

# Bioloužení těžkých kovů z kontaminovaných půd

Natálie Hanáková

---

Bakalářská práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Ing. Bc. Natálie Hanáková  
Osobní číslo: T21765  
Studijní program: B0711A130009 Materiály a technologie  
Specializace: Ochrana životního prostředí  
Forma studia: Kombinovaná  
Téma práce: Bioloužení těžkých kovů z kontaminovaných půd

## Zásady pro vypracování

- Provedte literární rešerši o možnosti bioloužení pomocí vybraných bakterií
- Provedte optimalizaci bioloužení pomocí vybraného typu bakterií a porovnejte s klasickou metodou extrakce
- Optimalizujte měření na přístroji atomové absorpční spektrometrie pro vybrané prvky
- Naměřená data logicky zpracujte a kriticky zhodnotte

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

1. RAWLINGS, Douglas E., ed. *Biomining* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1997 [cit. 2021-04-09]. ISBN 978-3-662-06113-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-662-06111-4
2. BOSECKER, Klaus. *Bioleaching: metal solubilization by microorganisms*. FEMS Microbiology Reviews [online]. 1997, 20(3-4), 591-604 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.1997.tb00340.x
3. CSUROS, Maria a Csaba CSUROS. *Environmental Sampling and Analysis for Metals*. Boca Raton: Lewis Publishers, 2002. ISBN 1-56670-572-x.
4. SANZ-MEDEL, Alfredo a Rosario PEREIRO. *Atomic Absorption Spectrometry: An introduction*. 2nd edition. New York: Momentum Press, 2014. ISBN 978-1-60650-435-2
5. Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Štěpán Vinter, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2024**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 6. února 2024

**Příloha č. 2 – Prohlášení autorky BP**

**PROHLÁŠENÍ AUTORKY  
BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užit své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

**Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....  
podpis studentky

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se zabývá problematikou bioloužení těžkých kovů z půd kontaminovaných vojenskou municí za pomoci heterotrofních bakterií *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Na základě literární rešerše v oblasti bioloužení kovů pomocí acidofilních bakterií a zpracovaného experimentu práce potvrzuje závěry publikovaných studií, že bioloužení představuje účinnou, environmentálně šetrnou a ekonomicky příznivou metodu odstraňování kovů z kontaminovaných půd. Práce přináší výsledek v podobě seřazení vybraných těžkých kovů z hlediska účinnosti jejich solubilizace bioloužením v pořadí Ni > Cd > Cu > Cr > Pb.

Klíčová slova: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, bioloužení, kontaminovaná půda, těžké kovy

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis deals with the bioleaching of heavy metals from soils contaminated with military ammunition using the heterotrophic bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. The thesis confirms the published studies' conclusions representing bioleaching as an effective, environmentally friendly, and cost-effective method of metal removal from contaminated soil. Based on the literature research and the experiment performed in the field of metal bioleaching using acidophilic bacteria, the thesis presents the order of selected heavy metals Ni > Cd > Cu > Cr > Pb sorted by their solubilization efficiency in bioleaching.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, bioleaching, contaminated soil, heavy metals

Děkuji svému vedoucímu závěrečné práce panu Ing. Štěpánu Vinterovi, Ph.D. za jeho nadstandardní přístup ke studentu, vytváření příjemných pracovních podmínek, podporu, a především za jeho volný čas, který byl ochoten věnovat nad rámec svých pracovních povinností.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

