Sun, R. (2012): Distribution and fate of environmentally sensitive elements (arsenic, mercury, stibium and selenium) in coal-fired power plants at Huainan, Anhui, China. Fuel, 95, 334-339.

Tao, J., Lin, G.Q., Liese, A. (2009): Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry: Discovery, Development, and Manufacturing. John Wiley & Sons, Singapore, 1-250.

Thavamani, P., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R. (2012): Microbial activity and diversity in long-term mixed contaminated

soils with respect to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals. Journal of Environmental Management, 99, 10-17.

Thompson-Eagle, E.T., Frankenberger, W.T., Karlson, U. (1989): Volatilization of selenum by *Alternaria alternata*. Applied and Environmental Microbiology, 55, 6, 1406-1413.

Timmis, K.N. (2002): *Pseudomonas putida*: A cosmopolitan opportunist par excellence. Evnironmental Microbiology, 4, 12, 779-781.

Tobin, J., Roux, J. (1998): Mucor biosorbent for chromium removal from tannery effluent. Water Research, 32, 5, 1407-1416.

Tobin, J.M., Cooper, D.G., Neufeld, R.J. (1990): Investigation of the mechanism of metal uptake by denatured *Rhizopus arrhizus* biomass. Enzyme and Microbial Technology, 12, 8, 591-595.

Tobin, J.M., White, C., Gadd, G.M. (1994): Metal accumulation by fungi: Applications in environmental biotechnology. Journal of Industrial Microbiology. 13, 2, 126-130.

Tombolini, R., Van Der Gaag, D.J., Gerhardson,B., Jansson, J.K. (1999): Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. Applied and Environmental Microbiology, 65, 8, 3674-3680.

Torsvik, V., Øvreås, L. (2002): Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Current Opinion in Microbiology, 5, 240-245.

Townsley, C.C., Ross, I.S., Atkins, A.S. (1986): Biorecovery of metallic residues from various industrial effluents using filamentous fungi. In: Lawrence, R.W., Branion, R.M.R., Ebner, H.G. (eds.): Fundamental and Applied Biohydrometallurgy, Elsevier, 279-289.

Travkin, V., Baskunov, B.P., Golovlev, E.L., Boersmna, M.G., Boeren, S., Vervoort, J., Van Berkel, W.J.H., Rietjens, M.C.M., Golovleva, L.A. (2002): Reductive deamination as a new step in the anaerobic microbial degradation of halogenated anilines. FEMS Microbiology Letters, 209, 2, 307-312

Tsezos, M. (1983): The role of chitin in uranium adsorption by *R. arrhizus*. Biotechnology and Bioengineering, 25, 8, 2025-2040.

Tsezos, M., Volesky, B. (1981): Biosorption of uranium and thorium. Biotechnology and Bioengineering, 23, 3, 583-604.

Tsuruta, T. (2004): Biosorption and recycling of gold using various microorganisms. The Journal of General and Applied Microbiology, 50, 4, 221-228.

Turpeinen, R., Kairesalo, T., Häggblom, M.M. (2004): Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. FEMS Microbiology Ecology, 47, 39-50.

Turpeinen, R., Pantsar-Kallio, M., Kairesalo (2002): Role of microbes in controlling the speciation of arsenic and production of arsines in contaminated soils. Science of The Total Environment, 285, 1-3, 133-145.

Tyleček, B., Klúz M., Auxt A. (1991): Zemianske Kostoľany - zistenie kvalitatívnej a kvantitatívnej miery znečistenia podzemných a povrchových vôd, predbežný HGP a hydrochemický prieskum organizácia: Žilina, nestr., 7 príl., 1 diel.

Urík, M., Čerňanský, S., Ševc, J., Šimonovičová, A., Littera, P. (2007): Biovolatilization of arsenic by different fungal strains. Water, Air, and Soil Pollution, 186, 337-342.

Uroz, S., DAangelo-Picard, C., Carlier, A., Elasri, M., Sicot, C., Petit, A., Oger, P., Faure, D., Dessaux, Y. (2003): Novel bacteria degrading N-acyl homoserinelactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. Microbiology, 149, 8, 1981-1989.

