

TECHNICKÁ UNIVERZITA VO ZVOLENE
FAKULTA EKOLÓGIE A ENVIRONMENTALISTIKY

Mikrobiologická analýza banských vôd na vybraných lokalitách
Slovinky a Rudňany

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Bc. Michal Frankovič

2016

TECHNICKÁ UNIVERZITA VO ZVOLENE
FAKULTA EKOLÓGIE A ENVIRONMENTALISTIKY

Katedra biológie a všeobecnej ekológie

Mikrobiologická analýza banských vôd na vybraných lokalitách Slovinky
a Rudňany

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Bc. Michal Frankovič

Vedúci diplomovej práce:

Ing. Zuzana Perháčová, PhD.

Konzultant diplomovej práce:

Ing. Štefan Mních

Zvolen 2016

Abstrakt v SJ

Práca je orientovaná na environmentálny vplyv banských vôd na prostredie. Banské vody ako významný environmentálny faktor môžu negatívne pôsobiť na ekosystém, kvôli prítomnosti ťažkých kovov, ktoré môžu obsahovať. Pokiaľ sa jedná o kyslé banské vody, môže dôjsť k zvýšeniu toxicity ťažkých kovov. Na skúmaných lokalitách, ktorými bolo odkalisko Slovinky-Kaligrud, odkalisko Rudňany, štôľňa Rochus, štôľňa Alžbeta a potok Bodnárec, bola preukázaná prítomnosť neutrálnych banských vôd. Odoberanie vzoriek prebiehalo v mesiacoch jún až august 2015. V porovnaní s prácami z minulosti sa pH na skúmaných lokalitách pozvoľna zvyšuje. Prostredníctvom mikroskopických, kultivačných a metód hmotnostnej spektrometrie (MALDI-TOF) sme hodnotili prítomnosť neutrofilných, aeróbných, železo oxidujúcich baktérií. Mikroskopickými metódami sa potvrdila prítomnosť baktérií rodu *Gallionella* sp. a *Leptothrix* sp. Analýza hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF dopadla zväčša nespôľahlivo. Ukázala sa častá prítomnosť baktérií rodu *Lactobacillus* sp. a *Bacillus* sp. Z pomedzi baktérií viazaných na minerálne vody sa našli *Pseudomonas brenneri*, *Pseudomonas veronii* a *Pseudomonas gessardi* a vody s obsahom ťažkých kovov *Microbacterium oxydans* a *Microbacterium liquefaciens*.

Kľúčové slová: odkalisko, štôľňa, železité baktérie, banské vody, Rudňany, Slovinky

Abstrakt v AJ

The aim of this diploma thesis is environmental impact of mine influenced waters. Mine influenced waters may negative affect ecosystem because of volume of heavy metals. In case of acid mine drainage waters there are big probability of mobility of heavy metals and their toxicity. In research areas which are Rudňany and Slovinky tailing ponds, mine Rochus, mine Alžbeta and Bodnárec stream, there are neutral mine drainage waters. Time period of research was between June and August 2015. Compared to research in the past, pH value is increasing. Through microscopic analysis, cultivation methods and mass spectrometry we were rating the presence of neutrophilic, aerobic, iron-oxidizing proteobacteria. By microscopic analysis we confirmed theory of presence of genus *Gallionella* sp. and *Leptothrix* sp. Analysis of mass spectrometry MALDI-TOF have been unreliable. There were frequent presence of bacteria of genera *Lactobacillus* sp. a *Bacillus* sp. From species what their ecological optimum is in mineral water was found *Pseudomonas brenneri* *Pseudomonas veronii* and *Pseudomonas gessardi*. From species what their ecological optimum is in water containing heavy metals was found species as *Microbacterium oxydans* a *Microbacterium liquefaciens*.

Key words: tailing pond, tunnel, iron bacteria, mine water, Rudňany, Slovinky

Čestné vyhlásenie

Vyhlasujem, že som celú diplomovú prácu vypracoval samostatne s použitím uvedenej odbornej literatúry, vlastných teoretických poznatkov a s pomocou konzultácií.

Zvolen, 4. máj 2016

.....
vlastnoručný podpis

Pod'akovanie

Chcem sa poďakovať Ing. Zuzane Perháčovej, PhD. za odbornú pomoc a usmerňovanie pri písaní tejto diplomovej práce, za poskytnutú študijnú literatúru a poskytnutú pomoc pri prácach v laboratóriu. Ďalej sa chcem poďakovať Ing. Simone Kvasnovej z Prírodovedeckej fakulty Univerzity Mateja Bela za poskytnutie pomoci a prostriedkov pri identifikácii mikroorganizmov systémom MALDI-TOF.

Obsah

Zoznam obrázkov	8
Zoznam tabuliek	10
Úvod	11
1 Rozbor problematiky.....	13
1.1 Banské vody.....	13
1.1.1 Kyslé banské vody	13
1.1.2 Neutrálne banské vody	15
1.2 Mikrobiológia banských vôd	16
1.2.1 Charakteristika železitých a mangánových baktérií.....	16
1.2.2 Ekologické faktory rastu železitých a mangánových baktérií.....	17
1.2.3 Mikrobiálna oxidácie železa.....	18
2 Charakteristika územia výskumu	22
2.1 Lokality v okolí obce Rudňany.....	22
2.1.1 Odkalisko Rudňany.....	23
2.1.2 Štôlna Rochus.....	24
2.1.3 Lokality v obci Slovinky	26
2.1.4 Odkalisko Slovinky - Kaligrud	27
2.1.5 Štôlna Alžbeta	28
2.1.6 Potok Bodnárec	29
3 Ciele práce	30
4 Materiál a metodika.....	31
4.1 Odber vzoriek.....	31
4.2 Merania fyzikálno-chemických ukazovateľov.....	33
4.3 Určovanie mikroorganizmov	33
4.3.1 Mikroskopická analýza	33
4.3.2 Kultiváčná analýza	34
4.3.3 Identifikácia mikroorganizmov systémom MALDI TOF Biotyper. (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight).....	35
4.3.4 Kvantitatívne hodnotenie pokryvnosti nárastov bakteriálnych kolónií v zornom poli mikroskopu.....	38
5 Výsledky.....	40
5.1 Výsledky Fyzikálno-chemických rozborov	40

5.1.1 Namerané hodnoty pH	40
5.1.2 Namerané hodnoty konduktivity v $\text{mS}\cdot\text{m}^{-1}$	42
5.1.3 Namerané hodnoty koncentrácie rozpustených látok v [mV]	42
5.2 Výsledky identifikácii mikroorganizmov systémom MALDI Biotyper. (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight).....	43
5.2.1 Výsledky MALDI TOF analýzy – lokalita odkalisko Slovinky	44
5.2.2 Výsledky MALDI TOF analýzy – lokalita Odkalisko Rudňany.....	46
5.2.3 Výsledky MALDI TOF analýzy – štôľňa Rochus	49
5.2.4 Výsledky MALDI TOF analýzy potok Bodnárec	50
5.3 Vyhodnotenie kvantitatívneho hodnotenia pokryvnosti nárastov bakteriálnych kolónií v zornom poli mikroskopu.	52
5.4 Výsledky analýzy mikroskopickým pozorovaním.....	52
6 Diskusia.....	55
7 Záver	60
Použitá literatúra	62

Zoznam obrázkov

Obrázok 1: V rámečku sa nachádza poloha všetkých odberových lokalít v obciach Rudňany a Slovinky na mape Slovenska (GOOGLE EARTH, 2016).....	23
Obrázok 2: Pohľad na vodnú plochu - zrkadlo odkaliska v Rudňanoch	24
Obrázok 3: Vchod do štôlne Rochus	26
Obrázok 4: Pohľad na lokalitu z hrádze odkaliska. V zadnej časti sa nachádza vodná plocha	28
Obrázok 5: Pohľad na odberové miesto. Jedná sa o drenážnú rúru vedúcu zo štôlne Alžbeta vlievajúcu sa do potoka Bodnárca	29
Obrázok 6: Odberové miesta na odkalisku v Rudňanoch (GOOGLE EARTH 2016).....	31
Obrázok 7: Odberové miesta na odkalisku v Slovinkách (GOOGLE EARTH 2016).....	32
Obrázok 8: Poloha štôlne Rochus (červená) v obci Rudňany (GOOGLE EARTH 2016)	32
Obrázok 9: Poloha odberových polôh v obci Slovinky (GOOGLE EARTH 2016).....	33
Obrázok 10: Odhadová stupnica na určenie pokryvnosti biosestónom v zornom poli mikroskopu (TÓTHOVÁ & MOŇOGOVÁ, 2001)	39
Obrázok 11: Odhadová stupnica na určenie pokryvnosti abiosestónom v zornom poli (TÓTHOVÁ & MOŇOGOVÁ, 2001).....	39
Obrázok 12: Porovnanie odberových miest na základe nameraných hodnôt pH v mesiacoch jún (zelená), júl (červená), august (modrá) 2016 z každej zo vzoriek v poradí voda, sediment.	40
Obrázok 13: Drenážne rúry odkaliska Slovinky a štôlne Rochus s okrovými povlakmi	41
Obrázok 14: Porovnanie odberových miest na základe hodnôt konduktivity v mesiacoch jún (zelená), júl (červená), august (modrá) 2016 z každej zo vzoriek v poradí voda, sediment.	42
Obrázok 15: Porovnanie odberových miest na základe hodnôt rozpustených látok vo vzorkách z odberových lokalít - jún (zelená), júl (červená), august (modrá) 2016 z každej zo vzoriek v poradí voda, sediment.	43
Obrázok 16: G+ tyčinky na agare podľa ŠVORCOVEJ 1985. Vzorka z odkaliska Slovinky-Kaligrud. Zväčšenie 1500x	46
Obrázok 17: G+ tyčinky na agare podľa ŠVORCOVEJ 1985. Vzorka sedimentu odkaliska Rudňany z dňa 27. 7. 2015. Zväčšenie 1500 x	48
Obrázok 18: <i>Leptothrix</i> sp. a <i>Gallionella</i> sp. vo vzorke z drenážnej rúry odkaliska Slovinky pri zväčšení 40x15.....	53
Obrázok 19: <i>Leptothrix</i> sp.. vo vzorke z drenážnej rúry odkaliska Slovinky pri zväčšení 40x15.6.....	54

Obrázok 20: Závislosť E_c od koncentrácie rozpustených látok. Usporiadanie grafov je podľa dátumu odberu vzoriek – Jún, Júl, August.....	58
--	----

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Teplotný rozsah vybraných železitých baktérií (CULLIMORE & MCCANN, 1978).....	18
Tabuľka 2: Tabuľka hodnotenia spoľahlivosti hodnotenia systémom MALDI TOF.....	44
Tabuľka 3: Analýza izolátov zo vzoriek systémom MALDI TOF z odkaliska Slovinke	45
Tabuľka 4: Analýza izolátov zo vzoriek systémom MALDI TOF z odkaliska Rudňany – sediment. Odber 27. 7. 2015.19.....	47
Tabuľka 5: Analýza izolátov zo vzoriek systémom MALDI TOF z odkaliska Rudňany zo vzorky odobranej 28. 8. 2015	49
Tabuľka 6: Analýza izolátov zo vzoriek systémom MALDI TOF zo štôlne Rochus	50
Tabuľka 7: Analýza izolátov zo vzoriek systémom MALDI TOF zo štôlne Rochus	51
Tabuľka 8: Kvantitatívne pokryvnosti biosestónu a abiosestónu na Bürkerovej komôrke	52
Tabuľka 9: Prítomnosť rodov Gallionella sp. a Leptothrix sp. na skúmaných lokalitách.....	52
Tabuľka 10: Porovnanie hodnôt pH vody s predošlých rokov (VLČKO 2012) , (TÓTH et al 2013) (KUČMOVÁ 2015)	57

Úvod

Po stáročiach baníckej činnosti na Slovensku človek po sebe zanechal mnoho antropogénnych stôp, ktoré hlboko zasiahli prírodu a krajinu. Banská činnosť sa vyznačuje nepriaznivými zásahmi do geomorfológie a aj geochemie prírodného prostredia. Špeciálnou problematikou sú banské odpady na ktorých problémy sa nekládol veľký dôraz, ani po stránke mechanického zabezpečenia a ani po stránke hrozby kontaminácie (KLIMKO et al., 2012)

Spišsko-gemerská oblasť má stáročnú tradíciu baníctva a dobývania rúd. Prvé zmienky o obci Rudňany pochádzajú z roku 1332 a o obci Slovinky 1368. Po dlhoročnej tradícii baníctva človek po sebe zanechal vyťaženú hlušinu vo forme hald na povrchu a odpad po priemyselnom spracovaní rudy zase vo forme odkalísk. Väčšina historických banských technických objektov je už dnes v krajine neviditeľná, sú porastene vegetáciou a postupnou sukcesiou prostredia do krajiny zapadli (KROKUSOVÁ & ČECH 2007).

Najväčšie dobývanie rúd v obciach Slovinky a Rudňany nasledovalo po roku 1945. Kým v Slovinkách došlo k viacerým úpadkom, v Rudňanoch sa v 70. – 80. rokoch vybudoval najväčší hlbinný banský závod v celej Československej Republike.

V tejto dobe sa vybudovalo najviac zariadení na spracovanie rudy a vyprodukovalo sa aj najviac banských odpadov .

V dobách kedy sa nekládol tak veľký dôraz na živ. prostredie, sa tieto objekty vnímali len ako negatívny zásah po esteticknej stránke. Zväčša rekultivácia prebehla len na úrovni zabezpečenia proti mechanickej deštrukcii okolia (KROKUSOVÁ & ČECH 2007).

Predmetom výskumu tejto práce je práve hodnotenie a štúdium drenážnych vôd banských environmentálnych záťaží. Odhalené horninové sulfidické minerály s veľkým obsahom rozpustených kovov často krát spôsobujú reťazovú reakciu vzniku kyslých banských vôd, ktoré veľmi nepriaznivo pôsobia na povrchové toky. Lokality ako sú opustené banské diela a zatápanie opustených banských priestorov sú ideálnymi podmienkami pre tvorbu kyslých banských vôd. V našom prípade sa však prítomnosť kyslých banských vôd nepotvrdila. V skúmaných lokalitách, ktorými sú odkalisko Slovinky – Kaligrud, odkalisko Rudňany, štôlna Rochus, štôlna Alžbeta a potok Bodnárec, ktorý tvorí aj drenáž starého odkaliska Bodnárec sú vody, ktoré tvoria priaznivé podmienky pre výskyt neutrofilnej, aeróbnej mikroflóry, konkrétne druhov

Gallionella sp. a *Leptothrix* sp., ktorých výskyt sa analýzami potvrdil (HALLBECK & PEDERSEN 1990).

1 Rozbor problematiky

1.1 Banské vody

Vysoko mineralizované vody, ktoré vytekajú z hál, starých banských diel a banských objektov nazývame banskými vodami. V zahraničnej literatúre sa často používa pojem „mining influenced waters“ (MIW) ako všeobecné označenie pre vody ovplyvnené banskou činnosťou (MCLEMORE 2008).

Podľa zákona č. 44/1988 Zb. o ochrane a využití nerastného bohatstva, tzv. banský zákon sú banskými vodami všetky podzemné, povrchové a zrážkové vody, ktoré vnikli do hlbinných alebo povrchových banských priestorov bez ohľadu na to, či sa tak stalo priesakom alebo gravitáciou z nadložia, podložia alebo jednoduchým vtekaním zrážkovej vody, a to až do ich spojenia s inými stálymi povrchovými alebo podzemnými vodami.

Pri kontaminácii povrchovej vody s vodami z lokalít s banskou činnosťou môže dôjsť k závažným environmentálnym problémom. Dôvodom je špecifické minerálne zloženie banských vôd, ktoré je podmienené prostredím, ktorým preteká. Zloženie najviac závisí od skladby geologického podložia. V prípade, ak vznikajú biologicko-chemickým rozkladom pyritu za účinku litotrofných baktérií, hovoríme o vzniku kyslých horninových vôd – „acid rock drainage“ (ARD). V prípade, že sa tieto vody nachádzajú v miestach kde sa nachádza veľa bázických minerálov, kde ich je dostatok na neutralizáciu kyslých horninových vôd, vzniknú neutrálne banské vody (neutral mine drainage) – NMD. Tieto vody mohli vzniknúť ako priamy aj nepriamy dopad baníckej činnosti, vtedy hovoríme o vysoko mineralizovaných banských vodách, známych aj pod názvom Acid Mine Drainage (ďalej AMD), ktoré možno pozorovať takmer vo všetkých typoch ložísk s obsahom sulfidov, ako sú ložiská neželezných kovov, alebo uhoľné ložiská. Tieto vody hlavne v dôsledku nízkeho pH (2–5), zvýšených obsahov ťažkých a toxických kovov negatívne ovplyvňujú celú ekológiu vodného prostredia v okolí banských závodov (MCLEMORE 2008).

1.1.1 Kyslé banské vody

Kyslé banské vody, ktorá sa vyskytuje v prostredí, kde sa nachádza materiál s obsahom kyselín. Spočiatku je tlmená pufrácnou, neutralizačnou a autoregulačnou schopnosťou vodného prostredia. Po prekročení týchto kapacít sa zvetrávanie začne znásobovať účinkom prítomných kyselín na anorganické prostredie, ktorá vedie k

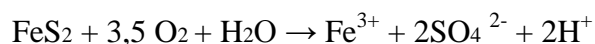
prudkému poklesu pH a zvýšenej mobilite často toxických prvkov. Takáto situácia má neblahé dôsledky na rastlinstvo a živočíšstvo daného prostredia (MCLEMORE, 2008).

Jedná sa najmä o sulfidické minerály, ktoré sú oxidované za prítomnosti vody, kyslíka a mikroorganizmov. Najdôležitejšími producentmi acidity sú minerály ako pyrit (FeS_2), chalkopyrit (CuFeS_2), alebo markazit (FeS_2) (KONTOPOULOS, 1998; PITTER, 1990).

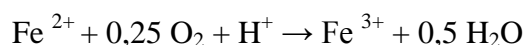
Tieto procesy sú podmienené biologicko-chemickou oxidáciou, ktoré zabezpečujú autochtónne baktérie druhov *Acidithiobacillus ferrooxidans* a *Acidithiobacillus thiooxidans* (KUŠNIEROVÁ & FEČKO, 2001). Tento proces môžeme označiť aj pojmom biooxidácia (ŠLAUKOVÁ et al., 2011).