ÚVOD.....	9
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
<b>1 PŮDA: ZNEČIŠTĚNÍ A SANACE.....</b>	<b>11</b>
1.1 VYBRANÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY .....	11
1.1.1 pH.....	11
1.1.2 Kationtová výměnná kapacita .....	12
1.2 ZDROJE ZNEČIŠTĚNÍ.....	12
1.2.1 Doly a metalurgické závody.....	12
1.2.2 Opuštěné skládky nebezpečného odpadu a brownfieldy.....	12
1.2.3 Jednotky pro nakládání s pevným odpadem a skladovací zařízení.....	13
1.2.4 Odpadní vody z domácností.....	14
1.2.5 Vojenské prostory .....	14
1.3 TECHNOLOGIE SANACE A REMEDIACE .....	14
1.3.1 Chemické a fyzikálně-chemické technologie.....	15
1.3.2 Biologické technologie.....	15
1.3.3 Biochemické technologie .....	16
1.4 DÍLČÍ ZÁVĚR.....	17
<b>2 TĚŽKÉ KOVY .....</b>	<b>18</b>
2.1 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH TĚŽKÝCH KOVŮ .....	18
2.2 OSUD V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ.....	19
2.2.1 Hydrolýza.....	19
2.2.2 Oxidace a redukce .....	20
2.3 INTERFÁZOVÝ CHEMICKÝ TRANSPORT.....	20
2.3.1 Solubilizace, srážení a rozpouštění .....	20
2.3.2 Sorpce a desorpce.....	21
2.4 VÝSKYT TĚŽKÝCH KOVŮ .....	21
2.5 INSTRUMENTÁLNÍ ANALÝZA.....	21
2.5.1 Atomová absorpční spektrometrie .....	21
2.5.2 Plamenová atomová absorpční spektrometrie.....	22
2.5.3 Emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem .....	22
2.5.4 UV/VIS spektrofotometrie .....	22
2.5.5 Rentgenová fluorescenční spektrometrie .....	22
2.6 DÍLČÍ ZÁVĚR.....	23
<b>3 BILOUŽENÍ .....</b>	<b>24</b>
3.1 MIKROBIOLOGIE.....	24
3.2 ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS .....	24
3.2.1 Kultivace .....	25
3.2.2 Mechanismus bioloužení.....	26

3.3	DÍLČÍ ZÁVĚR.....	27
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>29</b>
4.1	POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE .....	29
4.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	29
4.3	MÍSTO A ODBĚR VZORKŮ.....	30
4.3.1	Místo odběru .....	30
4.3.2	Plán a schéma vzorkování .....	33
4.4	STANOVENÍ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH CHARAKTERISTIK .....	35
4.4.1	Stanovení pH .....	35
4.4.2	Stanovení konduktivity .....	37
4.4.3	Stanovení sušiny.....	37
4.4.4	Stanovení oxidovatelného uhlíku .....	38
4.4.5	Stanovení výměnných kationtů .....	38
4.4.6	Stanovení kationtové výměnné kapacity .....	40
4.4.7	Stanovení obsahu kovů.....	41
4.5	BILOUŽENÍ .....	41
4.5.1	Médium .....	41
4.5.2	Kultivace bakterií .....	41
4.5.3	Měření pH a ORP .....	42
4.5.4	Měření železitých iontů .....	42
4.5.5	Počítání bakterií.....	43
4.5.6	Loužení pomocí <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	43
4.6	CHEMICKÉ LOUŽENÍ .....	44
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>45</b>
5.1	CHARAKTERISTIKA PŮD.....	45
5.2	DYNAMICKÉ ZMĚNY PH A OXIDAČNĚ REDUKČNÍHO POTENCIÁLU.....	47
5.3	KONCENTRACE ŽELEZITÝCH IONTŮ V PRŮBĚHU KULTIVACE .....	49
5.4	RŮSTOVÁ KŘIVKA BAKTERIÍ.....	50
5.5	LOUŽENÍ KOVŮ POMOCÍ <i>ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS</i> .....	53
5.6	LOUŽENÍ KOVŮ CHEMICKOU CESTOU.....	55
5.7	POROVNÁNÍ BILOUŽENÍ S KLASICKOU METODOU EXTRAKCE.....	56
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>62</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>71</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>74</b>



## ÚVOD

Industrializace 19. století s sebou přinesla nebývalý společenský, průmyslový a ekonomický rozkvět. Nová, globální společnost na jedné straně vytvořila novou, rostoucí ekonomiku, na druhé straně její extenzivní antropogenní činnost s postupem času přinesla doposud nevídané důsledky mající vliv na stav životního prostředí.

Tato situace je dobře patrná na příkladu zemědělství, jehož přerod urychlený vědeckým pokrokem v oblasti chemie a průmyslových hnojiv vedl k rozsáhlé produkci plodin. Vyšší produkce se stala motorem rychlé urbanizace a multiplikátorem společenského rozvoje. Ačkoli se tyto důsledky mohou jevit jako čistě pozitivní, nadměrný rozsah používání průmyslových hnojiv si vyžádal daň v podobě silného zamoření zemědělských a přilehlých půd.

Používání průmyslových hnojiv, a zejména takových, u nichž nebyly známy dlouhodobé účinky na živé organismy, představují pouze malou část z důsledků, které lze nazývat negativními aspekty technologického rozvoje. Mezi další příklady je možné zařadit zamoření půd a sedimentů v důlních oblastech, průmyslových provozech či kontaminaci půd v důsledku vojenské činnosti. S ohledem na probíhající konflikt na Ukrajině se poslední zmíněný příklad jeví jako nanejvýš aktuální.