Uslu, G., Tanyol, M. (2006): Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto *Pseudomonas putida:* Effect of temperature. Journal of Hazardous Materials, 135, 1-3, 87-93.

Utigikar, V., Chen, B.Y., Tabak, H.H., Bishop, D.F., Govind, R. (2000): Treatment of acid mine drainage. I. equilibrium biosorption of zinc and copper on non-viable activated sludge. International Biodeterioration & Biodegradation, 46, 1, 19-28.

Validov, S., Kamilova, F., Qi, S., Stephan, D., Wang, J.J., Makarova, N., Lugtenberg, B.. (2007): Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-lycopersici in stonewool substrate. Journal of Applied Microbiology, 102, 2, 461-71.

Valverde, A., Gonzáles-Tirante, M., Medina-Sierra, M., Santa-Regina, I., García-Sánchez, A., Igual, J.M. (2011): Diversity and community structure of culturable arsenic-resistant bacteria across a soil arsenic gradient at an abandoned tungsten–tin mining area. Chemosphere, 85, 129-134.

Van Der Geize, R., Dijkhuizen, L. (2004): Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. Current Opinion in Microbiology, 7, 3, 255-261.

Van der Hoek, E.E., Bonouvrie, P.A., Comans, R.N.J. (1994): Sorption of As and Se on mineral components of fly ash: Relevance for leaching processes. Applied Geochemistry, 9, 4, 403-412.

van Veen, J.A., van Overbeek, L.S., van Elsas, J.D. (1997): Fate and activity of microorganisms introduced into soil. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61, 2, 121-135.

Vancanneyt, M., Witt, S., Abraham, W.R., Kersters, K., Fredrickson, H.L. (1996): Fatty acid content in whole-cell hydrolysates and phospholipid fractions of pseudomonads: a taxonomic evaluation. Systematic and Applied Microbiology, 19, 4, 528-540.

Vandevivere, P., Welch, S.A., Ullman, W.J., Kirchman, D.L. (1994): Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. Microbial Ecology, 27, 241-251.

Vasan, S.S., Modak, J.M., Natarajan, K.A. (2001): Some recent advances in the bioprocessing of bauxite. International Journal of Mineral Processing, 62, 1-4, 173-186.

Vass, D., Began, A., Gross, P., Kahan, Š., Köhler, E., Lexa, J., Nemčok, J. (1988): Regionálne geologické členenie Západných Karpát a severných výbežkov Panónskej panvy na území ČSSR, M 1:500000, Geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava.

Vassilev, S.V., Vassileva, C.G. (1996): Mineralogy of combustion wastes from coal-fired power stations. Fuel Processing Technology, 47, 3, 261-280.

Vassilev, S.V., Kitano, K., Takeda, S.,Tsurue, T. (1995): Influence of mineral and chemical composition of coal ashes on their fusibility. Fuel Processing Technology, 45, 1, 27-51.

Vassilev, S.V., Menendez, R., Alvarez, D., Diaz-Somoano, M., Martinez-Tarazona, M.R. (2003): Phase-mineral and chemical composition of coal fly ashes as a basis for their multi-component utilization. 1. Characterization of feed coals and fly ashes. Fuel, 82, 14, 1793-1811.

Vassilev, S.V., Vassileva, Ch.G. (2007): A new approach for the classification of coal fly ashes based on their origin, composition, properties and behaviour. Fuel, 86, 10-11, 1490-1512.

Vassilev, S.V., Vassileva, Ch.G., Karayigit, A.I., Bulut, Y., Alastuey, A., Querol, X. (2005a): Phase-mineral and chemical composition of composite samples from feed coals, bottom ashes and fly ashes at the Soma power station, Turkey. International Journal of Coal Geology, 61, 1-2, 35-63.

Vassilev, S.V., Vassileva, Ch.G., Karayigit, A.I., Bulut, Y., Alastuey, A., Querol, X. (2005b): Phase-mineral and chemical composition of fractions separated from composite fly ashes at the Soma power station, Turkey. International Journal of Coal Geology, 61, 1-2, 65-85.

Vassileva, Ch.G., Vassilev, S.V. (2006): Behaviour of inorganic matter during heating of Bulgarian coals: 2. Subbituminous and bituminous coals. Fuel Processing Technology, 87, 12, 1095-1116.