Dej biooxidácie sa dá pomocou chemickej rovnice opísať len schematicky, pretože sa jedná o komplex chemických reakcií. Zjednodušene môžeme biooxidáciu pyritu vyjadriť podľa chemickej rovnice (DRUSCHEL et al., 2004):

1) Chemické štádium, alebo iniciačné – reakciou sa vytvorí kyselina (H^+), acidifikuje sa prostredie na povrchu pyritu a tak sa vytvoria podmienky pre acidifikáciu pyritu

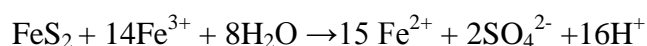


2) Biooxidácia Fe^{2+} v kyslom prostredí.



V abiotických podmienkach v prostredí kde $\text{pH} > 6$ sa oxiduje Fe^{2+} na Fe^{3+} a v kyslom prostredí takmer neprebíha (PITTER, 1999). Oxidáciu umožnia Fe-oxidujúce baktérie, ktorých účinok túto reakciu zrýchli o 10^5 násobne. Jedná sa hlavne o rod *Acidithiobacillus*.

3) Pretvorený Fe^{2+} zoxidovaný na Fe^{3+} reaguje so zostávajúcim pyritom a generujú sa opäť Fe^{2+} ióny.



Fe^{2+} sa môže tvoriť aj inou chemickou cestou a to za prítomnosti síru - oxidujúcich baktérií ako je *Acidithiobacillus thiooxidans* a to: $\text{FeS}_2 + 2 \text{Fe}^{3+} \rightarrow 3 \text{Fe}^{2+} + 2\text{S}$.

Po tomto štádiu má mikroflóra dostatok zdroja energie pre fixáciu CO_2 a pre rast. Tvorí sa kyseliny a pokračuje rozklad iných minerálov v prostredí čo vedie k uvoľňovaniu ďalších kovov do prostredia (PITTER, 1999).

Kyslé banské vody predstavujú hlavné environmentálne riziko zo skupín banských vôd. Komplexné riešenie tohoto problému neexistuje z dôvodu, že chemické,

geologické, pedologické a topografické podmienky sa menia z lokality na lokalitu. (MCLEMORE, 2008)

Na Slovensku má banská činnosť stáročnú tradíciu. Útlm rudného baníctva v polovici 20. Storočia spôsobil uzatváranie banských zariadení, čím došlo k masívnemu zatápaniu banských priestorov so špecifickým geologickým zložením. Tieto podmienky sú veľmi vhodné pre vznik AMD a hlavným environmentálnym rizikom je styk týchto drenážnych vôd z banských zariadení s povrchovými vodami.

Zvýšená acidita vôd môže byť veľmi škodlivá pre mnohé druhy organizmov. Zvýšený výskyt týchto vlastností, spôsobuje rozpustnosť kovov ešte pred ich viazaním v rudných mineráloch. Mnohé z nich sú síce nevyhnutné pre život, ale ich zvýšený výskyt má negatívne následky. To spôsobuje úbytok domácich druhov rýb, ktorých ekologické optimá sa nachádzajú pri pH bližšom ku alkalickému.

1.1.2 Neutrálne banské vody

V prípade, ak banský odpad a drenážne vody, ktoré ho obkolesujú majú neutrálne pH, zvýšený podiel sulfátov a rozpustených kovov hovoríme o neutrálnych banských vodách - neutral mine drainage (NMD) (SCHARER et al., 2000).

Vo všeobecnosti dostali tieto vody menej pozornosti ako kyslé banské vody. Napriek tomu je dnes známe, že aj neutrálne banské vody môžu v životnom prostredí spôsobovať mnohé problémy, najmä kvôli vyzrážavaniu Fe a Zn v prostredí (SHEVENELL et al., 1999).

Hlavné procesy, ktoré spôsobujú vznik neutrálnych banských vôd (NMD) je oxidácia pyritu (FeS_2) a rozpúšťanie karbonátov. Vznik NMD je taktiež, ako pri AMD výsledkom chemických interakcií medzi vodou, geologickým podložím a vzduchom (NORDSTROM & ALPERS, 1999).

Medzi niektoré reakcie, ktoré spôsobujú vznik NMD patria:

- oxidácia pyritu a ostatných sulfidov
- rozpúšťanie minerálov z geologického podložia (najmä karbonátových a silikátových hornín)
- zrážanie a rozpúšťanie hydroxidu železitého $\text{Fe}(\text{OH})_3$ a hydroxydov síry
- absorpcia rozpustených kovov
- rozpúšťanie a zrážanie sulfátov železa
- prístupnosť a rozpúšťanie sádrovca ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

1.2 Mikrobiológia banských vôd

1.2.1 Charakteristika železitých a mangánových baktérií

Železité baktérie sú fyziologickou skupinou aeróbných baktérií, so vzťahom ku kolobehu železa. Môžeme tu zahrnúť baktérie s pasívnym viazaním oxidov a hydroxidov železa a enzymatickou – aktívnou oxidáciou železa (ERLICH & NEWMAN, 2008).

Železité baktérie s aktívnou oxidáciou železitých iónov môžeme považovať za organizmy, ktoré oxidujú redukované formy železa a využívajú energiu z tejto oxidácie na svoj rast. Princípom je oxidácia dvojmocných zlúčenín železa (Fe^{2+}) na zlúčeniny viacmocné. Vo všeobecnosti však existuje mnoho spôsobov využívania zlúčenín železa. Môžeme ich rozdeliť na autotrofné, fakultatívne litotrofné a organotrofné baktérie. Prvé dve skupiny osídľujú najmä vody oligotrofného charakteru. Energiu získavajú oxidáciou železa a mangánu, ktoré prijímajú do bunky v rozpustenej forme. Výsledný oxid je nerozpustný a je dôvodom tvorenia sa slizu na styčnej ploche povrchu substrátu s vodou. Tu môžeme zaradiť baktérie rodu *Leptothrix* (*Leptothrix ochracea*), *Crenothrix* (*Crenothrix polyspora*), *Clonothrix* (*Clonothrix fusca*), a rod *Gallionella* (*Gallionella ferruginea*). Do tretej skupiny patria baktérie organotrofné, ktoré osídľujú biotopy eutrofného charakteru. Železo a mangán neprijímajú do bunky, ale dochádza k vonkajšej absorpcii a oxidačné procesy neuvolňujú energiu. Sem patria druhy rodu *Siderocapsa* napr. *Siderocapsa major*, z rodu *Leptothrix* sem patrí *Leptothrix major* a rod *Crenothrix* (*Crenothrix tenuis*). Je známe, že osídľujú aj vody, ktoré obsahujú menej ako 0,1 mg/l železa. Na priebeh oxidácie je však potrebná koncentrácia rozpusteného kyslíka minimálne 0,3 mg/l.

Ich prítomnosť je typická charakteristickými zhľukmi buniek a tvorením rôznorodých štruktúr, ktoré sú tvorené oxidmi železa uloženými buď vo vnútri bunky, alebo v povlaku buniek (ANDREWS et al., 2013).

Pozornosť na seba upútavajú najmä z hľadiska rozvodov pitnej vody v železných rúrach, kedy spôsobujú nepríjemnosti znižovaním prietokov pitej vody, zafarbením vody načerveno alebo hnede, tvorbou červených alebo hnedastých hrubých nánosov na stenách cisterien alebo nádrží a upchávaním filtrov (CULLIMORE & MCCANN, 1978). Pokiaľ tieto nárusty osídlia druhy baktérií schopné tento materiál degradovať anaeróbne, vzniká sírovodík a kyseliny. Tieto zlúčeniny spôsobujú nepríjemný zápach a celkovo znižujú kvalitu vody. Likvidácia nárustov železitých baktérií je pomerne zložitá, pretože

pevnosť z bakteriálnych bunkových stien zabraňuje baktériocídnym látkam prenikať do vnútra bunky. Bunkové membrány sú inkrustované železitými a mangánovými soľami, ktoré vznikli pri metabolizme týchto baktérií (CHRISTENSEN, 2004).

1.2.2 Ekologické faktory rastu železitých a mangánových baktérií

Železo (Fe) a Mangán (Mn)

Železo je po hliníku najviac vyskytujúcim sa kovom v litosfére. Nachádza sa v rôznych chemických zlúčeninách v geologickom podloží ako sú oxidy, karbonáty, silikáty, a sulfidy. V litosfére sa ho nachádza v množstve asi 5% hmotnostných %. Najviac sa ho nachádza vo forme páskovaných železných rúd z protezoika a archaika. Táto forma tvorí až 95% svetových zásob železa. Železo patrí medzi mikrobiogénne prvky eukaryotov aj prokaryotov (CHAVADAR & BAJEKAL 2008).

V prostredí sa vyskytuje v dvoch oxidačných stavoch a to ako dvojmocné železo (Fe^{2+}) a trojmocné železo (Fe^{3+}). Ich výskyt závisí od fyzikálno-chemických podmienok. Za anoxických podmienok je stabilnejšie dvojmocné železo (Fe^{2+}), ktoré je však citlivé na chemickú reakciu s O_2 v prostredí. Trojmocné (Fe^{3+}) železo je stabilnejšie v okysličených vodách, no môže dôjsť k chemickej reakcii s vodou a preto je vo vodnom prostredí málo koncentrované. To znamená, že má nízku koncentráciu vo väčšine vodných telesách (KONHAUSER et al. 2011).

Mangán sa najčastejšie vyskytuje v dvojmocnom oxidačnom stave. Pre voľnú prírodu a vody sú charakteristické oxidačné stupne II, III, IV. Množstvo rozpustného Mn^{2+} závisí od rozpusteného kyslíka vo vode a rozpustnosťou uhličitanov, hydroxidov a sulfidov. Najčastejšie sa jedná o MnCO_3 od ktorého závisí rovnovážna koncentrácia (TÓTHOVÁ & MOGOŇOVÁ 2000).

Teplota

Železité baktérie majú optimálny rast pri teplote od 20°C do 40°C, väčšina však má svoje teplotné optimum pod teplotou 20°C. Jedná sa teda o psychrofilné organizmy.

Tabuľka 1: Teplotný rozsah vybraných železitých baktérií (CULLIMORE & MCCANN, 1978)

TAXÓN	ROZSAH TEPLÔT		
	minimálna	optimum	maximálna
<i>Leptothrix</i> spp.	10°C	20-25°C	35°C
<i>Crenothrix</i> spp.	6°C	26-28°C	34°C
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	—	15-20°C	25°C

Vodíkový exponent - pH

Kedže sa jedná o organizmy prijímajúce živiny svojím povrchom, vodíkový potenciál je dôležitý faktor, ktorý ovplyvňuje prísun živín a enzymatickú aktivitu. Optimum pre rast železitých baktérií sa nachádza v rozmedzí pH od 5,4 do 7,2. (HASSELBARTH & LUDMANN, 1972). Optimálne pH na rast je približne pH 7. Baktérie druhu *Acidithiobacillus ferrooxidans* sú schopné rastu aj pri pH 1. (RUŽIČKA, 1999). Citlivosti baktérií na pH sa museli prispôbiť aj živné média a preto ich existuje viacero druhov, ktorých pH sa líši: Prevotovo médium – pH 6; médium pre železité baktérie – pH 6,5; médium *Leptothrix* – pH 5,9 – 6,8; Lieskeho médium – pH 6,6; van Nielove médium – pH 6 – 7 (RODINA 1965).

1.2.3 Mikrobiálna oxidácie železa

Baktérie, ktoré katalizujú disimiláciu oxidácie železa môžu byť rozdelené do štyroch hlavných fyziologických skupín (HEDRICH et al., 2011)

1. acidofilné, aeróbne železo oxidujúce baktérie
2. neutrofilné, aeróbne, železo oxidujúce baktérie
3. neutrofilné, anaeróbne železo oxidujúce baktérie
4. anaeróbne fotosyntetické železo oxidujúce baktérie

Acidofilné, aeróbne železo oxidujúce baktérie

Acidofilné, aeróbne železo oxidujúce proteobaktérie pritiahli na seba pozornosť hlavne v súvislosti s ťažbou železa s využitím železo – oxidujúcich baktérií. Jednalo sa o objav druhu baktérie *Acidithiobacillus ferrooxidans* v štyridsiatych rokoch 20. storočia najmä v súvislosti s biotechnológiami použiteľnými najmä pri ťažbe železa

(biomining) a stým súvisiacimi environmentálnymi problémami pri vzniku kyslých a kovmi obohatenými banskými vodami (COLMER et al., 1950).

Acidofilné železo oxidujúce baktérie oxidujú železo pri nízkom pH z dôvodu, že pri vyššom pH stúpa šanca, že dvojmocné železo Fe^{2+} zoxiduje na trojmocné železo Fe^{3+} , ktoré sa potom zvyknú zlučovať do železitých hydroxidov a tým pádom sa železo stane pre baktérie nedostupným. Pokiaľ je pH neutrálne, ďalšou možnosťou je pre prežitie baktérií nízka koncentrácia kyslíka. V týchto dvoch prípadoch je oxidácia dvojmocného železa dostatočne spomalená na to, aby bolo využiteľné pre rast železitých baktérií (KONHAUSER et al., 2011)

Acidofilné prokaryoty majú prispôbenú bunkovú membránu na produkciu ATP pomocou ATP – syntézy. Prijem protónov, ktoré riadia tento proces musí byť vyvážený s tokom odvedených elektrónov, pochádzajúcimi napríklad z oxidácie dvojmocného železa (Fe^{2+}). Väčšina baktérií môžu získavať energiu oxidáciou dvojmocného železa, kým je tento proces spojený s redukciou molekulárneho kyslíka O_2 . Väčšina druhov baktérií sú fakultatívne anaeróbne a môžu proces oxidácie redukovanej formy síry spájať s redukciou trojmocného železa Fe^{3+} (HEDRICH et al. 2011).

Biochemické procesy, pri ktorých baktérie oxidujú sulfidy a železo sa môžu líšiť a záležia od druhu baktérie. HALBERG (2010) popísal nový druh železitej baktérie – *Acidithiobacillus ferrivorans*, u ktorého zistil odlišný spôsob oxidácie železa od baktérie *Acidithiobacillus ferrooxidans* a líši sa aj v psychrotolerancii.

Neutrofilné, aeróbne, železo oxidujúce baktérie

Jedná a o baktérie, ktoré využívajú potenciál rýchlej abiotickej oxidácie dvojmocného železa Fe^{2+} vo vodách bohatých na O_2 . Osídľujú miesta, kde sa nachádza rozhranie medzi aeróbnymi a anoxickými zónami v sedimentoch a podzemných vodách. Vo všeobecnosti však ide o podmienky, kde je pH neutrálne a koncentrácia kyslíka je menej ako 1 mg/l^+ (HEDRICH et al. 2011).

Pre túto skupinu baktérií sú charakteristické rody baktérií ako *Gallionella* a *Leptothrix*, ktoré sú typické pre povrchové vody a označujeme ich ako mikroaerofilné baktérie. *Gallionella ferruginea*, prvé opísaná neutrofná železo oxidujúca proteobaktéria. Môže rásť autotrofne aj mixotrofne s využitím trojmocného železa Fe^{3+} , ako donora elektrónu, využívaného ako zdroj energie. Je charakteristická svojou dlhou stopkou, ktorá je pokrytá vyzrážaným ferrihydritom ($\text{Fe}^{3+} \cdot 2\text{O}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$). Tá chráni

živé súčasti bunky pred voľnými radikálmi kyslíka, ktoré sa vytvárajú počas oxidácie železa (HALLBECK & PEDERSEN, 1995). Stopky prestávajú byť viditeľné pokiaľ baktéria rastie v prostredí s nižším pH, konkrétne pH nižšie ako 6, alebo pri mikroanaeróbných podmienkach. Plášť stopiek je kontaktným miestom pre hydrolýzu a zrážanie voľného trojmocného železa (HALLBECK & PEDERSEN 1990). *Gallionella ferruginea* využíva ako zdroj energie oxidáciu dvojmocného železa Fe^{2+} s O_2 na formu trojmocného železa Fe^{3+} + uvoľnená energia. Žije v relatívne špecifických podmienkach, kedy musí mať prístup ku redukovanému železu, správnej koncentrácii kyslíka O_2 (vyššia 20mg.l^{-1}), dostatočné množstvo uhlíka, fosforu a dusíka (ANDERSON & PEDERSEN 2003). Ideálna teplota pre rast je približne $8-16^\circ\text{C}$ a pH od 6,0 – 7,6.

Rod *Leptothrix* sp. je druhom často vyskytujúcim sa v prostredí spolu s rodom *Gallionella* sp. Je to druh schopný metabolizovať okrem železa Fe^{2+} aj mangán Mn^{2+} rastúci vo vode, kde je okrem týchto prvkov aj dostatok organickej hmoty. Teplotné optimum sa pohybuje medzi $10-35^\circ\text{C}$ a pH v rozmedzí 6,5 – 7,5. autor

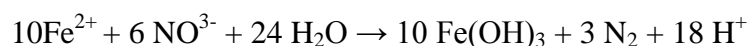
Neutrofilné, anaeróbne železo oxidujúce baktérie

Dvojmocné železo Fe^{2+} je v anaeróbných podmienkach relatívne stabilné, a sú dva spôsoby disimilačnej oxidácie:

1) Anaeróbne dýchanie, kde dvojmocné železo pôsobí ako donor elektrónov a dusičnan ako akceptor elektrónov

2) Anaeróbne dýchanie, kde je dvojmocné železo fototrofne oxidované a využívané ako zdroj elektrónov pre fotosyntetickú baktériu a dusičnan je využívaný ako akceptor elektrónu.

Chemická rovnica oxidácie železa kedy je akceptorom elektrónu dusičnan, vyzerá približne takto:



Pokiaľ sa nitráty v anoxickom prostredí nevyskytujú, ku oxidácii železa Fe^{2+} nedôjde. Jedná sa hlavne o miesta kde sa stretávajú oxické a anoxické podmienky, kedy nedochádza ku aeróbnej oxidácii.

Uskutočniteľnosť tejto chemickej reakcie závisí od oxidačno- redukčného potenciálu $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ a páru dusičnan/ dusitan - $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$. Platí, že oxidačno - redukčný potenciál by mal byť musí byť pri $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ negatívnejší. Popri tejto

chemickej ceste metabolizmu baktérií sa tvoria rôzne Fe^{3+} minerály ako ferihydrit, magnetit a goethit. Táto vlastnosť môže mať zásadný vplyv na mobilitu toxických kovov v prostredí (HEDRICH et al. 2011).