Hledání vhodných metod sanace a remediace znečištěných půd je i přes množství provedených studií stále předmětem vědeckého zkoumání. Zaměření se na aplikaci mikrobiologických procesů za cílem odstraňování těžkých kovů je v posledních dvou desetiletích stále více rozebíraným tématem. Nejenom, že mikroorganismy jsou schopné podílet se na imobilizaci těžkých kovů a radionuklidů, velkou výhodou sehrává nákladová efektivita biologických metod, a především ekologičnost jejich použití.

Závěrečná práce se zabývá problematikou bioloužení těžkých kovů z kontaminovaných půd. Jelikož probíhající konflikt na území Ukrajiny s sebou přináší neustále se zvětšující území zamořené organickými polutanty a těžkými kovy z vojenské munice a zničené techniky, byla pro účely experimentální části vybrána půda, která přišla do styku s vojenskou municí a považuje se za kontaminovanou těžkými kovy.

Na základě zpracované rešerše si práce klade za cíl v praktické části provést bioloužení kontaminované půdy pomocí bakterií *Acidithiobacillus ferrooxidans* a na základě získaných výsledků provést porovnání s klasickou (chemickou) metodou extrakce a závěry formulovat v kontextu výsledků publikovaných vědeckých studií.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 PŮDA: ZNEČIŠTĚNÍ A SANACE

Půda představuje přímý i nepřímý zdroj až 95 % produkce potravin a plní tak životně důležitou funkci nejenom pro člověka, ale celou společnost [1]. Dochází-li k jejímu znehodnocování, důsledky mohou při nejhorším scénáři dosahovat až globálního charakteru.

Ochrana půdy spolu se správně nastaveným právním aparátem sehrávají klíčovou roli při preventivním řešení případné kontaminace. Ačkoli současná česká a evropská environmentální legislativa je na velmi dobré úrovni, důsledky předešlých historických prohřešků na poli životního prostředí přechovávají své následky až do současnosti. Nejenom tato dědictví, ale také neekologické chování průmyslových oblastí Číny a Jižní Koreje či důsledky války na Ukrajině představují nebývalou environmentální zátěž, kterou je zapotřebí efektivně a ohleduplně řešit.

Kapitola se zabývá problematikou kontaminace půd především těžkými kovy. Rozebírá možné zdroje znečištění, vybrané chemické charakteristiky a možnosti sanace a remediacce.

### 1.1 Vybrané chemické charakteristiky

Chemické vlastnosti půd a probíhající geochemické procesy sehrávají klíčovou roli v procesu distribuce těžkých kovů v krajině. Pokud se tyto procesy liší, je odlišná také samotná distribuce těžkých kovů mezi půdami a půdními podložími i v téže oblasti [2]. Distribuce kovů v krajině by tak měla být analyzována s ohledem na geologii, geomorfologii a hydrologii, jež ovlivňují mobilitu kovů v dané oblasti [2–4]. Mezi půdní charakteristiky, mající přímý vliv na chování těžkých kovů v půdě, se řadí: edafické vlastnosti půdy, kationtová výměnná kapacita (KVK), pH, obsah celkové organické hmoty, obsah makroživin a typ půd. Kromě toho mají na mobilitu kovů vliv fyzikální faktory, jako je pórovitost, struktura, skutečná a objemová hustota či teplota [5].

#### 1.1.1 pH

Hodnota pH představuje parametr, který lze použít k odhadu mobility prvků v půdě a k měření úrovně jejich toxicity a kontaminace [6], neboť významně ovlivňuje rozpustnost, biologickou dostupnost a translokaci těžkých kovů [7–8]. Na základě výsledků studie [6] testující závislost mobility kovů na pH půdy lze konstatovat, že při nízkém pH se mobilita těžkých kovů v půdě zvyšuje a současně studie [7] dodává, že při vyšším pH se zvyšuje jejich biologická dostupnost.

### 1.1.2 Kationtová výměnná kapacita

Kationtová výměnná kapacita představuje měřítko schopnosti půdy zadržovat kationty na základě elektrostatické přitažlivosti. Těžké kovy jsou v půdách přítomny zpravidla v podobě kationtů a jsou přitahovány negativně nabitými částicemi na povrch jílovitých a organických látek. Vyšší KVK tak souvisí s větší schopností navazovat kationtové kovy a snížit jejich biologickou dostupnost [9].