Vats, S., Kumar, R., Miglani, K. (2011): Isolation, characterization and identification of high salinity tolerant, heavy metal contaminantand antibiotics resistant amylolytic-thermophilic *Pseudomonas* sp. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 10, 2, 125-129.

Veglió, F., Beolchini, F. (1997): Removal of metals by biosorption: A review. Hydrometallurgy, 44, 3, 301-316.

Veglió, F., Beolchini, F., Gasbarro, A. (1997): Biosorption of toxic metals: an equilibrium study using free cells of *Arthrobacter sp*. Process Biochemistry, 32, 2, 99-105.

Verbich, F. (1998): Hodnotenie geochemických a mineralogických vlastností uhlia z ložiska Nováky. Acta Montanistica Slovaca, 3, 3, 378-383.

Veselská, V. (2013): Geochemická distribúcia a mobilita arzénu v elektrárenských popoloch pochovaných pod poľnohospodárskymi pôdami. Dizertačná práca. Univerzita Komenského v Bratislave, 1-149.

Veselská, V., Majzlan, J., Hiller, E., Peťková, K., Jurkovič, Ľ., Ďurža, O., Voleková-Lalinská, B. (2013): Geochemical characterization of arsenic-rich coal-combustion ashes buried under agricultural soils and the release of arsenic. Applied Geochemistry, 33, 153-164.

Visoottiviseth, P., Panviroj, N. (2001): Selection of fungi capable of removing toxic arsenic compounds from liquid medium. Science Asia, 27, 83-92.

Vodičková, H., Pacáková, V., Šestáková, I., Mader, P. (2001): Analytické metody pro stanovení metalothioneinů. Chemické Listy, 95, 8, 477-483.

Vogt, C., Alfreidera, A., Lorbeerb, H., Hoffmanna, D., Wuenschea, L., Babel, W. (2004): Bioremediation of chlorobenzene-contaminated groundwater in an in situ reactor mediated by hydrogen peroxide. Journal of Contaminant Hydrology, 68, 1-2, 121-141.

Vojtková, H. (2014a): Physiological aspects of metal resistance in *Pseudomonas* bacteria isolated from anthropogenic sediments of Ostrava Lagoons, Czech Republic. In: Méndez-Vilas, A. (ed.): Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends. Wageningen Academic Publishers, 147-152.

Vojtková, H. (2014b): *Pseudomonas monteilii* LA-11 strain's capacity of resistance: A new isolate from contaminated lagoons, Czech Republic. In: 14th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2014. STEF92 Technology Ltd., Sofia, Book 6, Vol. 1, 473-478.

Vojtková, H., Janáková, I. (2011): Möglichkeiten einer Bakteriellen Dagradierung Ausgewählter Organischer Schadstoffe. In: Nosek, J., Műller, M. (eds.): Rekultivierung – Probleme und Lösungen: Deponieworkshop Liberec-Zittau. Tribun, Brno, 163-169.

Vojtková, H., Janulková, R., Švanová, P. (2012): Bacterium *Cupriavidus metallidurans* strain´s tolerance of metal ions. Inźynieria Mineralna, 13, 2, 49-54.

Vojtková, H., Janulková, R., Švanová, P. (2012a): Physiological aspects of metal tolerance in *Pseudomonas* bacteria isolated from polluted sites in Ostrava, Czech Republic. In: 12th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2012, Albena, vol. 4, 177-183.

Vojtková, H., Mašľaňová, I., Sedláček, I., Švanová, P., Janulková, R. (2012b): Removal of heavy metals from wastewater by a *Rhodococcus* sp. bacterial strain. In: 12th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2012, vol. 5, 685-691.

Vojtková, H., Kučerová, R., Švanová, P., Kučerová, L., Matúšková, V. (2013): Využití kmene *Rhodococcus* sp. k biodegradaci PAHs v zemině ze skládky nebezpečných odpadů. In: Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi VI. Vodní zdroje Ekomonitor, Chrudim, 77-83.