Anaeróbne, fotosyntetické, železo (Fe^{2+}) oxidujúce baktérie

Jedná sa o baktérie, ktoré využívajú špecifický typ fotosyntézy, kedy je dvojmocné železo Fe^{2+} využívané na redukciu oxidu uhličitého CO_2 . Tento typ fotosyntézy môžeme nazvať aj fotoferotrofia a výsledným produktom je formaldehyd (CH_2O) a hydroxid železitý ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) (HEDRICH et al., 2011). Chemická rovnica tohto typu metabolizmu vyzerá približne takto:



Ako odpadové produkty z tohto metabolizmu sú generované zrazeniny trojmocného železa Fe^{3+} . Tie predstavujú potenciálnu hrozbu pre zahalenie a zamedzenie prísunu svetla napr limonitom [$(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_3 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$].

2 Charakteristika územia výskumu

Všetky záujmové územia sa nachádzajú v spišskom regióne, v okresoch Spišská Nová Ves a Gelnica. Lokality sa nachádzajú v katastroch obcí Markušovce, Rudňany, Závadka, Krompachy a Slovinky. Jedná sa o severnú časť Slovenského Rudohoria, ktoré je známe bohatosťou na výskyt zaujímavých minerálov a rudných žíl.

2.1 Lokality v okolí obce Rudňany

Obec Rudňany sa nachádza približne 12 km juhovýchodne od mesta Spišská Nová Ves. V rámci geomorfologického členenia podľa MAZÚRA & LUKNIČA (1986) patrí obec do oblasti pohoria Slovenské Rudohorie, do celku Volovské vrchy a podcelku Hnilecké vrchy. Nadmorská výška obce sa pohybuje medzi 475 až 959 m n. m. Katastrálne sa obec nachádza v okrese Spišská Nová Ves v Košickom Kraji.

Podľa hydrologického členenia sa oblasť nachádza v povodí Hornádu a hlavným vodným tokom je Rudnianský potok s plochou povodia 23,6 km².

Kataster Rudnian sa nachádza v dvoch klimatických oblastiach. Mierne teplá klimatická oblasť sa nachádza v severnej časti katastra obce a mierne chladná oblasť sa nachádza v južnej časti a vo vyšších nadmorských výškach. Priemerné teploty v januári sa pohybujú medzi -6° až -7°C. V júli sa priemery teplôt udržiavajú medzi 14° - 16°C. Priemerné ročné zrážky dosahujú 700-800 mm (KONČEK, 1980).

Geologickú stavbu katastrálneho územia tvoria dve geologické superjednotky a to gemericum a silicicum v severnej časti. Gemicum je tvorené ďalšími dvomi jednotkami a to folkmarská skupina (žltozelené a zelenofialové fylity, pyroklastické produkty bazálneho vulkanizmu) a folkmarská skupina (zlepence, pieskovce, pieščité bridlice, zlatnícke súvrstvie s metamorfovanými bazickými vulkanitmi). Silicikum budujú prevažne stredotriasové svetlé masívne (prevažne wettersteinské) vápence. Väčšiu rozlohu zaberajú zo severnej časti paleozoické usadeniny hornádskeho vrstiev Deluviálne sedimenty z kvartéru atropogénne sedimenty z kvartéru taktiež zaberajú veľkú časť územia (MELLO, 2000).



Obrázok 1: V rámciku sa nachádza poloha všetkých odberových lokalít v obciach Rudňany a Slovinky na mape Slovenska (GOOGLE EARTH, 2016)

2.1.1 Odkalisko Rudňany

Poloha odkaliska je situovaná v údolí Markušovského potoka, v blízkosti bývalého úpravárenského komplexu Želba, a.s. nachádza sa pred vyústením do doliny Rudnianskeho potoka. Katastrálne areál leží na rozhraní území obcí Markušovce, Závadka a Rudňany. Jedná sa o odkalisko údolného charakteru, ktoré vzniklo v údolí Markušovského potoka, ktorý bol odvedený tunelom pred hornou hrádzou, popod kopec Hôrka smerom ku Markušovciam, kde sa vlieva do Hornádu. Začiatok prevádzky odkaliska sa začal v roku 1963. Odvtedy sa jeho morfológia menila v troch etapách výstavby a postupne bolo zaplnené celé údolie. Dnes má odkalisko plochu približne 35 ha, dĺžku 1 085 m, šírku 160 – 340 m. Váha uloženého kalu je približne 9 901 160 ton (JANČURA et al., 2005). Hrúbka uloženého materiálu je najväčšia pri dolnej hrádzi kde dosahuje 38 m (KROKUSOVÁ, 2007).

Nadmorská výška vodnej hladiny – tzv. zrkadla (obr. 2), teda jedná sa o miesta kde sa kal naplavoval naposledy je vo výške 474 m n. m.

Materiál nachádzajúci sa na odkalisku je flotačným kalom z úpravy Barytovej rudy. Kaly obsahujú rôzne toxické kovy ako As, Hg, Cu, Sb. Z hľadiska chemickeho zloženia sa tu najviac nachádza BaSO_4 (11,95%) , Fe (13,74%), SiO_2 (39,77%), Cu (0,05%). Chemické zloženie kalu sa líši v závislosti od polohy v odkalisku a času kedy tam bol kal dodaný. Kal ktorý bol umiestnený na odkalisku pred rokom 1984 je značne

bohatší na BaSO_4 . Vtedy časť barytovej rudy bola spracovaná magnetickou separáciou sideritu a odflotovaním sulfidov a zvyšok bol naplavovaný na odkalisko. To znamená, že sa jedná o materiál nachádzajúci sa v spodných vrstvách uloženého kalu. Po tomto roku došlo k úprave technológie spracovania barytovej rudy a ukladaný materiál sa ochudobnil hlavne o BaSO_4 . Z hľadiska časticového zloženia je odkalisko diferencované od najjemnejších a najľahších kalov v strede odkaliska, ku najťažším a väčším frakciám po okrajoch odkaliska. Je to spôsobené prirodzeným gravitačným triedením materiálu, kedy sa najjemnejší materiál dopravil najďalej od výpustného potrubia. Teda platí, že centrálna časť odkaliska je reprezentovaná skôr jemnozrnným materiálom a nižším zastúpením barytu.

V súčasnosti odkalisko spravuje firma SABAR s.r.o Makušovce. Vodná plocha sa nachádza v západnej časti odkaliska. Vo východnej časti odkaliska je povrch narušený ťažbou kalu, ktorý sa využíva ako materiál na spevňovanie líniových stavieb. Potenciál má aj ťažba barytovej zložky kalu v najhlbších častiach.



Obrázok 2: Pohľad na vodnú plochu - zrkadlo odkaliska v Rudňanoch

2.1.2 Štôlna Rochus

Poloha portálu Štôlne Rochus a vyústenia vôd z banského komplexu je situovaná na začiatku obce Rudňany v smere od Markušoviec. Nachádza sa tesne za rozdvojením hlavnej cesty č. 3244 smerom na Poráč.

Jedná sa o odvodňovaciu a neskôr dopravnú štôľňu , ktorá sa začala raziť v roku 1795, s prirodzeným výtokom do Rudnianskeho potoka. Od roku 1925 sa ňou všetka vyťažená hornina dopravovala z Poráčskej bane do úpravne v Zabíjanci a neskôr po vybudovaní Nového Priemyselného Závodu (NPZ) v Oľšu sa preváža vyrúbaná hornina po úzkorozchodnej banskej železnici dodnes.

Momentálnym problémom je postupné zatápanie odťažbových šácht banského komplexu Rochus. To nastalo po útlme banskej činnosti v roku 1991. Postupne dochádzalo k zatápaniu všetkých štyroch obzorových šácht. Celý komplex je poprepájaný obozorovými chodbami, medziobzormi a komínmi, začalo dochádzať k zatápaniu bane Poráč súmerne po celom ložisku. Odhady na množstvo nahromadenej vody v podzemných priestoroch sa odhadujú na 4 milióny m³ (PRAMUKA & ĎURŠA, 2014).

Dnes voda z podzemia bane vyteká cez obzor Rochus dvomi potrubiami, s priemerom 500 a 200 mm, ktoré vyúsťujú do Rudnianskeho potoka. Po zatopení bane až po obzor Rochus sa prietoky vody vychádzajúcej z bane podstatne zvýšili. Pôvodný drenážny systém je prispôsobený na prietok 80 l/s, pričom súčasný prietok vody je okolo 150 l/s, čo spôsobuje podmáčanie prilahlého prostredia a narušanie statiky miestnych budov. Pri návalových alebo dlhodobejších dažďoch hrozia v okolítom prostredí závaly. Štôľňa Rochus je zapísaná v kultúrnom zozname pamiatok na Slovensku.



Obrázok 3: Vchod do štôlne Rochus

2.1.3 Lokality v obci Slovinky

Obec Slovinky sa nachádza v okrese Spišská Nová Ves v Košickom kraji. Leží v doline Slovinského potoka v Severovýchodnej časti Slovenského Rudohoria, v celku Volovské vrchy, podcelok Hnilecké vrchy. Kataster obce má rozlohu 4 644 ha a stred obce leží v nadmorskej výške 443 m n. m. Počet obyvateľov pri sčítaní v r. 2001 bol 1 867.

Geologickú stavbu územia tvoria zlepence a brekcie konlského súvrstvia, bridlice, pieskovce a vápence. Celá oblasť sa nachádza v tektonickej superjednotke Gemericum (MELLO, 2000).

Obec sa nachádza v chladnej klimatickej oblasti s priemernou júlovou teplotou 12–16 °C. Severná časť obce zasahuje do mierne teplej a vlhkej podoblasti. Oblasť patrí do povodia Hornádu. Hlavným tokom je Slovinský potok, ktorého dĺžka je približne 16 km. Plocha jeho povodia je 79 km². Je pravým prítokom Hornádu.

Baníctvo

Oblasť sa vyznačuje veľkým počtom ložísk a patrí medzi najväčšie na Spiši a Gemeri. V minulosti boli ťažené najmä medené a striebornaté rudy. Po úpadku baníctva v druhej polovici 19. storočia sa začali ťažiť železné rudy. Po sérii úpadkov

počas prvej a druhej svetovej vojny sa spustila ťažba v roku 1951. Spustila sa úpravňa rúd, ktorá sa v roku 1962 modernizovala.

Počas celej bohatej banskej histórie tu vzniklo mnoho antropogénnych povrchových aj pod povrchových banských antropogénnych foriem. Mnoho hald je už dnes pokrytých vegetáciou a sú nerozoznateľné od okolitého terénu. Prvé odkalisko-Bodnárec sa po havárii prestalo používať a pomaly zarastá vegetáciou. Nachádza sa tu aj malá terénna depresia v ktorej sa stále udržiava voda, no celú postupnou sukcesiou krajiny zaniká. Po havárii bolo vybudované nové odkalisko v katastri mesta Krompachy. (KROKUSOVÁ, 2007).

2.1.4 Odkalisko Slovinky - Kaligrud

Odkalisko sa nachádza v katastri mesta Krompachy, tesne pred začatím obce Slovinky. Jedná sa o odkalisko údolného typu, nachádzajúce sa v údolí po pravej strane toku Slovinského potoka. Začalo sa stavať od roku 1967 a od vtedy výška hrádze dosiahla 113 metrov, čím sa stáva najvyšším odkaliskom na Slovensku. Objem kalu tvoriace odkalisko je približne 4,7 milióna m³. Odkalisko Kaligrud obsahuje flotačný kal po úprave rúd z podniku *Železorudné bane*, n.p. Spišská Nová Ves. Odkalisko je zložené z vrchnej časti – približne 5 metrová vrstva strusky z Kovohút Krompachy a nižšej vrstvy, ktorú tvorí flotačný kal zo spracovania siderit – sulfidických rúd. Medzi dvomi vrstvami sú výrazné rozdiely v chemickom zložení. Z hľadiska nebezpečných toxických prvkov sa zvýšené koncentrácie nachádzali vo vrchnej časti (struske) a v spodnej časti odkaliska, čo bolo zistené vrtnými odbermi. Platilo to najmä pre prvky Cu, Zn, Cr, Pb, Ba, Sn, As a Sb (TÓTH et al., 2013).

Odkaliskový materiál v lokalite Slovinky neprodukuje aktívnu kyslosť vznikajúcu oxidáciou prítomných sulfidických minerálov, pretože obsah sulfidickej síry je nízky (0,2 %). Približné zloženie: Kremeň (16 – 34,5 %), Siderit (8,8 – 19,75 %), Muskovit (5,1 – 16,8 %) Chlorit (0,8 – 0,9 %), Sádrovec (2,5 – 10 %). Ďalej sa tu dajú nájsť rudné minerály ako: Pyrit, Chalkopyrit, Arzenopyrit, Covellit. Z ťažkých kovov a potencióálne nebezpečných prvkov sa tu Ďalej nachádzajú: Meď - Cu (758 – 8449 mg.kg⁻¹); Arzén - As (93 – 649 mg.kg⁻¹); Antimón - Sb (29,7 – 3791 mg.kg⁻¹); Olovo - Pb (36,3 – 3811 mg.kg⁻¹); Zinok - Zn (215 – 33723 mg.kg⁻¹) a Bárium - Ba (29 – 3021 mg.kg⁻¹), ktoré sú viazané najmä v primárnych mineráloch ako chalkopyrit, pyrit, tetraedrit, arzenopyrit, galenit, sfalerit, antimonit, Cu-arzenopyrit, ktoré tvorili minerálnu výplň ťažených žíl (ANTAL, 1986).



Obrázok 4: Pohľad na lokalitu z hrádze odkaliska. V zadnej časti sa nachádza vodná plocha

2.1.5 Štôlna Alžbeta

Jedná sa o odvodňovaciu štôľňu ku systému baní, ťažiarkeho spoločenstva Erbstollen Gewerkschaft zo začiatku 19. Storočia. V tom čase ťachtové diela dosahovali veľmi veľkú hĺbku a odvodňovací systém prestával fungovať. Štôlna Alžbeta slúži od roku 1900 ako už náhradná odvodňovacia štôlna.

Štôlna je v prevádzke aj po zatvorení bane v Slovinkách, čo sa stalo v roku 1989. Je stále prístupná a slúži na monitorovanie a odvodňovanie podzemných banských systémov.

Keďže odvodňuje staré banské systémy, voda zo štôľne obsahuje zvýšené koncentrácie As, Sb, Mn a SO₄, a spolu s priesakmi z miestnych odkalísk a hald spôsobuje zhoršenie kvality vody Slovinského potoka.

Voda vytekajúca zo štôľne je drenážnou rúrou odvedená popri ceste č. 3255 do potoka Bodnárca, ktorý odvádza vodu z odkaliska Bodnárca a je prítokom Slovinského potoka.



Obrázok 5: Pohľad na odberové miesto. Jedná sa o drenážnú rúru vedúcu zo štôlne Alžbeta vlievajúcu sa do potoka Bodnárec

2.1.6 Potok Bodnárec

Jedná sa o povrchový odtok obtekajúci odkalisko Bodnárec. Tok je pravým prítokom Slovinského potoka. V závere toku sa do neho vlieva aj drenážna rúra zo štôlne Alžbeta. Odkalisko sa nachádza približne 400 m od cesty č. 3255 vedúcej z obci Krompachy do Sloviniek. Nad odkaliskom sa nachádza aj stará halda, ktorá spolu s odkaliskom ovplyvňuje tok po chemickej stránke. Zložku tvorí hlavne pyrit a chalkopyrit (MNÍCH & VLČKO, 2012). Halda podľa „Vítkovického posudku“ má najvyššie podiely Cu, Fe, SiO₂ zo všetkých hald v Slovinách (ŠOTNÍK, 2002).

3 Ciele práce

Predmet výskumu

Monitoring kvality vody kvality banských vôd v lokalite Rudňany a Slovinky na základe vybraných mikrobiologických (koliformných baktérií, tolerantných koliformných baktérií, enterokokov a kultivovateľných baktérií) a fyzikálno-chemických ukazovateľov (teploty, pH, množstva rozpustených látok a mernej vodivosti).

Cieľ výskumu

Identifikácia a analýza významných ekologických a hygienických skupín baktérií, mikroskopickými, kultivačnými (metóda priameho nalievania) a molekulovými (MALDI TOF) analýzami.

Úlohy výskumu

Spracovanie problematiky mikrobiológie neutrálnych banských vôd a jeho vplyv na životné prostredie.