## 1.2 Zdroje znečištění

Dochází-li k akumulaci v sedimentech, půdě, vodě, vodních organismech, jsou těžké kovy nebezpečné kvůli jejich perzistenci a toxicitě. Těžké kovy obsažené v půdě se mohou prostřednictvím pěstovaných plodin dostat do potravního řetězce (biokoncentrovat) a následně bioakumulovat [10].

Zdroje znečištění a jednotlivé příklady znečišťujících látek jsou popsány na základě míst kontaminace: (1) doly a metalurgické závody, (2) opuštěné skládky nebezpečného odpadu a brownfieldy, (3) jednotky pro nakládání s pevným odpadem a skladovací zařízení, (4) odpadní vody z domácností a (5) vojenské prostory.

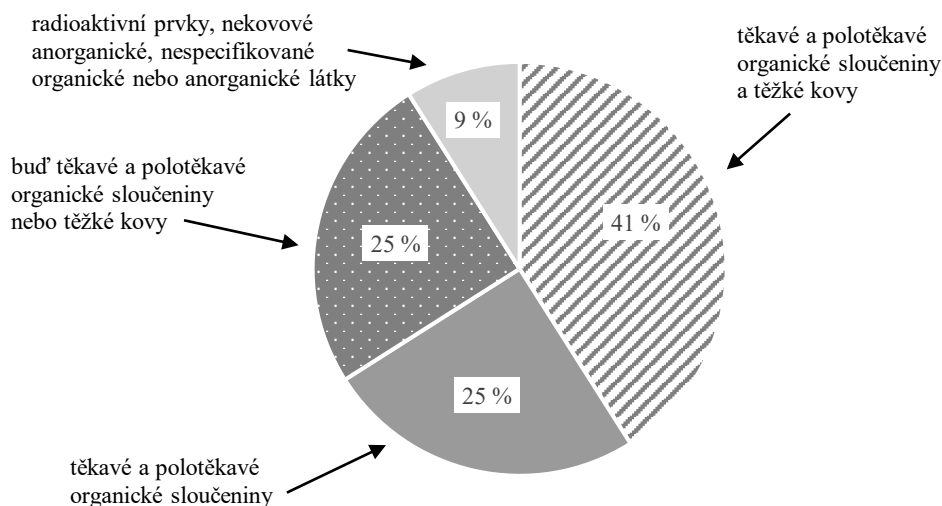
### 1.2.1 Doly a metalurgické závody

Těžba a zpracování rud i přes moderní postupy představují ekologickou zátěž. Mezi taková poškození životního prostředí patří narušení stanovišť, tvorba půdní eroze, znečištění vod a kontaminace přilehlých oblastí. Povrchová těžba produkuje až 8× více odpadu než těžba podpovrchová. Významné znečištění ovzduší způsobuje arsen, selen, olovo, kadmium a oxidy síry [11].

### 1.2.2 Opuštěné skládky nebezpečného odpadu a brownfieldy

Na sanaci opuštěných skládek je každoročně v USA vynakládáno okolo 1,09 – 1,25 miliard dolarů. I přesto tato suma stále není dostatečná [12].

Brownfieldy představují opuštěné lokality, kde skutečný či údajný problém s kontaminací brání komerčnímu využití. Na území USA se odhaduje na 450 000 brownfieldů, 362 000 v Německu, 200 000 ve Francii a přibližně 100 v České republice [13]. Z hlediska znečištění podle statistik amerického Seznamu národních priorit (z angl. *National Priorities List*, NPL) tyto opuštěné prostory zpravidla obsahují skupiny látek, jež jsou uvedeny na obr. 1.



**Obr. 1** Hlavní skupiny znečišťujících látek [14]

Jednotlivé kontaminanty se liší podle původního určení opuštěného prostoru: prádelny (těkavé organické sloučeniny a rozpouštědla), nemocnice (formaldehyd, radionuklidy, rozpouštědla a rtuť), galvanostegické podniky (kadmium, chrom, kyanidy, měď a nikl), kožedělné podniky (benzen a toluen), ropné rafinerie (benzen, toluen, ethylbenzen, xylen, pohonné hmoty, maziva a ropné uhlovodíky), dřevařské závody (pentachlorfenol, kreosot, arsen, měď, polychlorované bifenily, polyaromatické uhlovodíky) a skládky baterií (olovo, kadmium, kyseliny). Mezi nejvýznamnější brownfieldy se v Evropě řadí prostory bývalých důlních, dřevařských, papírenských a kovozpracujících průmyslů [14].