Vojtková, H., Šimonovičová, A., Čerňanský, S., Peťková, K., Molnárová, M. (2013): Biolúhovanie arzénu baktériami *Cupriavidus metallidurans* a *C. oxalaticus* z technozeme iniciálnej. In: Geochémia 2013. Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava, 179-180.

Vojtková, H., Švanová, P. (2014): Snižování toxicity průmyslových odpadů aplikací bakteriálního kmene *Rhodococcus* sp. In: Sanační technologie XVII. Vodní zdroje Ekomonitor, Chrudim, 189-192.

Volesky, B. (2003): Sorption and Biosorption. St. Lambert: BV Sorbex, 1-316.

Volesky, B. (2007): Biosorption and me. Water Research, 41, 18, 4017-4029.

Volesky, B., Holan, Z.R. (1995): Biosorption of heavy metals. Biotechnology Progress, 11, 3, 235-250.

Volesky, B., May, H., Holan, Z.R. (1993): Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae.* Biotechnology and Bioengineering, 41, 8, 826-829.

Votava, M. (2006): Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, Brno, 1-495.

Vrana, K., Rapant, S., Halmo, J., Határ, J., Klinčeková, M., Verbich, F. (1991): Geochemicko-ekologický výskum nováckeho uhoľného ložiska. Záverečná správa výskumu, Manuskript, GS SR, Bratislava.

Wadge, A., Hutton, M., Peterson, P.J. (1986): The concentrations and particle size relationships of selected trace elements in fly ashes from U.K. coal-fired power plants and a refuse incinerator. Science of the Total Environment, 54, 13-27.

Wagner, M., Loy, A. (2002): Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. Current Opinion in Biotechnology, 13, 218-227.

Wagner, N.J., Tlotleng, M.T. (2012): Distribution of selected trace elements in density fractionated Waterberg coals from South Africa. International Journal of Coal Geology, 94, 225-237.

Wang, D., Cullimore, R., Hu, Y., Chowdhury, R. (2011): Biodeterioration of asbestos cement (AC) pipe in drinking water distribution systems. International Biodeterioration and Biodegradation, 65, 6, 810-817.

Wang, J.L., Chen, C. (2009): Biosorbents for heavy metals removal and their future a review. Biotechnology Advances, 27, 2, 195-226.

Wang, M., Zheng, B., Wang, B., Li, S., Wu, D., Hu, J. (2006): Arsenic concentrations in Chinese coals. Science of the Total Environment, 357, 1-3, 96-102.

Wang, Y.-P., Shi, J.-Y., Lin, Q., Chen, X.-C., Chen, Y.-X. (2007): Heavy metal availability and impact on activity of soil microorganisms along a Cu/Zn contamination gradient. Journal of Environmental Sciences, 19, 848-853.

Wang, Z., Xu, J., Li, Y., Wang, K., Wang, Y., Hong, Q., Li, W.J., Li, S.P. (2010): *Rhodococcus jialingiae* sp. nov., an actino bacterium isolated from sludge of a carbendazim wastewater treatment facility. International Journal of

Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 2, 378-381.

Ward, C.R. (2002): Analysis and significance of mineral matter in coal seams. International Journal of Coal Geology, 50, 1-4, 135-168.

Ward, C.R., French, D. (2006): Determination of glass content and estimation of glass composition in fly ash using quantitative X-ray diffractometry. Fuel, 85, 16, 2268-2277.

Warhurst, A.M., Fewson, C.A. (1994): Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. Critical Reviews in Biotechnology, 14, 1, 29-73.

Wasay, S.A., Barrington, S., Tokunaga, S. (2001): Organic acids for the in situ remediation of soils polluted by heavy metals: soil flushing in columns. Water, Air and Soil Pollution, 127, 1-4, 301-314.

Watanabe, H., Kobayashi, S., Watanabe, K., Oishi, K., Sanchai, T., Kositsakulchai, W., Nagatake, T. (2000): Pulmonary infection caused by *Rhodococcus equi* in HIV-infected patients: report of four patients from northern Thailand. Journal of Infection and Chemotherapy, 6, 4, 229-232.

Watanabe, K. (2001): Microorganisms relevant to bioremediation. Current Opinion in Biotechnology, 12, 237-241.