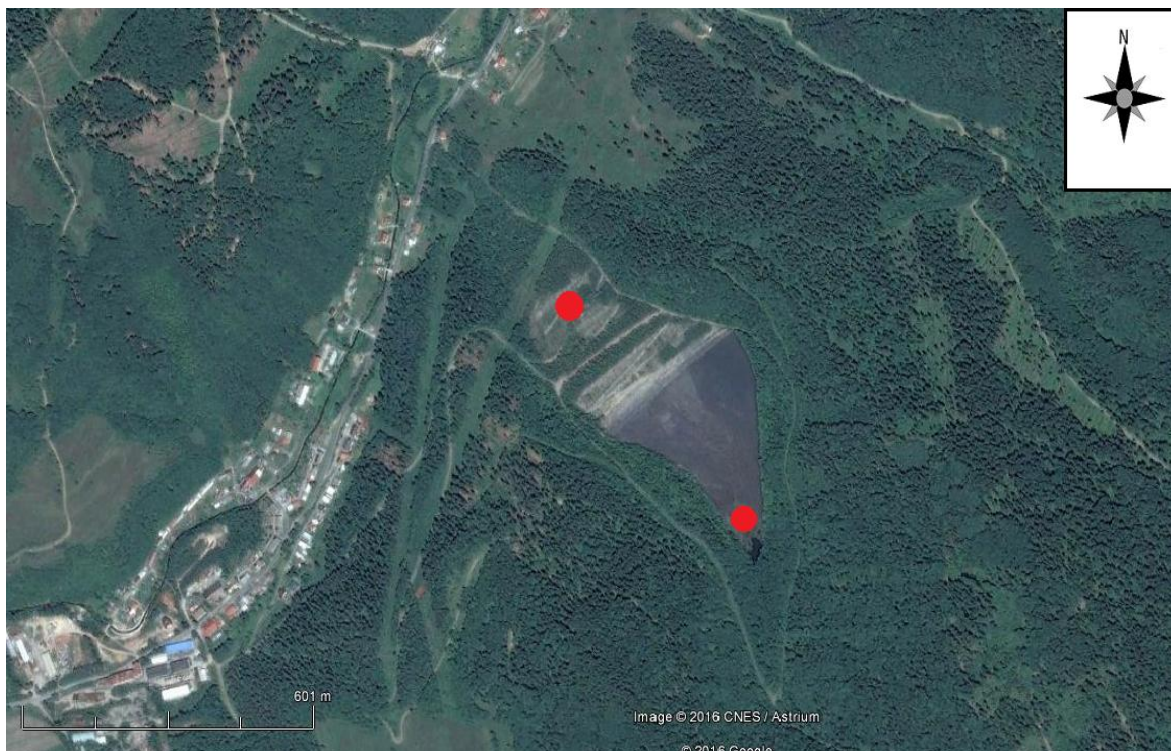
4 Materiál a metodika

4.1 Odber vzoriek

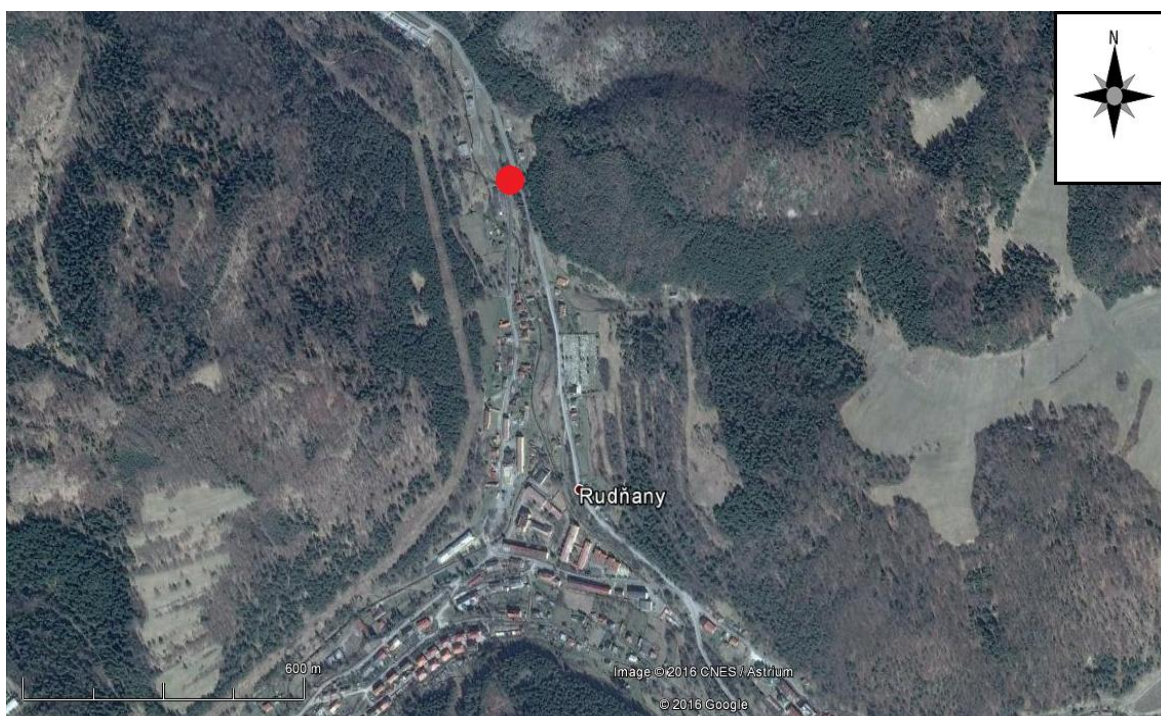
Vzorky boli odoberané v mesiacoch jún až august 2015, stále v posledný týždeň v mesiaci. Podľa STN EN ISO 5667 – 1 : 2007, STN EN ISO 5667 - 3 : 2005 a STN EN ISO 5667 – 4:1999 boli vzorky odoberané do sterilizovaných sklenených fľašiek s objemom 250 ml do približne 2/3 ich objemu pre zabezpečenie dostatočného prísunu kyslíka. Z každej lokality boli brané dvojice vzoriek a to voda a sedimentárne usadeniny z dna. Na odkalisku v Rudňanoch a Slovinkách boli brané vzorky z vrchu odkaliska - z tzv. zrkadla odkaliska a drenážnych rúr pod hrádzami. Sklenené fľašky boli uschovávané po odberoch v chladničke a spracovávané v laboratóriu KBVE TU Zvolen.



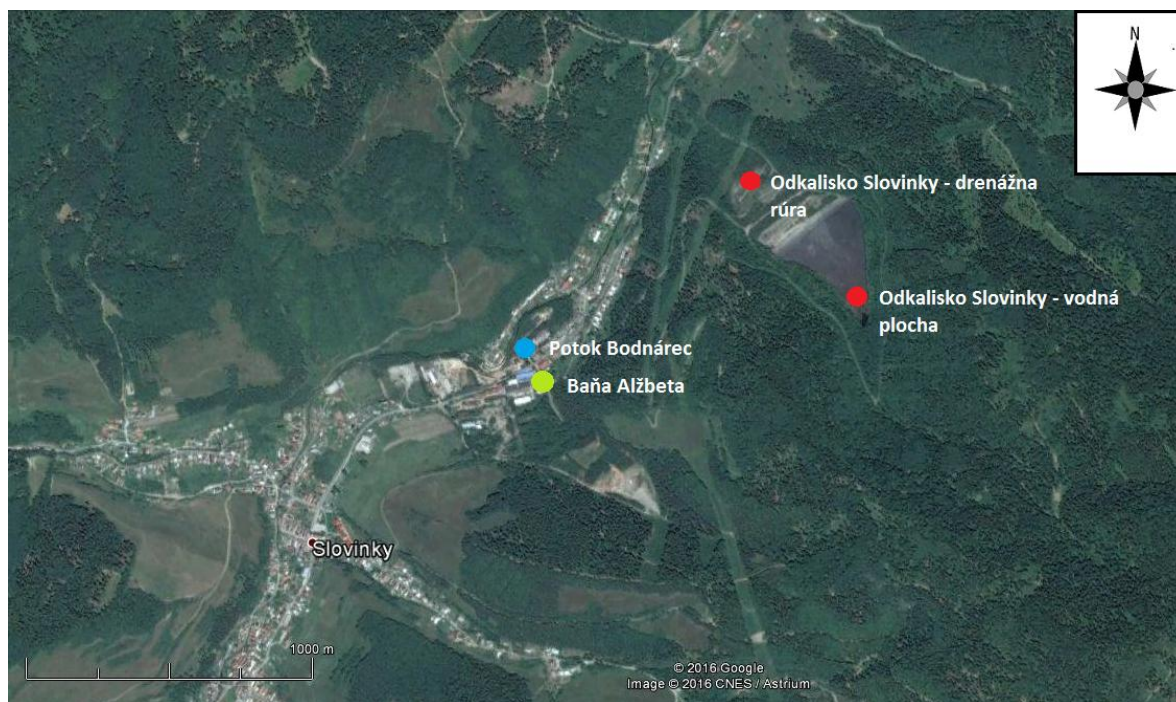
Obrázok 6: Odberové miesta na odkalisku v Rudňanoch (GOOGLE EARTH 2016)



Obrázok 7: Odberové miesta na odkalisku v Slovinkách (GOOGLE EARTH 2016)



Obrázok 8: Poloha štôľne Rochus (červená) v obci Rudňany (GOOGLE EARTH 2016)



Obrázok 9: Poloha odberových polôh v obci Sloviniky (GOOGLE EARTH 2016)

4.2 Merania fyzikálno-chemických ukazovateľov

Charakteristiky sme merali priamo v teréne a jednalo sa o teplotu, pH, množstvo rozpustených látok a konduktivitu. Merané boli pomocou mobilného prístroja Hanna Instruments HI 98129 pH/Conductivity/TDS Tester.

4.3 Určovanie mikroorganizmov

4.3.1 Mikroskopická analýza

Mikroskopická analýza dočasných preparátov pod mikroskopom s rôznym zväčšením bola vykonaná, kvôli pomoci pri identifikácii kvality a kvantity biostónu a abiosestónu. Pozorované časti vzoriek sme pozorovali upravované aj neupravované.

Úprava vzoriek pred mikroskopovaním:

Vzorky sme centrifúgovali centrifúgou značky Werk Nr. Po dobu 5 minút pri otáčkach 2500/ min. Mikroskopovanie prebehlo pomocou optického mikroskopu Olympus (BX 40.111) pri rôznom zväčšení od 100x do 1500x. Pre zachytenie a zadokumentovanie pozorovaných vzoriek sme použili program Quick Photo micro 2.2 a digitálny fotoaparát Olympus SP – 350. Identifikácia železitých baktérií prebehla podľa identifikačného kľúča uvedeného v publikácii (TÓTHOVÁ & MOŇOGOVÁ, 2001).

4.3.2 Kultiváčna analýza

Kultivácia fakultatívne heterogénnych železitých baktérií si vyžaduje použitie selektívneho živného média ktorého zloženie je (ŠVORCOVÁ, 1985):

síran amónny $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	0,5 g
dusičnan sodný (NaNO_3)	0,5 g
hydrogenfosforečnan draselný, trihydrát $(\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$	0,5 g
síran horečnatý, heptahydrát $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0,5 g
citran sodný	10,0 g
síran železnatý (FeSO_4)	3,0 g
sacharóza	2,0 g
tryptóza	1,0 g
agar	20,0 g
destilovaná voda (doplniť do)	1000 ml

Príprava: Potrebné chemikálie postupne pridávame do destilovanej vody. Rozpúšťame ich a celú zmes sterilizujeme frakčiou sterilizáciou, ktorá prebieha pri teplote 100°C . Sterilizáciu opakujeme 3 dni po sebe v 30 minútových intervaloch v prúdiacej pare (TÓTHOVÁ & MOŇOGOVÁ, 2001).

Kultivácia: Uskutočňuje sa priamym výsevom na povrch média o množstve 1 ml z odobranej vzorky do Petriho misky. Misky boli následne označené a vložené do inkubátora s termostatom nastaveným na 24°C na 3 dni. Nárasty baktérií boli následne hodnotené a boli použité na farbenie podľa Grama, alebo na vytvorenie čistých kultúr podľa predpísaného postupu (ŠVORCOVÁ 1985) použitých na identifikáciu mikroorganizmov systémom MALDI TOF Biotyper.

Gramovo farbenie

Gramovo farbenie, alebo Gramova metóda je spôsob rozdelenia baktérií na tzv. grampozitívne a gramnegatívne (G^+ a G^- baktérie). Na základe biochemických

vlastností bunkových stien sa rozdeľujú baktérie detekovaním peptidoglykánu, prítomného v hrubej bunkovej stene grampozitívnych baktérií.

Bunky baktérií sa zafarbia kryštálovou violet'ou. Po dodaní jódidu draselného sa vytvorí v obidvoch typoch buniek komplex, ktorý sa ale po dodaní etanolu vymýva len z gramnegatívnych baktérií, čím celkové zafarbenie mení sfarbenie na ružovú, alebo červenú.

Postup

- Dobre vyčistené podložné sklíčka sme vyžihali nad kahancom so zapáleným etanolom.
- Na sklíčka sme kvapli vodu do ktorej boli nanesené kolónie baktérii odobrané z povlaku na živnej pôde. Rozmiešali sme to na súvisle zafarbenú suspenziu, ktorú sme nechali na vzduchu uschnúť
- Suspenziu sme znova zahriali nad plameňom
- Po vychladnutí sme na suspenziu kvapkali farbivo - roztok kryštálovej violeti
- Podložné sklíčko sme opláchli slabým prúdom vody
- Na takto očistené podložné sklíčko sme nakvapkali Lugolov roztok a nechali pôsobiť
- Pokračovali sme preplachovaním 95% etanolom pokiaľ sa farba nevymyla a dofarbili sme safranímom a dodali kvapku imerzného oleja
- Všetky roztoky dodané medzi oplachovaním sme nechali pôsobiť 20 sekúnd
- Pozorovali sme pod mikroskopom farbu

4.3.3 Identifikácia mikroorganizmov systémom MALDI TOF Biotyper. (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight).

Metóda hmotnostnej spektrometrie s laserovou desorpciou/ionizáciou za prítomnosti matrice s prietokovým analyzátorom, ktorá využíva techniku mäkkej ionizácie.

Jedná sa o systém vysokorýchlostnej taxonomickej klasifikácie baktérií, kvasiniek a plesní. Triedenie a identifikácia sú založené na molekulových stopách proteínov používaním vysokopriepustnej MALDI–TOF hmotnostnej spektrometrie.

V porovnaní s klasickými metódami sa jedná o veľmi rýchlu a spoľahlivú metódu určovania a klasifikovania mikroorganizmov. Prístroj poskytujúci tento typ klasifikácie našiel uplatnenie v klinickej mikrobiológii, farmaceutických analýzach a aj v životnom prostredí. Princípom merania je nedeštruktívne odparovanie a ionizácia veľkých aj malých organických molekúl (www.bruker.com 2016).

Metóda vhodná pre všetky nespolorujúce mikroorganizmy u ktorých zlyhala identifikácia metódou priameho prenosu. Metóda je veľmi vhodná pre kvasinky (napr. *Candida* alebo *Saccharomyces*) (www.bruker.com 2016).

Pri klasifikácii mikroorganizmov sa jedná o determináciu nukleových kyselín a proteínov v ich bunkách. Proces pozostáva z troch častí a to: Ionizácia vzorky, kedy energia s laserového lúču uvoľní z matrice protón, ktorý sa preniesie na vzorku a dôjde k jej ionizácii a prevedení do plynného stavu. Druhou zložkou je separácia zachytených iónov hmotnostným spektrometrom podľa pomeru hmotnosti a náboja. Nakoniec sa spracované dáta – zachytené spektrá porovnávajú s databázou charakteristických vzorov kmeňov. Jedná sa o porovnanie hrubého hmotnostného spektra celej škály uvoľnených vysokomolekulových organických látok z bunkovej steny, ktoré sú charakteristické pre každý druh s referenčným zoznamom v databáze. (KARAS & KRÜGER 2003).

Výsledkami testu je skóre, ktoré vyjadruje podobnosť získaného spektra vrcholov so spektrom vrcholov v referenčnej databáze. Vyjadruje pravdepodobnosť s akou dané spektrum vrcholov bolo správne priradené ku existujúcemu druhu.

V našom prípade sme použili metódu celých buniek. Jej podstatou je odobranie celej bakteriálnej kolónie zo živného média a jej vysušenie a prekrytie matricou. Táto zmes je aplikovaná na kovovú doštičku. Takýmto spôsobom sa dá určiť rod aj druh baktérií, ktoré kolóniu tvoria. Je tu možnosť, že rovnaké druhy baktérií rastúce v rôznych podmienkach môžu vykazovať iné hmotnostné spektrá proteínov. V tomto prípade má táto metóda tú výhodu, že všetky baktérie rastú za rovnakých podmienok na rovnakom mieste a na rovnakom živnom médiu, tým sa zabezpečí štandardizácia vzorky a objektivnosť merania (HOLLAND et. al 1998).

Spracovanie a vyhodnotenie prebehlo na prístroji MALDI TOF Biotyper umiestnenom na Fakulte Prírodných vied Univerzity Mateja Bela.

Príprava testu identifikácie systému MALDI TOF Biotyper. (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight).

- Začali sme napipetovaním 300 µl destilovanej vody do Eppendorfovej skúmavky s objemom (1,5 ml)
- Z Petriho misky sme odobrali biologický materiál – čistú kultúru v množstve približne 5–10 mg (ŠVORCOVÁ, 1985). Materiál sme preniesli do Eppendorfovej skúmavky s vodou, dôkladne premiešali a nechali vortexovať 1 minútu.
- Pridali sme 900 µl etanolu a premiešali
- Vyrobenú zmes v Eppendorfovej skúmavke sme vložili do centrifúgy. Centrifúgovali sme pri otáčkach 14 000 / min po dobu 2 minút. Získali sme supernatant, ktorý sme zliali. Centrifúgovanie sme opakovali druhý krát. Ostávajúci metanol sme odstránili opatrne pipetovaním.
- Zmes sme nechali pelieť a schnúť pri teplote v laboratóriu niekoľko minút
- Pripravili sme 70% kyselinu mravčiu: napipetovali sme 300 µl destilovanej vody a 700 µl 100% kyseliny mravšej do čistej eppendorfky a vortexovali.
- 70% kyselinu mravčiu sme pridali k peletu v objeme 50 µl. Dôkladne sme premiešali vortexovaním a pipetovaním.
- Pridali sme 50 µl 100% acetonitrilu. Pridáva sa stále rovnaké množstvo ako kyseliny mravčej. Dôkladne sme premiešali.
- Množstvo 70% kyseliny mravčej a acetonitrilu pridané k peletu sme upravili podľa množstva odobraného biologického materiálu podľa tabuľky:

Množstvo materiálu	Jedna malá kolónia	Jedna veľká kolónia	Inokulačná klička 1 µl	Inokulačná klička 10 µl
Kyselina mravčia	1-5 µl	5-15 µl	10-40 µl	30-80 µl
Acetonitril	1-5 µl	5-15 µl	10-40 µl	30-80 µl

- - Centrifúgovali sme pri otáčkach 14 000./min po dobu dvoch 2 minút.
 - 1 µl supernatantu sme nakvapkali na čistú MALDI doštičku a nechali uschnúť pri lab. teplote.
 - Uschnutý supernatant sme prekryli 1 µl MALDI matrice – HCCA (alpha-cyano-4-hydroxyškoricová kyselina) a nechať uschnúť pri laboratórnej teplote
- Takto pripravenú vzorku sme vložili do prístroja

4.3.4 Kvantitatívne hodnotenie pokrývnosti nárastov bakteriálnych kolónií v zornom poli mikroskopu.

Hodnotenie je založené na určovaní množstva organizmov - biosestónu na jednotku plochy na Bürkerovej počítacej platničke s komôrkami. Vzorka sa pred určením množstva mikroorganizmov zahustila a odvodnila centrifúgovaním (TÓTHOVÁ & MOŇOGOVÁ, 2001).