Watson, R.W.G., Redmond, H.P., Bouchier-Hayes, D. (1994): Role of endotoxin in mononuclear phagocyte-mediated inflammatory responses. Journal of Leukocyte Biology, 56, 1, 95-103.

Webster, G., Embley, T.M., Prosser, J. (2002): Grassland management regimes reduce small-scale heterogeneity and species diversity of Beta-proteobacterial ammonia oxidizer population. Applied and Environmental Microbiology, 68, 20-30.

Weiner, S., Dove, P.M. (2003): An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. In: Dove, P.M., De Yoreo, J.J., Weiner, S. (Eds.): Biomineralization. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 54 (1), 1-30.

Weiner, S. (2008): Biomineralization: a structural perspective. Journal of Structural Biology, 163, 3, 229-234.

Weiner, S., Addadi, L. (1991): Acidic macromolecules of mineralized tissues: the controllers of crystal formation. Trends in Biochemical Sciences, 16, 7, 252-256.

Weiner, S., Addadi, L. (1997): Design strategies in mineralized biological materials. Journal of Materials Chemistry, 7, 689-702.

Weiner, S., Saqi, I., Addadi, L. (2005): Structural biology. Choosing the crystalization path less traveled. Science, 309, 5737, 1027-1028.

Weinstock, D.M., Brown, A.E. (2002): *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. Clinical Infectious Diseases, 34, 10, 1379-1385.

Welch, S.A., Barker, W.W., Banfield, J.F. (1999): Microbial extracellular polysacharides and plagioclase dissolution. Geochimica et Cosmochimica Acta, 63, 9, 1405-1419.

Wenderoth, D.F., Reber, H.H. (1999): Correlation between structural diversity and catabolic versatility of metal-affected prototrophic bacteria in soil. Soil Biology and Biochemistry, 31, 345-352.

Wertheim, W.A., Markowitz, D.M. (1992): Osteomyelitis and intervertebral discitis caused by *Pseudomonas pickettii*. Journal of Clinical Microbiology, 30, 9, 2506-2508.

White, Ch., Sayer, J.A., Gadd, G.M. (1997): Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. FEMS Microbiology Reviews, 20, 3-4, 503-516.

White, Ch., Wilkinson, S.C., Gadd, G.M. (1995): The Role of microorganisms in biosorption of toxic metals and radionuclides. International Biodeterioration and Biodegradation, 35, 1-3, 17-40.

Whyte, L.G., Slagman, S.J., Pietrantonio, F., Bourboniere, L., Koval, S.F., Lawrence, J.R., Innis, W.E., Greer, C.W. (1999): Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. strain Q15. Applied Environmental Microbiology, 65, 7, 2961-2968.

Whyte, L.G., Smits, T.H.M., Labbe, D., Witholt, B., Greer, C.W., Van Beilen, J.B. (2002): Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. Applied and Environmental Microbiology, 68, 12, 5933-5942.

Wilhelm, M., Pesch, B., Wittsiepe, J., Jakubis, P., Miskovic, P., Keegan, T., Nieuwenhuijsen, M.J., Ranft, U. (2005): Comparison of arsenic levels in fingernails with urinary As species as biomarkers of arsenic exposure in residents living close to a coal-burning power plant in Prievidza District, Slovakia. Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology, 15, 1, 89-98.

Winter, R.M., Mallepalli, R.R., Hellem, K.P., Szydlo, S.W. (1994): Determination of As, Cd, Cr and Pb species formed in a combustion environment. Combustion Science and Technology, 101, 1-6, 45-58.

Witter, E., Gong, P., Bååth, E., Marstorp, H. (2000): A study of the structure and metal tolerance of the soil microbial community six years after

cessation of sewage sludge applications. Environmental Toxicology and Chemistry, 19, 8, 1983-1991.

Woese, C.R., Stackebrandt, E., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Madigan, M.T., Fowler, V.J., Hahn, C.M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K.H., Fox, G.E. (1984): The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. Systematic and Applied Microbiology, 5, 315-326.

Worms, I., Simon, D.F., Hassler, C.S., Wilkinson, K.J. (2006): Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. Biochimie, 88, 11, 1721-1731.

Wouterlood, H.J., Bowling, K.McG. (1979): Removal and recovery of arsenious oxide from flue gases. Environmental Science and Technology, 13, 1, 93-97.

Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., van der Lelie, D. (2011): Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. FEMS Microbiology Reviews, 35, 2, 299-323.

Wuczkowski, M., Sterflinger, K., Kraus, G.F., Klug, B., Prillinger, H. (2003): Diversity of microfungi and yeasts and their diversity in soils of the alluvial zone national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria („Nationalpark Donauauen"). Die Bodenkultur, 54, 109-117.

Wypartowicz, J. (1995): Thermodynamic properties of copper-arsenic liquid solutions. Journal of Alloys and Compounds, 227, 1, 86-92.

Xu, M., Yan, R., Zheng, Ch., Qiao, Y., Han, J., Sheng, Ch. (2003): Status of trace element emission in a coal combustion process: a review. Fuel Processing Technology, 85, 215-237.

Xu, T.-J., Ting, Y.-P. (2004): Optimisation on bioleaching of incinerator fly ash by *Aspergillus niger* - Use of central composite design. Enzyme and Microbial Technology, 35, 5, 444-454.

Yin, N.-H., Sivry, Y., Avril, C., Borensztajn, S., Labanowski, J., Malavergne, V., Lens, P.N.L., Rossano, S., Van Hullebush, E.D. (2014): Bioweathering of lead blast furnace metallurgical slags by *Pseudomonas aeruginosa.* International Biodeterioration and Biodegradation, 86 (Part C), 372-381.

Yudovich, Y.E., Ketris, M.P. (2005): Arsenic in coal: a review. International Journal of Coal Geology, 61, 141-196.

Zafar, S., Aqil, F., Ahmad, I. (2007): Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. Bioresource Technology, 98, 13, 2557-2561.

Zákon 220/2004 Z. z. o ochrane a využívaní poľnohospodárskej pôdy a o zmene zákona č. 245/2003 Z. z. o integrovanej prevencii a kontrole znečisťovania životného prostredia a o zmene a doplnení niektorých zákonov.

Zawadska, A.M., Crawford, R.L., Paszczynski, A.J. (2007): Pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas stutzeri* KC reduces chromium(VI) and precipitates mercury, cadmium, lead and arsenic. BioMetals, 20, 2, 145-158.

Zelená, J., Potěšil, D., Vacek, J., Adam, V., Hradecký, J., Průša, R., Kizek, R., Vojtěšek, B. (2004): Metalothionein jako prognostický marker nádorového onemocnění. Klinická onkologie, 17, 6, 190-195.

Zhang, J., Ren, D., Zheng, C., Zeng, R., Chou, C.L., Liu, J. (2002): Trace element abundances in major minerals of Late Permian coals from southwestern Guizhou province, China. International Journal of Coal Geology, 53, 1, 55-64.

Zhang, Q., Ren, Y., He, J., Cheng, S., Yuan, J., Ge, F., Xie, G. (2015): Multiplicity of 3-ketosteroid Δ^1-dehydrogenase enzymes in *Gordonia neofelifaecis* NRRL B-59395 with preferences for different steroids. Annals of Microbiology, 65, 4, 1961-1971.

Zhang, W., Chen, L., Liu, D. (2012): Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. Applied Microbiology and Biotechnology, 93, 3, 1305-1314.

Zhao, L.F., Xu, Y.J., Ma, Z.Q., Deng, Z.S., Shan,C.J., Wei, G.H. (2013): Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic *Pseudomonas chlororaphis* strain Zong1 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. Brazilian Journal of Microbiology, 44, 2, 623-631.

Zhao, Y., Xu, W., Li, Q., Xie, Y., Schaefer III, H.F. (2004): The arsenic clusters As_n (n = 1 - 5) and their anions: structures, thermochemistry, and eleactron affinities. Journal of Computational Chemistry, 25, 7, 907-920.

Zhao, Y., Zhang, J., Huang, W., Wang, Z., Li, Y., Song, D., Zhao, F., Zheng, Ch. (2008): Arsenic emission during combustion of high arsenic coals from Southwestern Guizhou, China. Energy Conversion and Management, 49, 4, 615-624.