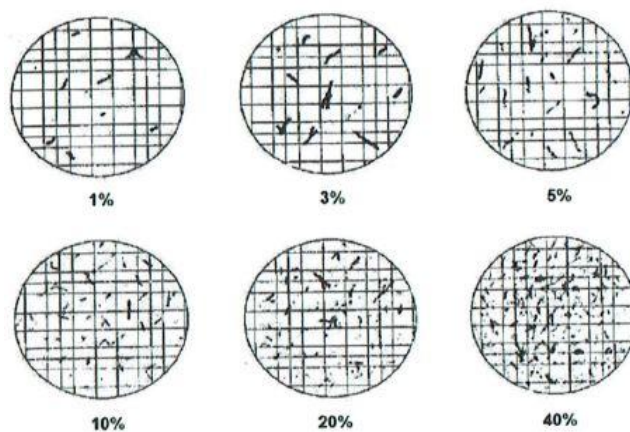
Postup pri stanovení pokrývnosti biosestónu a abiosestónu:

- Skúmavku na centrifúgovanie sme naplnili premiešanou vzorkou o množstve 10 ml. Skúmavka sa nechala po dobu 5 minút odstred'ovať v centrifúge ktorej priemer bol 8 cm. Rýchlosť otáčok bola 2000/min. Podmienky centrifúgovania sú stanovené platnou normou STN 75 7711 o biologickom rozboře a stanovení biosestónu.
- Po odstredení sa sediment prichytil na banku a vodu bolo možné odliat'. Jedná sa o koncentrovanú biomasu mikroorganizmov a abiosestónu. V skúmavke však boli ponechané zvyšky vody na preriedenie vzorky.

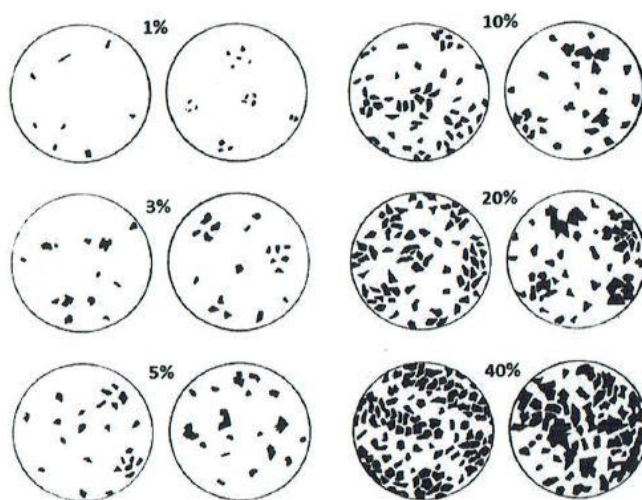
Mikropipetkou sme napipetovali kvapku tejto substancie na Bürkerovu počítaciu komôrku a zakryli sme krycím sklíčkom. Preparát bol pripravený na pozorovanie (TÓTHOVÁ & MOŇOGOVÁ 2001).

- Pripravený preparát sme pozorovali pod mikroskopom pod 100 násobnom alebo 200 násobnom zväčšení podľa toho, či sme určovali pokrývnosť, taxonomickú príslušnosť v prípade biosestónu a druh materiálu v prípade abiosestónu. Kvantifikácia prebieha porovnaním s predurčenou grafickou prílohou na obrázku (TÓTHOVÁ & MOŇOGOVÁ, 2001). Tým istým spôsobom prebiehalo určovanie aj biosestónu a aj abiosestónu.

Zmena objektívu na vyššie zväčšenie sme prepínali pri situáciách kedy bolo ťažké určiť o aký materiál sa jedná.



Obrázok 10: Odhadová stupnica na určenie pokryvnosti biosestónom v zornom poli mikroskopu (TÓTHOVÁ & MOŇOGOVÁ, 2001)



Obrázok 11: Odhadová stupnica na určenie pokryvnosti abiosestónom v zornom poli (TÓTHOVÁ & MOŇOGOVÁ, 2001)

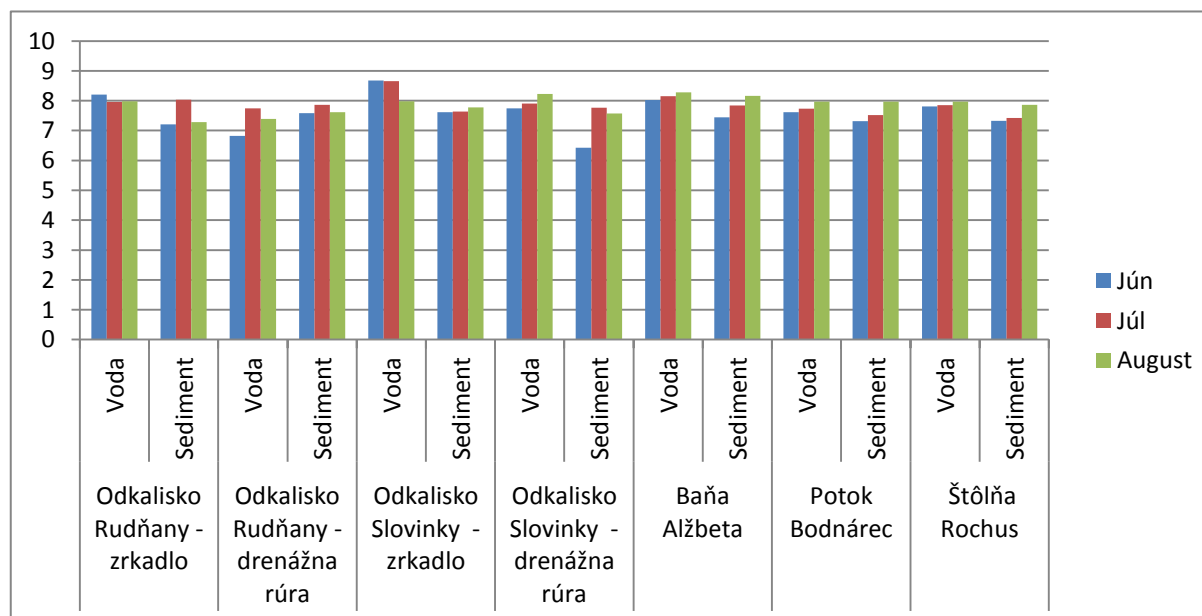
5 Výsledky

5.1 Výsledky Fyzikálno-chemických rozborov

Meranie fyzikálno-chemických parametrov bolo uskutočnené v teréne a to pri odbere vzoriek, ktoré sa konalo na siedmych lokalitách: Odkalisko Rudňany – zrkadlo; Odkalisko Rudňany - drenážna rúra; Odkalisko Slovinky - zrkadlo; Odkalisko Slovinky - drenážna rúra; Baňa Alžbeta; potok Bodnárca a štôľňa Rochus. Odber sa konal v dátumoch 20. 6 2016; 27.7.2016 a 28.8.2016 podľa STN EN ISO 5667 – 1 : 2007, STN EN ISO 5667 - 3 : 2005 a STN EN ISO 5667 – 4:1999. Boli vzorky odoberané do sterilizovaných sklenených fľašiek s objemom 250 ml do približne 2/3 ich objemu pre zabezpečenie dostatočného prísunu kyslíka.

5.1.1 Namerané hodnoty pH

Hodnoty pH nevykazovali jednoznačné súvislosti medzi substrátom vzorky (voda a sediment). Hodnoty pH sa podstatne nelíšili ani medzi lokalitami. Všetky lokality sa pohybujú v neutrálnom mierne zásaditom pH, čo hovorí o prítomnosti neutrálnych banských vôd. Badat' je pravidelné korelácie (obr. 9), medzi dátumom a hodnotou pH, čo sme ale nepotvrdili v prípade odberových lokalít odkaliska v Rudňanoch vo vode aj v sedimente.



Obrázok 12: Porovnanie odberových miest na základe nameraných hodnôt pH v mesiacoch jún (zelená), júl (červená), august (modrá) 2016 z každej zo vzoriek v poradí voda, sediment.

Najvyššia nameraná hodnota je pH 8,68 z júnovej vzorky z vrcholu odkaliska Slovinky. Vzorka bola odobraná z vodnej hladiny v zadnej časti odkaliska. Posledná augustová vzorka však má už značne zníženú hodnotu pH, čo môže súvisieť so zmenou vodného režimu, kvôli dlhšie trvajúcemu suchu a zmene miesta odberu vzorky o pár desiatok metrov kvôli zníženej vodnej hladine. Jedná sa o lokality s bohatým zastúpením toxických prvkov As, Sb, Cu, Pb, Zn. V podmienkach mierne alkalických hodnôt neexistuje pre tieto prvky zvýšená šanca mobility a preto je stav na odkaliskách z hľadiska toxicity momentálne ustálený. Najnižšia hodnota pH bola nameraná vo vzorke z odkaliska Slovinky - z vody vytekajúcej z odkaliska von. Hodnota pH 6,42 sa mierne odlišuje od ostatných nameraných hodnôt. pH na takejto hladine spôsobuje zvýšenú mobilitu prvkov len mierne. Napríklad mobilita Kadmia (Cd) je najvyššia za pH 4-5-5,5.

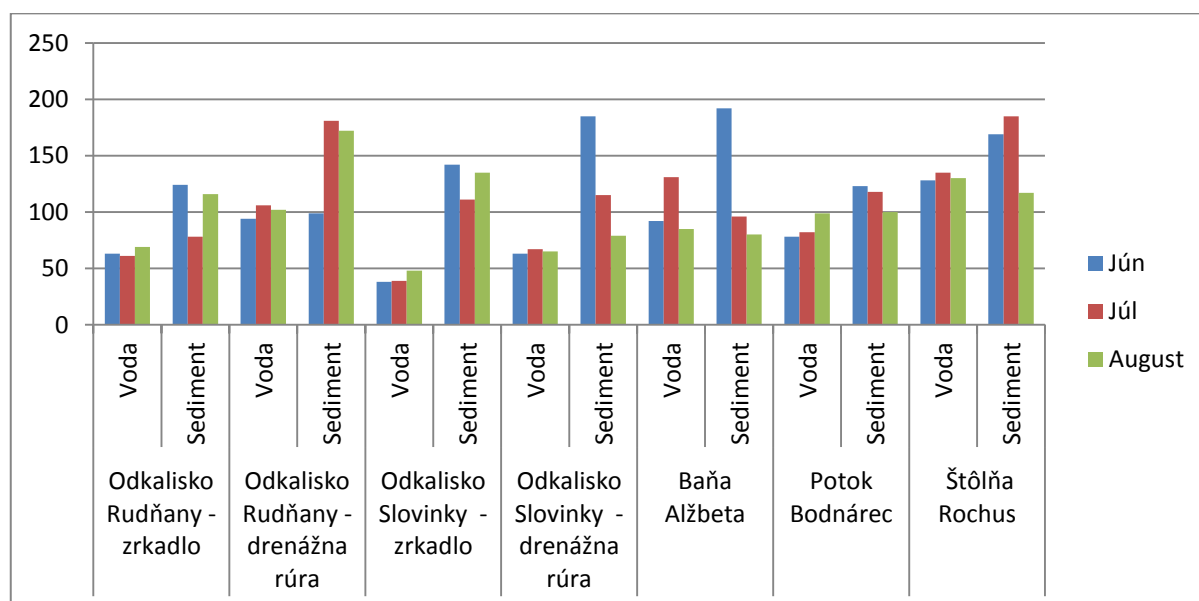
Vyzrážaný hydroxid železitý, ktorý sa ukladá do bunkových stien vláknitých baktérií a vytvára slizké okrové povlaky na dne, skalách i potrubí.



Obrázok 13: Drenážne rúry odkaliska Slovinky a štôlne Rochus s okrovými povlakmi

Vo väčšine ostatných vzoriek mala hodnota pH mierne stúpajúci trend v čase smerom od júna ku augustu. Zrejme to súvisí s vývojom biomasy flóry a fauny v okolí odberových lokalít v ročnom období, ako aj s nárastom priemerných teplôt.

5.1.2 Namerané hodnoty konduktivity v mS.m^{-1}

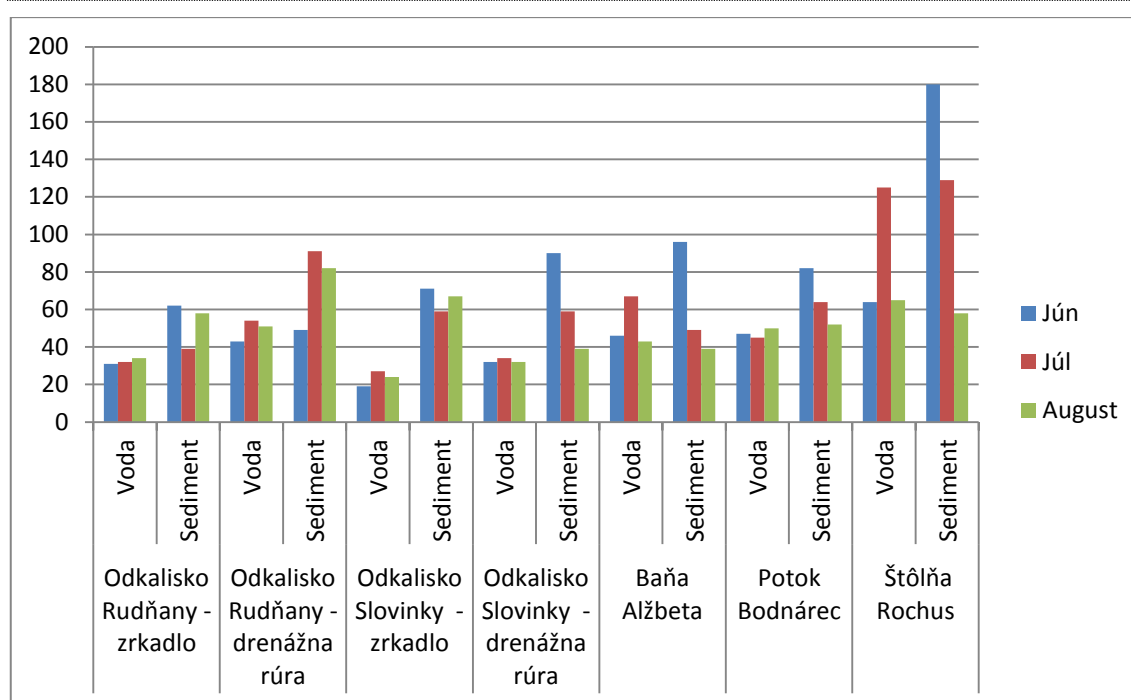


Obrázok 14: Porovnanie odberových miest na základe hodnôt konduktivity v mesiacoch jún (zelená), júl (červená), august (modrá) 2016 z každej zo vzoriek v poradí voda, sediment.

Najnižšie hodnoty konduktivity boli namerané vo vode odkaliska Slovinky. Znížené hodnoty je badať vo všetkých 3 vzorkách. Ostatné vzorky majú hodnoty mierne alebo značne zvýšené od normálu ktorý sa v pitnej vode pohybuje medzi $5\text{--}50 \text{ mS.m}^{-1}$ (www.lenntech.com 2016). Vo veľa prípadoch je celková rozpustenosť tuhých látok (total dissolved solids) prepojená a priamo úmerná k mernej elektrolytickej vodivosti (www.lenntech.com 2016). Predpokladáme, že to je dôvod prečo sú hodnoty konduktivity sedimentov z dna poväčšine vyššie. Trend vývoja hodnôt mernej elektrolytickej vodivosti v čase nie je značný a pravdepodobne viac súvisel s aktuálnou hydrologickou situáciou v okolí, napríklad so suchom alebo zrážkami, zvýšenými prietokmi, čo spôsobuje uvoľňovanie tuhých sedimentárnych látok (HORTON 1945).

5.1.3 Namerané hodnoty koncentrácie rozpustených látok v [mV]

Meranie množstva rozpustených látok – total dissolved solids (TDS) sa uskutočňovali priamo v teréne a meralo sa spolu s pH a konduktivitou. Z obrázka 11 na ktorom je graf vývoja hodnôt môžeme vyčítať, že hodnoty TDS pravidelne nekorelujú a nevykazujú žiaden stúpajúci alebo klesajúci trend v závislosti od lokality, dátumu, alebo odoberaného substrátu(voda, sediment).



Obrázok 15: Porovnanie odberových miest na základe hodnôt rozpustených látok vo vzorkách z odberových lokalít - jún (zelená), júl (červená), august (modrá) 2016 z každej zo vzoriek v poradí voda, sediment.

Z obr. 11 vyplýva, že najvyššie hodnoty TDS sa nachádzali vo vzorkách pochádzajúcich z drenážnej rúry štôľne Rochus. Konkrétne najviac rozpustených látok mal sediment z lokality, kde sa hodnota vyšplhala až na 180 mV.m^{-1} . Najnižšie hodnoty boli nameraná na odkalisko v Slovinkách a to zo vzoriek pochádzajúcich z vodnej plochy odkaliska. Vzorky zo všetkých troch odberov z tejto lokality majú najnižšie hodnoty zo všetkých odoberaných vzoriek. Medzi dôvody spôsobujúce tento jav môže byť pôsobenie vody z okolia, pretože sa jedná o miesto kde voda do odkaliska priteká. Taktiež je na lokalite badať silnú sukcesiu a prítomnosť biomasy emergentnej flóry rastúcej vo vode, ktorá môže sčasti eliminovať prípadnú toxicitu prvkov obsiahnutých vo vrchnej vrstve odkaliska.

5.2 Výsledky identifikácii mikroorganizmov systémom MALDI Biotyper. (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight).

MALDI TOF analýza na prístroji Biotyper sa vykonala na vybraných vzorkách, podľa úspešnosti kultivácie a celistvosti nárastov kolónií na médiu. Pravdepodobne z dôvodu nedodržania dostatočných aseptických podmienok sa nepodarilo zachovať

všetky vzorky v dostatočnej sterilite a opakovane podliehali nárastom kolónií plesní rodu *Penicillium* a *Aspergillus* sp.

Pri úspešnej kultivácii boli vzorky prevezené do mikrobiálneho laboratória Prírodovedeckej fakulty UMB, kde prístroj MALDI Biotyper nebol častokrát schopný identifikovať mikroorganizmy. Dôvodom bolo, že nenašiel dôveryhodné biologické stopy a vzorku označil za neidentifikovanú. alebo pri nájdení pomerne dôveryhodných molekulárnych stôp, nenašiel druh v databáze, takže išlo len o identifikáciu génovo najbližšieho druhu baktérie, ktorý za v databáze nachádzal. Metóda je vhodná pre všetky nespolorujúce mikroorganizmy u ktorých zlyhala identifikácia metódou priameho prenosu. Podľa výrobcu, (www.bruker.com 2016) je veľmi vhodná pre kvasinky (napr. *Candida* alebo *Saccharomyces*). Taktiež je vhodná na určovanie hygienicky potenciálne nebezpečných baktérií, alebo baktérií používanými pri biotechnológiách. Cieľom našej kultivácie boli ekologicky významné druhy baktérií, ktoré v spojení s kontamináciou inými druhmi, nedostatočne veľkou databázou týchto druhov a neúspešnej kultivácii nemuseli byť dostatočne identifikované.

Tabuľka 2: Tabuľka hodnotenia spoľahlivosti hodnotenia systémom MALDI TOF

Farba	Skóre	Popis
	2,300 – 3,000	Druh bol s vysokou pravdepodobnosťou identifikovaný
	2,000 – 2,299	Rod identifikovaný s istotou, druh pravdepodobne
	1,700 – 1,999	Pravdepodobná identifikácia rodu
	0,000 – 1,699	Nespoľahlivá identifikácia

V konečnom dôsledku sa podarilo identifikovať mikroorganizmy len zo 4 odberových lokalít a to z odkaliska Slovinky, odkaliska Rudňany, zo štôlne Rochus a z potoka Bodnárce.

5.2.1 Výsledky MALDI TOF analýzy – lokalita odkalisko Slovinky

Výsledky identifikácie zo vzorky odkaliska Slovinky (tab.3) systém MALDI TOF Biotyper identifikoval len s nespoľahlivo. Z uvedeného skóre je zrejmé, že sa jedná o nespoľahlivú identifikáciu, zväčša zástupcov rodu *Lactobacillus* sp, ktorý je rod Gram – pozitívnych fakultatívne anaeróbných alebo mikroaerofilných baktérií. Hrajú kľúčovú úlohu v rade Lactobacillales, baktérií schopných premieňať laktózu a iné cukry na kyselinu mliečnu. Podľa metabolizmu ich vieme rozdeliť na homofermentatívny metaolizmus – produkuje sa iba kyselina mliečna z cukrov, alebo heterofermentatívny – produkuje sa kyselina mliečna, alebo alkohol. Rod momentálne obsahuje približne 180 druhov spolu s rodom *Pediococcus* (www.bacterio.net/ 2016).

Tabuľka 3: Analýza izolátov zo vzoriek systémom MALDI TOF z odkaliska Slovinky

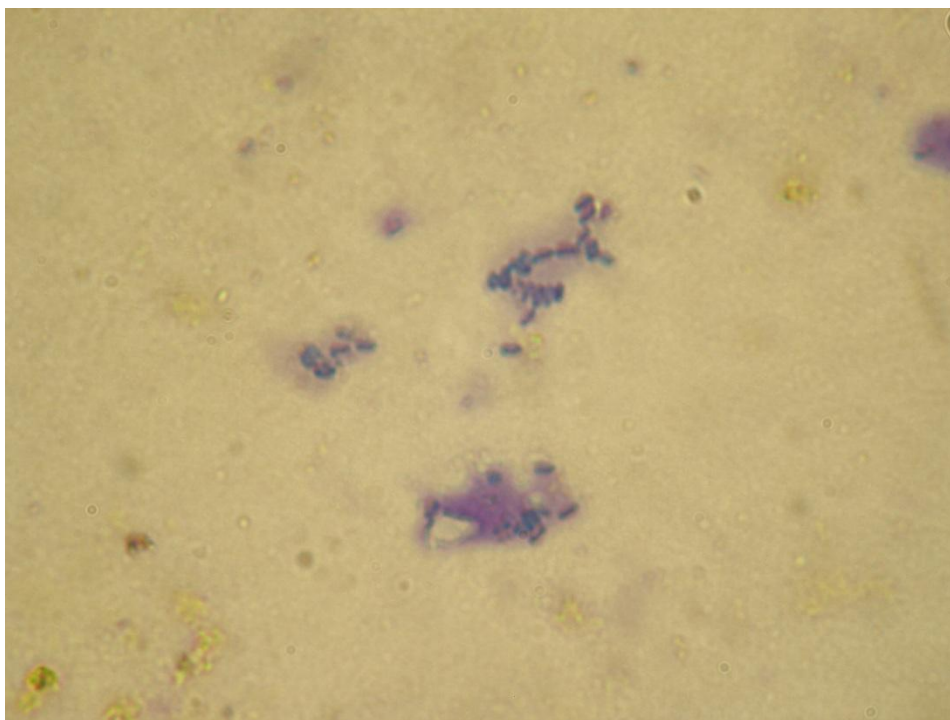
Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1	<i>Lactobacillus alimentarius</i> DSM 20249T DSM	1.584	1602
2	<i>Lactobacillus alimentarius</i> DSM 20181 DSM	1.54	1602
3	<i>Kytococcus sedentarius</i> IMET 11362T HKJ	1.332	1276
4	<i>Clostridium novyi</i> A 1025_NCTC 538 BOG	1.316	1542
5	<i>Halomonas elongata</i> B496 UFL	1.302	2746
6	<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20604 DSM	1.292	1596
7	<i>Lactobacillus perolens</i> DSM 12745 DSM	1.269	100468
8	<i>Streptococcus equi</i> ssp <i>ruminatorum</i> DSM 17037T DSM	1.257	254358
9	<i>Agromyces rhizospherae</i> HKI 302_DSM 14597T HKJ	1.252	88374
10	<i>Staphylococcus simulans</i> DSM 20324 DSM	1.224	1286

Lactobacillus gasseri je druh, vyskytujúci sa v tráviacich traktoch ľudí a zvierat s veľkou fermentačnou funkciou v organizmoch (TAILLIEZ 2004).

Do vzorky sa pravdepodobne druh dostal priamo z lokality, keďže sa jedná o otvorenú vodnú hladinu a v okolí sa vyskytuje množstvo divej zveri. Možná je však aj kontaminácia vzorky nedodrzanými dostatočnými aseptickými podmienkami.

Väčšinou sa jedná o grampozitívne rody až na identifikovaný druh *Halomonas elongata*, bičíkatý druh zvládajúci vyššiu prítomnosť solí (0-32%) v živnom médiu. Jedná sa o fakultatívne aeróbnu baktériu, ktorá ale pri prítomnosti NO₃ rastie anaeróbne za fermentácie glukózy a oxidácie sacharózy, glycerolu a celobiózy. (VREELAND et al. 1980).

Prítomnosť zväčša grampozitívnych baktérií sa podadrilo doložiť aj Gramovým farbením vzoriek čistej kultúry, použitej aj pri testoch MALDI TOF.



Obrázok 16: G+ tyčinky na agare podľa ŠVORCOVEJ 1985. Vzorka z odkaliska Slovinky-Kaligrud. Zväčšenie 1500x

5.2.2 Výsledky MALDI TOF analýzy – lokalita Odkalisko Rudňany

Analýza systémom MALDI TOF Biotyper na kultúrach vykultivovaných z odkaliska Rudňany prebehla dva krát. Systému sa v obidvoch prípadoch podarilo nespoľahlivo identifikovať niekoľko rodov a raz sa podarilo nespoľahlivo identifikovať druh.

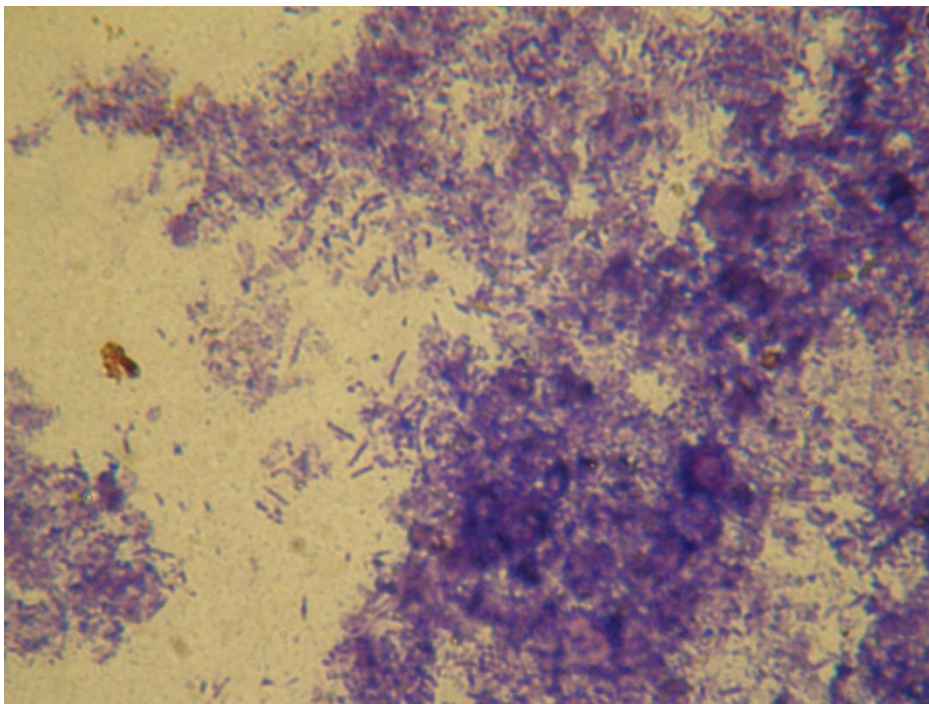
Systém MALDI TOF Biotyper identifikoval z čistej kultúry vykultivovanej z júlovej vzorky sedimentu odkaliska Rudňany 7 rodov, z toho rod *Bacillus* sp. s najväčšou pravdepodobnosťou (tab.4). Druh *Bacillus licheniformis* bol identifikovaný viacero krát, takže jeho pravdepodobnosť výskytu je vysoká. Druh je grampozitívny, mezofilný, vyhovuje mu mierne zásadité pH. Vyskytuje sa v pôde a často sa ho darí izolovať zo vtáčieho peria (EDWARD et al. 2010). Jeho výskyt je v prírodnom prostredí vysoko pravdepodobný, keďže ide o pôdny druh.

Nespoľahlivo systém identifikoval ešte viacero druhov a to napríklad *Clostridium difficile* – anaeróbna, pohyblivá grampozitívna baktéria vyskytujúca sa v pôde, ktorá sa pravdepodobne dostala do vzorky z okolia. Možnosťou je aj kontaminácia, pretože je schopný tvoriť odolné spóry a je kultivovateľný z takmer každého povrchu. Môže sa nachádzať aj v ľudskom hrobom čreve a môže sa začať chovať patogénne kvôli toxínom, ktoré produkuje (RYAN 2004).

Tabuľka 4: Analýza izolátov zo vzoriek systémom MALDI TOF z odkaliska Rudňany – sediment.
Odber 27. 7. 2015.19

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1	<i>Bacillus licheniformis</i> 992000432 LBK	1.989	1402
2	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13T DSM	1.554	1402
3	<i>Bacillus licheniformis</i> CS 54_1 BRB	1.43	1402
4	<i>Clostridium difficile</i> MB_1562_05 THL	1.381	1496
5	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	1.338	1352
6	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> DSM 10667T DSM	1.234	60520
7	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> DSM 12111T HAM	1.217	53406
8	<i>Bacillus massiliensis</i> 1I12072947_1e MVD	1.215	292806
9	<i>Listeria seeligeri</i> DSM 20751T DSM	1.211	1640
10	<i>Weissella viridescens</i> DSM 20410T DSM	1.204	1629

Systém identifikoval najmä G+ rody (tab. 4). Jedine rod *Pseudomonas* sp. je gramnegatívny. Test Gramovým farbením výskyt zväčša grampozitívnych baktérií potvrdil (obr.17).



Obrázok 17: G+ tyčinky na agare podľa ŠVORCOVEJ 1985. Vzorka sedimentu odkaliska Rudňany z dňa 27. 7. 2015. Zväčšenie 1500 x

V poradí nasledujúci test MALDI TOF Biotyper dopadol podľa skóre pri identifikácii menej úspešne s neistou identifikáciou jedného rodu – *Pseudomonas* sp. (tab.4). Jedná sa o nespoľahlivú identifikáciu z dôvodu dodania nečistej kultúry alebo nepoužitia čerstvého biologického materiálu. Jedná sa o izolát zo vzorky sedimentu odkaliska Rudňany, odobranej dňa 28.8.2015. Rod gramnegatívnych aeróbných proteobaktérii s veľkou metabolickou diverzitou a schopnosťou osídliť široké spektrum prostredí. Rod obsahuje 191 druhov, zväčša bičíkatých, valcovitého tvaru. Niektoré sú schopné sporulácie (MIGULA 1984).

Tabuľka 5: Analýza izolátov zo vzoriek systémom MALDI TOF z odkaliska Rudňany zo vzorky odobranej 28. 8. 2015

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1	<i>Pseudomonas orientalis</i> CIP 105540T HAM	1.608	76758
2	<i>Pseudomonas abietaniphila</i> CIP 106708T HAM	1.576	89065
3	<i>Pseudomonas caricapapayae</i> LMG 2152T HAM	1.557	46678
4	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> DSM 13227T HAM	1.548	86264
5	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ssp <i>aurantiaca</i> CIP 106718T HAM	1.543	86192
6	<i>Pseudomonas brenneri</i> CIP 106646T HAM	1.521	129817
7	<i>Pseudomonas veronii</i> B560 UFL	1.508	76761
8	<i>Pseudomonas gessardii</i> CIP 105469T HAM	1.502	78544
9	<i>Pseudomonas koreensis</i> 037_W01 NFI	1.468	198620
10	<i>Pseudomonas koreensis</i> LMG 21318T HAM	1.45	198620

Z nespoľahlivo identifikovaného rodu *Pseudomonas* sp. systém vyhodnotil hmotnostným spektrom najbližšie druhy k druhom vo vzorke.

Pseudomonas orientalis – Druh izolovaný z minerálnych prameňov v Libanone. Jedná sa o baktérie valcovitého tvaru (DABBOUSSI 1999).

Pseudomonas brenneri – pohyblivá, bičíkatá, fluorescentná baktéria izolovaná z minerálnych prameňov vo Francúzku. V poradí ďalšími identifikovanými baktériami sú *Pseudomonas veronii* a *Pseudomonas gessardii*. Sú taktiež pohyblivé, fluorescentné baktérie izolované z minerálnych vôd vo Francúzku (BAIDA et al. 2001).

5.2.3 Výsledky MALDI TOF analýzy – štôľňa Rochus

Analýza MALDI TOF prebehla na kultúre vzorky na živnom médiu zo vzorky sedimentu v tesnej blízkosti drenážnej rúry zo štôľne Rochus odobranej dňa 27.7.2015.

Tabuľka 6: Analýza izolátov zo vzoriek systémom MALDI TOF zo štôlne Rochus

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1	<i>Staphylococcus capitis</i> Mb18717_1 CHB	1.428	29388
2	<i>Lactobacillus paracasei ssp tolerans</i> DSM 20012 DSM	1.34	113557
3	<i>Staphylococcus cohnii ssp cohnii</i> DSM 20260T DSM	1.316	74704
4	<i>Enterococcus faecium</i> VRE_PX_16086218 MLD	1.309	1352
5	<i>Clostridium haemolyticum</i> 1069_ATCC 9650T BOG	1.295	84025
6	<i>Pseudomonas pictorum</i> LMG 981T HAM	1.233	86184
7	<i>Morganella morganii</i> 9544_1 CHB	1.203	582
8	<i>Burkholderia plantarii</i> DSM 9509T HAM	1.177	41899
9	<i>Hafnia alvei</i> 20740_1 CHB	1.172	569
10	<i>Vibrio vulnificus</i> DSM 10143T HAM	1.161	672

Z výsledkov MALDI TOF (tab.5) môžeme vidieť, že test identifikoval viacero rodov, z toho všetky nespoľahlivo. Systém identifikoval grampozitívna (*Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Clostridium* sp.) aj gramnegatívne rody baktérií. Pravdepodobná identifikácia rodov ako sú *Staphylococcus capitis*, *Lactobacillus paracasei*, *Staphylococcus cohnii ssp cohnii*, *Clostridium haemolyticum*, *Morganella morganii* pravdepodobne súvisí s kontamináciou vzorky, keďže sa jedná o baktérie žijúce na ľudskej koži alebo v tráviacom ústrojenstve. Taktiež môže ísť aj o fekálne znečistenie vody Rudnianskeho potoka, ktorá sa miešala s odberovou vodou v mieste odberu.

5.2.4 Výsledky MALDI TOF analýzy potok Bodnárec

Analyzovaná bola kultúra vykultivovaná na živnom médiu zo vzorky sedimentu potoka Bodnárec odobranej dňa 27. 7. 2015 podľa práce (ŠVORCOVÁ 1985)

Tabuľka 7: Analýza izolátov zo vzoriek systémom MALDI TOF zo štôlne Rochus

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1	<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20010 DSM	1.409	28038
2	<i>Microbacterium liquefaciens</i> HKI 11374 HKJ	1.406	33918
3	<i>Lactobacillus paracasei ssp tolerans</i> DSM 20012 DSM	1.395	113557
4	<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20019T DSM	1.378	28038
5	<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 700324 THL	1.366	571
6	<i>Lactobacillus kefir</i> DSM 20485 DSM	1.353	33962
7	<i>Lactobacillus mali</i> DSM 20444T DSM	1.321	1618
8	<i>Corynebacterium auris</i> DSM 44122T DSM	1.305	44750
9	<i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i> CCM 5792T CCM	1.301	574
10	<i>Lactobacillus curvatus</i> DSM 20499 DSM	1.298	28038

Z výsledkov MALDI TOF vyplýva (tab. 7), že najviac identifikovaným rodom je rod *Lactobacillus* sp. Z druhým najvyšším skóre bol nájdený druh *Microbacterium liquefaciens*. Druhy grampozitívnych baktérii z rodu *Microbacterium*, špeciálne *Microbacterium oxydans* a *Microbacterium liquefaciens* sú schopné tolerovať vysoké koncentráciu Niklu (Ni) a Vanádu (V) v prostredí. Touto vlastnosťou sa môžu preukázať ako biologická alternatíva pre likvidáciu nebezpečných odpadov s vysokým obsahom týchto kovov. Inhibičná koncentrácia kovov pre tieto druhy sa nachádza na hranici približne 0,2% pre Nikel a Vanád. Pri prítomnosti týchto baktérii sa preukázalo odstraňovanie týchto prvkov v množstve 26 – 84% pre Ni a 20,3 – 60% pre Vanád (RAMÍREZ et al., 2015).

5.3 Vyhodnotenie kvantitatívneho hodnotenia pokryvnosti nárastov bakteriálnych kolónií v zornom poli mikroskopu.

K vyhodnoteniu sme použili vzorky v poradí z posledného – augustového odberu vzoriek.

Upravené vzorky podľa postupu uvedenom na str. 38-39 sme pozorovali na Burkerovej komôrke. Postup bol prevedený podľa normy STN 75 7711. Pozorovanie sa previedlo na vzorkách sedimentov odobraných pri poslednom odbere a to 28. 8. 2015.