Zhong, T., Lynch, D.C. (2001): Henrian activity coefficient of As in Cu-Fe mattes and white

metal. Metallurgical and Materials Transactions B, 32, 3, 437-447.

Zielinski, R.A., Foster, A.L., Meeker, G.P., Brownfield, I.K. (2007): Mode of occurrence of arsenic in feed coal and its derivative fly ash, Black Warrior Basin, Alabama. Fuel, 86, 4, 560-572.

Zimmerley, S.R., Wilson, D.G., Andprater, J.D. (1958): Cyclic leaching process employing iron oxidizing bacteria. Patent No. US2829964 A.

Ženišová, Z., Fendeková, M., Némethy, P., Krčmář, D., Fľaková, R., Hudaček, M., Roháčiková, A., Miklasová-Macháčková, J., Vojtková, S. (2005): 02 - Hydrogeologické faktory. Úloha výskumu a vývoja „Vplyv geologických faktorov na kvalitu života“ podprogramu „Vplyv stavebných materiálov, konštrukcií a geologických faktorov na kvalitu života“ štátneho programu výskumu a vývoja „Kvalita života - zdravie, výživa a vzdelávanie“. Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Bratislava, 1-83.

INTERNETOVÉ ZDROJE

www.http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

www. biology-forums.com

www. coal.ca

www.javys.sk

www.ket.org

www.mapserver.geology.sk.

www.seas.sk

BIOREMEDIAČNÝ POTENCIÁL BAKTÉRIÍ V UVOĽŇOVANÍ ARZÉNU Z POCHOVANÝCH ELEKTRÁRENSKÝCH POPOLOV

© Mgr. Katarína PEŤKOVÁ, PhD.

© RNDr. Ľubomír JURKOVIČ, PhD.

© Doc. Mgr. Hana VOJTKOVÁ, Ph.D.

Recenzenti:

prof. RNDr. Peter ANDRÁŠ, CSc.
Ing. Miroslav MINAŘÍK

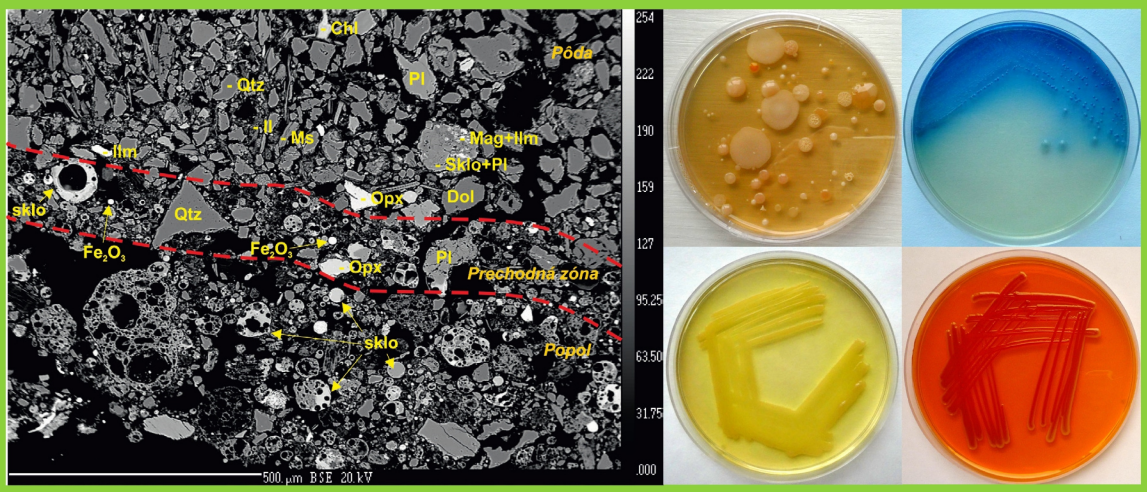
Vydala:

VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ -TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA
Hornicko-geologická fakulta, Institut environmentálního inženýrství

Rukopis neprešiel jazykovou korektúrou.

Vydanie: prvé (2016)

ISBN 978-80-248-3999-8



VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ – TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA
HORNICKO-GEOLOGICKÁ FAKULTA
INSTITUT ENVIRONMENTÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

ISBN 978-80-248-3999-8