Tabuľka 8: Kvantitatívne pokryvnosti biosestónu a abiosestónu na Bürkerovej komôrke

Lokality	Priemery pokryvnosti [%]	
	abiosestón	biosestón
Štôlna Rochus	2,0625	1,375
Štôlna Alžbeta	11,625	24,3125
Odkalisko Rudňany hore	16,875	20
Odkalisko Rudňany dole	25,3125	6,75
Odkalisko Slovinky hore	23,75	28,75
Odkalisko Slovinky dole	28,4375	28,75
Potok Bodnárce	20,625	17,8125

Najmenej pokryvnosti abiosestónu aj biosestónu bol vo vzorkách sedimentov zo štôlne Rochus (tab. 7). Najväčšie kvantitatívne zastúpenie oboch zložiek pochádza zo sedimentu drenážnej rúry odkaliska Slovinky.

5.4 Výsledky analýzy mikroskopickým pozorovaním

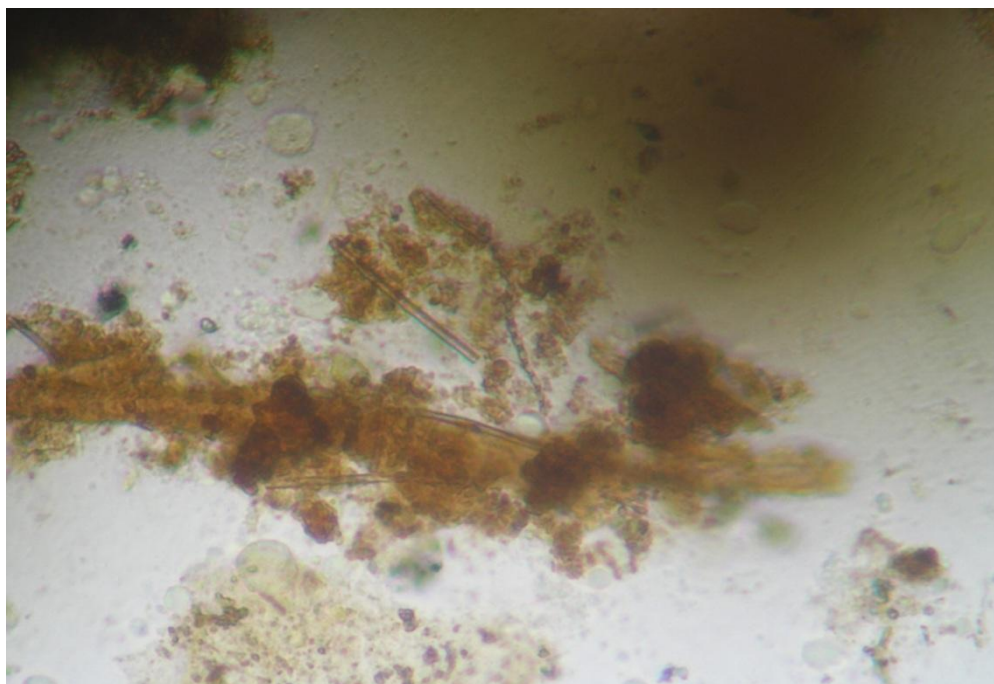
Homogenizované vzorky boli pozorované pod mikroskopom pri rôznom zväčšení kvôli vizuálnej identifikácii baktérií rodov *Gallionella* sp a *Leptothrix* sp.

Tabuľka 9: Prítomnosť rodov *Gallionella* sp. a *Leptothrix* sp. na skúmaných lokalitách

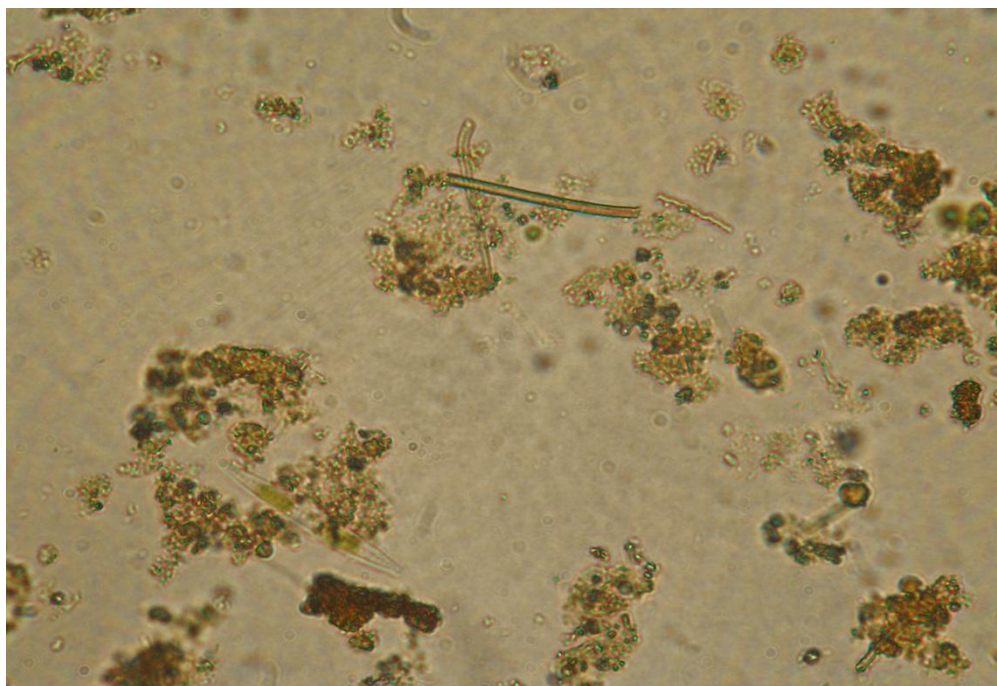
Lokality	Rody		
	Substrát	<i>Gallionella</i> sp.	<i>Leptothrix</i> sp.
Odkalisko Rudňany - zrkadlo	Voda	+	+
	Sediment	+	+
Odkalisko Rudňany - drenážna rúra	Voda	+	+
	Sediment	+	+
Odkalisko Slovinky - zrkadlo	Voda	+	+
	Sediment	+	+
Odkalisko Slovinky - drenážna rúra	Voda	+	+

Baňa Alžbeta	Sediment	+	+
	Voda	+	+
Potok Bodnár	Sediment	+	+
	Voda	+	+
Štôlna Rochus	Sediment	+	+
	Voda	+	+
	Sediment	+	+

Skúmané rody železitých baktérií boli napokon nájdené vo všetkých skúmaných lokalitách (tab.9).



Obrázok 18: *Leptothrix* sp. a *Gallionella* sp. vo vzorke z drenážnej rúry odkaliska Slovinky pri zväčšení 40x15.



Obrázok 19: *Leptothrix* sp.. vo vzorke z drenážnej rúry odkaliska Slovinky pri zväčšení 40x15.6

6 Diskusia

Environmentálne problémy spojené s baníctvom sú úzko späté s environmentálnymi problémami spojenými s vodami. Počas dlhej histórie baníctva na našom území človek po sebe zanechal mnoho technických diel, ktoré sa spájajú s výskytom tzv. banských vôd. Mineralizované vody sa vyskytujú v prírodnom prostredí aj bez zásahu človeka. Dôvodom je špecifické minerálne zloženie horninových podloží. V prípade, ak vznikajú biologicko–chemickým rozkladom pyritu za účinku litotrofných baktérií, hovoríme o vzniku kyslých horninových vôd – „acid rock drainage“ (ARD). V prípade, že sa tieto vody nachádzajú v miestach kde sa nachádza veľa bázických a usadených hornín (vápencov, dolomitov) s neutrálnou alebo zásaditou reakciou, prostredie ma dostatok autoregulačných mechanizmov a vznikajú neutrálne horninové vody alebo (neutral rock drainage) – NRD. Vznik banských kyslých alebo neutrálnych vôd je spojený potom len so zásahom človeka do prirodzeného procesu horninovej hydrologie a to budovaním technických banských zariadení, premiestňovaním materiálu a odhaľovanie horninových podloží pri ťažbe. Environmentálne problémy potom súvisia s miešaním banských vôd s povrchovými vodami. Súvisí to s priemyselným spracovaním záujmových hornín, vznik hald a odkalísk, kedy sa minerály a horniny obsiahnuté v rude preiestnia na povrch a dostanú sa do styku s atmosférou a zrážkami a celý proces tvorby NRD alebo ARD sa začne na povrchu. Taktiež tvorba týchto vôd prebieha aj vo vytŕažených opustených priestoroch baní, ktoré sa po rokoch nečinnosti zatápajú a kontaminované vody začnú vytekať na povrch. V prípade ak nemá okolité prostredie dostatok pufrčných a autoregulačných schopností, vody sa začnú vplyvom geochemických a biochemických procesov reťazovo meniť na kyslé banské vody – acid mine drainage. Táto situácia je veľmi nepriaznivá, kvôli vzniku toxicity ťažkých kovov, ktoré su v takom prostredí často prítomné.

V našom prípade prebehli merania fyzikálnych ukazovateľov pH, Ec a množstvo rozpustených látok.

Hodnoty pH nepreukázali prítomnosť kyslých banských vôd. Dôvodom pravdepodobne je zvýšený výskyt bázických sedimentárnych usadenín, ktoré tvoria vápence, dolomity prítomné v rámci geologickej skupiny silicikum a paleologickými usadeninami Hornádu, ktoré taktiež tvoria horniny tvoriace zásaditú reakciu s okolím. (MELLO, 2000). Vody zjavne obsahujú zvýšenú koncentráciu iónov železa, mangánu

a medi, ktoré sú buď rozpustené vo vode, alebo viazané v sulfidických mineráloch a horninách. Rozpustené kovy vo vode dávajú predpoklad pre vznik špecifickej flóry, ktorá sa dá dokladovať nálezmi oranžových a hnedastých povlakov na dne vodných tokov (obr.5 a 13). Jedná sa zväčša o vyzrážané hydroxidy kovov, ktoré sú výsledkom metabolizmu železitých a mangánových baktérií. (NEWMAN 2008, KONHAUSER et al., 2011). Týmto môžeme konštatovať, že sa jedná o neutrálne banské vody.

Hodnoty pH, namerané pri výskume sa pohybovali na všetkých lokalitách v rozmedzí od pH 6,42 zo vzorky odobranej na odkalisku v Slovinkách z drenážnej rúry, po pH 8,68 na vrchu odkaliska v Slovinkách, zo vzorky odobranej z vody. Môžeme konštatovať, že pH všetkých lokalít sa teda pohyboval v neutrálnej až zásaditej rovine. Voda na vrchu odkaliska Slovinky si držala najvyššie hodnoty pH. Najvyššia a najnižšia hodnota pH pritom pochádza z toho istého dátumu odberu, kedy najnižšie pH bolo namerané v drenážnej rúre. Pravdepodobne to súvisí s rozdielnym hydrologickým režimom na vrchu odkaliska a drenážnej rúry odkaliska. Vo vrchnej časti odkaliska sa nachádza prítok vody z okolitých oblastí. Minerálne zloženie a jemnozerný materiál, ktorý táto voda donáša počas zrážok môže alkalicky ovplyvňovať vodu na odkalisku.

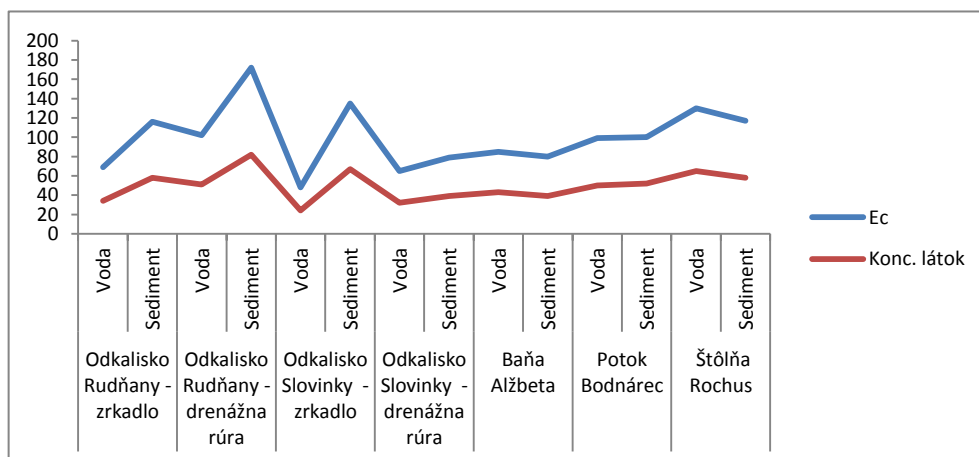
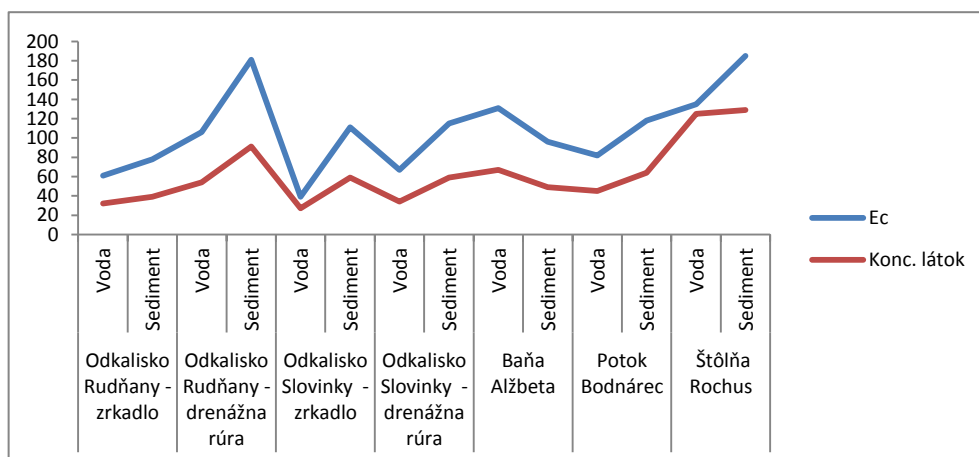
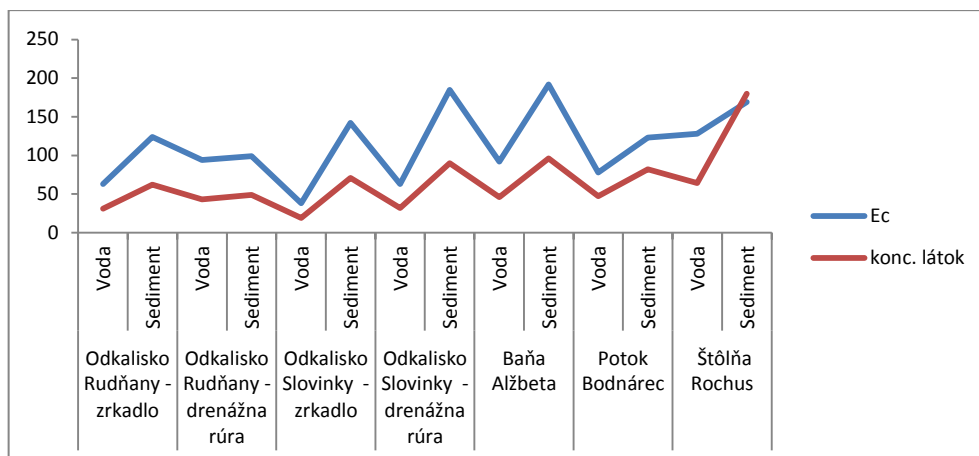
Prekvapujúca je hodnota pH drenážnej vody štôlne Alžbeta, v ktorej je popísaný výskyt baktérií rodu *Acidithiobacillus* (LUPTÁKOVÁ et al.2012). Podľa práce je vyplýva, že rod baktérií *Acidithiobacillus* nebol striktne viazaný na extrémne kyslé vody s obsahom sulfidických minerálov. V našom prípade však ide o pH zásadité čo výskyt týchto baktérií absolútne vylučuje (COLMER & HINKLE 1947). Pravdepodobne od výskumu (LUPTÁKOVÁ et al.2012) v roku 2010 došlo ku zmenám pH v drenážnej rúre od pH 5,2 ku maximu pH 8,28 nameranom v auguste 2015. Presné dôvody tejto zmeny známe nie sú. Pri vyústení do drenáže haldy Bodnárec sú prítomné aj nárasty vláknitých rias, preto je možná kontaminácia drenážnej rúry odpadovými vodami z okolia (Obr. 5). Možné je aj vyústenie fekálnych vôd do drenážnej rúry. V oboch prípadoch by sa však jednalo o podstatnú zmenu vo fyzikálno-chemickom zložení.

Horné časti odkalísk Slovinky a Rudňany, štôľnu Alžbeta a štôľnu Rochus máme možnosť porovnať s výsledkami hodnôt pH vody v minulosti. Odkalisko Slovinky vykazuje rastúci trend hodnôt pH. V tab. 8 sú údaje z výskumov z roku 2013 (TÓTH et al 2013), a údaje z roku 2008, 2009, 2010, 2011 (VLČKO 2012). Vidíme, že hodnoty majú stúpajúci trend, čo je vzhľadom na chemické zloženie odkaliska prospešné.

**Tabuľka 10: Porovnanie hodnôt pH vody s predošlých rokov (VLČKO 2012) , (TÓTH et al 2013)
(KUČMOVÁ 2015)**

Rok	2 008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Odk. Slovinky	6,7	6,8	6,9	6,8		8,15		8,43
Odk Rudňany						6,7	6,5	8,05
Rochus						6,9	6,78	7,97
Alžbeta			5,2					8,15

Hodnoty elektrickej konduktivity a celkového množstva rozpustených látok nevykazovali žiadne jednoznačné súvislosti medzi lokalitami alebo dátumom odberu. Jedná sa o charakteristiky, ktoré sú veľmi rýchlo ovplyvnené hydrologickou situáciou a počasím. Merania preukazujú, že konduktivita je stále vyššia. V našom prípade sa priemery hodnoty konduktivity všetkých odberov pohybujú okolo hodnoty 107 mS.m^{-1} . Pri zachovaní vzťahu medzi hodnotami konduktivitou a celkovým množstvom rozpustených látok, môžeme konštatovať, že sa jedná o horninové alebo banské vody. Z nameraných hodnôt je badať závislosť medzi konduktivitou a celkovým množstvom rozpustených látok čo môžeme pozorovať na grafoch na obr. 20.



Obrázok 20: Závislosť Ec od koncentrácie rozpustených látok. Usporiadanie grafov je podľa dátumu odberu vzoriek – Jún, Júl, August

Mikroskopickými pozorovaniami sa nám podarilo potvrdiť hypotézu, že by sa mali vo vzorkách nachádzať neutrofilné, aeróbne, železité rody baktérií ako *Gallionella* sp. a *Leptothrix* sp. Systémom na identifikáciu mikroorganizmov podľa hmotnostných spektier sa nám však tieto rody nepodarilo potvrdiť..

System MALDI-TOF analýzy hmotnostnej spektrometrie zväčša označil identifikáciu rodov mikroorganizmov v analytoch vzoriek za nespôľahlivú, no napriek tomu z referenčnej databázy poskytoval spektrometricky najpodobnejšie druhy baktérií. System zväčša identifikoval hygienicky významné baktériám napr. rodu *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp. *Streptococcus* sp. a iné, no nepravdepodobne určil aj viacero druhov mikroorganizmov, ktoré boli izolované práve z miest s vysokým obsahom ťažkých kovov (Ni a V) a to v prípade *Microbacterium oxydans* a *Microbacterium liquefaciens* (RAMÍREZ et al. 2015). Tento rod baktérií systém identifikoval v potoku Bodnárec, obtekajúci odkalisko Bodnárec a haldu Bodnárec, ktoré sú podľa ŠOTTNÍKA (2002) najbohatšie na množstvo Cu a Fe. Nepravdepodobne identifikované boli aj druhy *Pseudomonas brenneri*, *Pseudomonas veronii* a *Pseudomonas gessardii* izolované z minerálnych prameňov vo Francúzku. Boli nájdené vo vzorke sedimentu odkaliska Rudňany. VLČKO (2014) uvádza, že rod *Pseudomonas* sp. a *Azobacter* sp. sa taktiež kultivoval na selektívnom médiu podľa ŠVORCOVEJ (1985).

7 Záver

Práca bola zameraná na problematiku banských vôd vybraných území v oblastiach obcí Rudňany a Slovinky. Environmentálne problémy spojené s baníctvom sú na Slovensku rozšírená téma, kvôli množstvu banských záťaží po celom území Slovenska.

Vzhľadom na špecifickosť týchto antropicky narušených lokalít sa tu nachádza aj zaujímavá mikroflóra, vyskytujúca sa len v silne mineralizovaných vodách. V našom prípade sa jednalo o neutrálne vody ovplyvnené banskou činnosťou. Skúmanými lokalitami boli dve odkaliská (Rudňany a Slovinky-Kaligrud) – kde boli podrobené výskumu voda a sediment z vodnej plochy odkaliska – tzv. zrkadla a drenážnej vody odkaliska. Ďalšími sledovanými lokalitami boli štôlne Rochus a Alžbeta, kde sa jednalo o drenážne vody a potok Bodnárca, ktorý odvádza drenážne vody starého odkaliska Bodnárca a haldy Bodnárca.

Ako sme predpokladali, neutrálnym banským vodám odpovedali aj fyzikálno-chemické charakteristiky. V porovnaní s inými prácami pH hodnoty pozvoľne stúpajú. Hodnoty namerané pri tomto výskume sú v rozmedzí od pH 6,42 po pH 8,68. Predpoklad o prítomnosti neutrálnych banských vôd bol teda potvrdený.

Prítomnosť baktérií *Gallionella* sp. a *Leptothrix* sp. sa potvrdil len vizuálne a to mikroskopovaním.

Vybrané vzorky boli podrobené taktiež identifikácii systémom MALDI TOF Biotyper – identifikácii podľa bakteriálnych molekulových stôp. Po niekoľkých neúspešných pokusoch identifikácie sa podarilo nespoľahlivo identifikovať niektoré rody. Pre lokalitu odkalisko Slovinky sa podarilo zo vzorky sedimentu identifikovať rody ako *Lactobacillus* sp. a *Bacillus* sp. Z kultúry zo sedimentu vzorky odkaliska Rudňany boli nespoľahlivo identifikované druhy rodu *Pseudomonas* sp. a to *Pseudomonas veronii* a *Pseudomonas gessardii*, ktoré sa vyznačujú výskytom v mineralizovaných vodách (BAIDA et al., 2001). V kultúrach zo sedimentu štôlne Rochus boli nespoľahlivo identifikované druhy rodu *Staphylococcus* sp a *Lactobacillus* sp. Identifikované druhy neboli zväčša charakteristické pre tento typ vôd. Z kultúry zo sedimentu potoka Bodnárca boli zase nespoľahlivo identifikované rody ako *Lactobacillus* sp. Ďalšie identifikované druhy z lokality a to *Microbacterium oxydans* a *Microbacterium liquefaciens* sa nachádzajú v miestach so zvýšenou koncentráciou Nikla a Vanádu (RAMÍREZ et al., 2015).

Použitá literatura

- ANDERSON, C. R., PEDERSEN. K. 2003. In situ growth of Gallionella biofilms and partitioning of lanthanides and actinides between biological material and ferric oxyhydroxides. Geobiology. Blackwell Publishing Ltd. 169-178 pp.
- ANDREWS, S., NORTON, I., ARVINDKUMAR S., SALUNKHE, A. S., GOODLUCK, H., WAFAA S. M., MOURAD-AGHA, H., CORNELIS, P. 2013. "Chapter 7, Control of Iron Metabolism in Bacteria". In Banci, Lucia (Ed.). Metallomics and the Cell. Metal Ions in Life Sciences 12. Springer.
- BAIDA, N., YAZOURH, A., SINGER, E., IZARD, D. 2001. *Pseudomonas brenneri* sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters. Res. Microbiol. (2001) 152:493-502.
- COLMER, A. R., TEMPLE, K. L., HINKLE, M. E. 1950. An Iron – oxidizing bacterium from the drainage of some bituminous coal mines. J Bacteriol 59
- COLMER, A. R., HINKLE M. R., 1947. The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. Science 106:253–256.
- CULLIMORE, D. R., MCCANN, A. 1978. The Identification, Cultivation and Control of Iron Bacteria in Ground Water, Aquatic Microbiology, Editors Skinner & Shewan Academic Press, Canada, 32 pp.
- DABBOUSSI, F., HAMZA, M., ELOMARI, M., VERHILLE, S., BAIDA, N., IZARD, D., LECLERC, H. 1999. Taxonomic study of bacteria isolated from Lebanese spring waters: proposal for *Pseudomonas cedrella* sp. nov. and *P. orientalis* sp. nov. Laboratoire de bactériologie-hygiène, Faculté de médecine Henri-Warembourg, Lille, France.
- DETRAIT, M., D'HONDT, L., ANDRÉ, M., LONCHAY, C., HOLEMANS, X., MATON, J.P., CANON, J.L. 2008. Agrobacterium radiobacter bacteremia in oncologic and geriatric patients: presentation of two cases and review of the literature, International Journal of Infectious Diseases, 12, 6, p.7 - 10, ISSN 1201-9712,
- DIEN, B., COTTA, M., JEFFRIES, T. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. Appl Microbiol Biotechnol 63 (3) p.: 258–66. Dostupné na internete: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-003-1444-y>

- DRUSCHEL, G. K., BAKER, B. J., GIHRING, T. M., BANFIEL, J. F. 2004: Acid mine drainage biogeochemistry at Iron mountain , California. *Geochemical Transaction*. 5 (2): 546 – 562. IN: ŠLAUKOVÁ. E., MICHÁLKOVÁ. E., MÁŠA, B., WELWARD, L. 2011. *Chemolitotrofná acidofilná mikroflóra banských vôd a jej využitie*. Slovenská Lesnícka A Drevárska Knižnica. 1. vyd, Janka Čižmárová-Partner, Poniky, 174 p. ISBN: 9788089183784
- EDWARD H., BURTT, A., MAX R., LAUREN A., SMITH, B., JENNA E., SROKA, E., KEVIN J., MCGRAW, V. 2010. Colourful parrot feathers resist bacterial degradation. *Biology Letters, The Royal Society*. October 2010 DOI: 10.1098/rsbl.2010.0716.
- ELRICH, H. L, NEWMAN, D. K. 2008. Geomicrobiology of iron. In *Geomicrobiology*, 5th edition. London: CRC Press, 2008, p. 345 – 428.
- FACKLAM, R. 2002. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Streptococcus Laboratory, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia. Clinical Microbiology Reviews*. Dostupné na internete: <http://cmr.asm.org/content/15/4/613.long>
- FERNANDEZ, E., BLUME, V., GARRIDO, P., COLLINS, M. D., MATEOS, A., DOMINGUEZ, L., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F. 2004. *Streptococcus equi* subsp. *ruminantium* subsp. nov., isolated from mastitis in small ruminants. *Journal of Syst. Evol. Microbiol.* 54:2291-2296.
- GIRARDIN H., ALBAGNAC C., DARGAIGNARATZ C., NGUYEN-THE C., CARLIN F 2002. Antimicrobial activity of foodborne *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. against *Clostridium botulinum*. *J Food Prot* 2002, 65:806-813.
- HALLBECK, L., PEDERSEN, K. 1990. Culture parameters regulating stal formations and growth rate of *Gallinolea Ferruginea*. *J Gen Microbiol* 136.
- HALLBERG, K. B. 2010. New perspectives in acid mine drainage microbiology. *Hydrometallurgy*. 18th International Biohydrometallurgy Symposium, IBS2009, Bariloche-Argentina, 13-17 September 2009. 104. pp. 448–453
- HASSELBARTH, U., LUDEMANN, D. 1972: Biological incrustation of wells due to mass development of iron and manganese bacteria. *Water treatment and Examination* 21, p. 20-29.
- HOLLAND R. D., WILKES J. G., RAFII, F., SUTHERLAND J. B., PERSONS C. C., VOORHEES K. J., LAY J. O. 1996. Jr Rapid identification of intact whole bacteria based on

spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*; p. 14:911–917.

HORTON, R. 1945. Erosional development of streams and their drainage basins: Hydrological approach to quantitative geomorphology, *Bull. Geol. Soc. Am.* 56:275-330

<http://www.lenntech.com/applications/ultrapure/conductivity/water-conductivity.htm>
[Dostupné 24. 4. 2016]

<https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-biotyper/overview.html> [Dostupné 29. 4. 2016]

JURADO, V., GROTH, I., GONZALEZ, J. M., LAIZ, L., SCHUETZE, B., SAIZ-JIMENEZ, C. 2005. *Agromyces italicus* sp. nov., *Agromyces humatus* sp. nov. and *Agromyces lapidis* sp. nov., isolated from Roman catacombs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55:871-875. Dostupné na internete:

<http://digital.csic.es/bitstream/10261/58182/1/Agromyces%20italicus%20sp.%20nov.,%20Agromyces%20humatus%20sp.%20nov..pdf>

KATZNELSON, H. 1955. *Bacillus apiarius*, n. Sp., an aerobic spore-forming organism isolated from honeybee larvae. Bacteriology Division, Science Service, Department of Agriculture, Ottawa, Canada. Dostupné na internete: <http://jb.asm.org/content/70/6/635.full.pdf>

KARAS, M, KRÜGER, R. 2003. Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chemical Reviews* 103 (2): 427–440. doi:10.1021/cr010376a. ISSN 0009-2665.

KLIMKO, T., DIRNER, V., ANDRÁŠ, P. 2012. Tvorba acidifikácie v prostredí banského odpadu a možnosti jej eliminácie. *Environmagazín*. vol. 17, no.4, p. 28-30.

KONHAUSER, K.O., KAPPLER, A. K., RODEN, E. E. 2011. The microbial role in iron redox and biomineralisation reactions. In *Elements*. 2011. Dostupné na internete:

- http://www.geo.unituebingen.de/fileadmin/website/arbeitsbereich/zag/geomikrobiologie/downloads/2011_Konhauser_etal_Elements.pdf
- KOMAGATA, K., IIZUKA, H. 1964. New species of *Brevibacterium* isolated from rice." J. Agric. Chem. Soc. Jpn. (1964) 38:496-502.
- KONTOPOULOS, A. 1998: Acid mine drainage kontrol. In: Castro, S. H., Vegara, F., Sánchez, M. A. (Eds.): Effluent treatment in the mining industry, University of Concepción – Chile, p. 57-118.
- KROKUSOVÁ, J., ČECH, V. 2007. Transformácia banskej krajiny na príklade obce Rudňany. In Zborník z konferencie Česká geografie v evropském prostoru. České Budejovice: Jihočeská univerzita. 1105 – 1111.
- KROKUSOVÁ, J. 2007. Likvidácia starej environmentálnej záťaže na príklade odkaliska Markušovce. In: Zborník z medzinárodného vedeckého seminára - Staré environmentálne záťaže a prístupy manažmentu k ich riešeniu. Nitra: SPU Nitra. ISBN 978-80-8069-4, s. 87 – 90.
- KUŠNIEROVÁ, M., FEČKO, P. 2001. Minerálne biotechnológie I. v ťažbe a úprave sulfidických ložísk. VŠB – TU Ostrava, 143 p.
- KWON, S. W., KIM, J. S., PARK, I. C., YOON, S. H., PARK, D. H., LIM, C. K., GO, S. J. 2003. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53:21-27.
- LUPTÁKOVÁ, A., KUŠNIEROVÁ, M., PRAŠČÁKOVÁ, M. 2008. Prítomnosť baktérií rodu *acidithiobacillus* v sulfidických ložiskách na slovensku. Konferencia, Moderné trendy v spracúvaní druhotných zdrojov neželezných kovov. 5.s. Ústav geotechniky SAV.
- LUPTÁKOVÁ, A., KUŠNIEROVÁ, M., KOTULIČOVÁ, I. 2012 Occurrence of *Acidithiobacillus Ferrooxidans* Bacteria in Sulfide Mineral Deposits of Slovak Republic. Institute of Geotechnics, Slovak Academy of Sciences. Chemical Engineering Transactions.28, 31-36.
- MAZÚR, E., LUKNIŠ, M. 1986. Geomorfologické členenie SSR. 1:500 000. 1. vyd. Bratislava: Slovenská kartografia.
- MCLEMORE, V. 2008. Basics of Metal mining influcled water. Denver, USA: SME, 2008. 103 p.

- MELLO, J. et al. 2000: Geologická mapa Slovenského raja, Galmusu a Hornádskej kotliny (1 : 50 000). Bratislava : Vydavateľstvo Dionýza Štúra, 2000.
- MIGULA, W. 1894. Über ein neues System der Bakterien. Arb Bakteriolog Inst Karlsruhe 1: 235–328.
- NORDSTROM, D. K., ALPERS C. N. 1999 Geochemistry of acid mine waters. In: PLUMLEE G. S., LOGSDON M. J. (eds) The Environmental Geochemistry of Mineral Deposits. Rev Econ Geol, vol 6A. Soc Econ Geol, pp 133-160
- PITTER P. 1999: Anorganické látky vo vodách, In: Hydrochemie, Vydavatelství VŠCHT Praha, 1993, 3. Prepracované vydání, 568pp
- PITTER, P. 1990: Hydrochemie. SNTL Praha, 565 s
- RAMÍREZ, G., ÁLVAREZ, L., AVILÉS, T., ROMERO, F., AVELIZAPA, R. 2015. Microbacterium oxydans and Microbacterium liquefaciens: a biological alternative for the treatment of Ni-V-containing wastes. Department of Biotechnology , Research Center in Applied Science and Advanced Technology of the National Polytechnic Institute. , Querétaro, Mexico. Dostupné na internete: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25837562>
- RUŽIČKA, J. 1999. Mikrobiologie pro technology životního prostředí. Brno: Vysoké Učení Technické, 1999 124p.
- RYAN, K., RAY, C. G. (editors). 2004. Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. pp. 322–4.
- SASAKI, Y., TAKIKAWA, N., KOJIMA, A., NORIMATSU, M., SUZUKI, S., TAMURA, Y. 2001. Phylogenetic positions of Clostridium novyi and Clostridium haemolyticum based on 16S rDNA sequences. National Veterinary Assay Laboratory. Tokyo, Japan Dostupné na internete: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-51-3-901>
- SCHARER, J. M., PETTIT, C. M., KIRKALDY, J. L., BOLDUC, L., HALBERT, B. E., CHAMBERS, D. B. 2000. Leaching of metals from sulphide mines wastes at neutral pH. In: ICARD 2000 Proc from the Fifth Intl Conf on Acid Rock Drainage, vol 1. Society for Mining, Metallurgy, and Exploration, Inc, pp 191-201

- SHEVENELL, L., CONNORS, K. A., HENRY, C. D. 1999. Controls on pit water quality at sixteen open-pit mines in Nevada. *Appl Geochem* (14): 963-987
- ŠOTTNÍK, P. 2002. Haldy produktov úpravy nerastných surovín Slovinky a Rudňany. Bratislava, Prírodovedcká fakulta Univerzity Komenského (online). Dostupné na internete: <http://www.banskeodpady.sk>
- ŠVORCOVÁ, L. 1985. Kultivace a stanovení železitých a manganových baktérií ve vodách. In *Zborník: Mikrobiológia vody*, Bratislava VUVH, 1985, p. 48-55.
- TÓTHOVÁ, L., MOGONOVÁ, E. 2000. Železité a mangánové baktérie. *Hydrobiológia pre prax* (ed.).- VÚVH Bratislava: 74 pp.
- THOMPSON, R. J., HAMILTON, R. H., POOTJES, C. H. 1979. Purification and Isolation of Agrocin 84. *Antimicrob Agents Chemother.*; US library of Medicine National Institute of Health. 16(3): 293–296. Dostupné na internete: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC352848/?page=1>
- TÓTH, R., HILLER, E., PETRÁK, M., JURKOVIČ, Ľ., ŠOTTNÍK, P., VOZÁR, J., PEŤKOVÁ, K. 2013. Odkaliská Markušovce a Slovinky - aplikácia metodického postupu na hodnotenie odkaliskových sedimentov pochádzajúcich z úpravy rúd na modelových odkaliskách. *Mineralia Slovaca*, 45 (2013), 125 – 130.
- VIDAVER, A. K., LAMBRECHT, P. A. 2004. Bacteria as plant pathogens. The Plant Health Instructor. Department of Plant Pathology, University of Nebraska, Lincoln, NE. Dostupné na internete: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/bacteria.aspx>
- VREELAN, R. H., LITCHFIELD, C. D., MARTIN, E. L., ELLIOT, E., 1980. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. Department of Microbiology and the Center for Coastal and Environmental Studies, Rutgers- The State University, New Brunswick, New Jersey. *J. Syst. Bacteriol.* 30., p485-495.
- Zákon č. 44/1988 Zb. Zákona o ochrane a využití nerastného bohatstva (banský zákon) a v znení neskorších predpisov