### 1.2.3 Jednotky pro nakládání s pevným odpadem a skladovací zařízení

Mezi další významné zdroje znečištění se řadí jednotky pro nakládání s pevným odpadem, které byly využívány ke zpracování, skladování nebo odstraňování pevného odpadu. Tato zařízení zahrnují skladovací nádrže, skládky odpadů, drenážní systémy a jednotky pro zpracování odpadů [14].

Mezi 10 největších zdrojů znečištění půd a podzemních vod v rámci těchto jednotek patří: chrom (47 %), benzen (30 %), dichlormethan (23 %), arsen (20 %), olovo (20 %), tetrachlorethen (18 %), trichlorethen (17 %), naftalen (14 %), 1,1,2-trichlorethan (11 %) a toluen (10 %) [14–16].

Skladovací zařízení zahrnují nádrže na topný olej pro domácnosti, septiky, potrubí a nádrže s topným olejem pro vytápění komerčních a průmyslových zařízení. Úniky látek z těchto zařízení jsou zpravidla důsledkem únavy materiálů a jejich stárnutí (většina z nich je starších

25 let). Samotné látky skladované v daných zařízení tak představují kontaminanty, dostanou-li se do okolního prostoru. Jedná se zpravidla o benzín (62 %), naftu (20 %), použitý olej (3 %), petrolej (3 %), topný olej (3 %) a nebezpečný materiál (3 %) [14, 17].

#### **1.2.4 Odpadní vody z domácností**

Odpadní vody z domácností obsahují velké množství stopových kovů jako odpadních produktů metabolismu či koroze vodovodního potrubí, a to zejména mědi, olova, zinku a kadmia. Tyto odpadní vody rovněž obsahují kovy z používaných detergentů, a to železa, manganu, chromu, niklu, kobaltu, zinku, boru a arsenu [11].

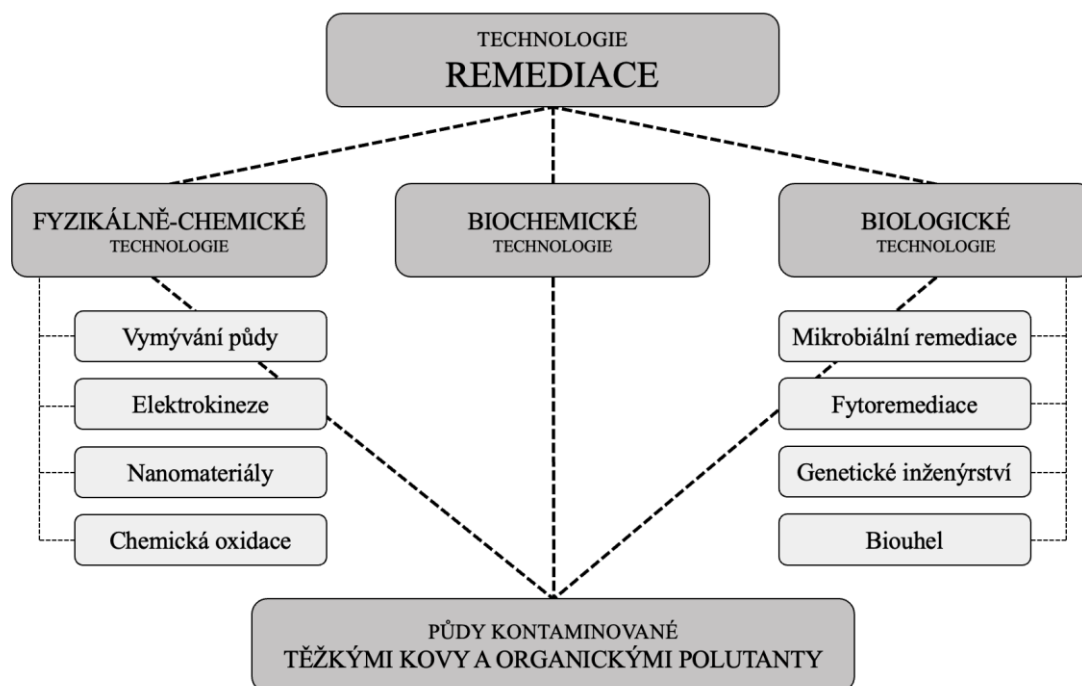
#### **1.2.5 Vojenské prostory**

Data z roku 1996 amerického ministerstva obrany uvádí procentuální část lokalit v jeho gesci, které bylo zapotřebí v návaznosti na vojenskou činnosti sanovat: spodní vody ze 71 %, půdu ze 67 %, povrchovou vodu z 19 % a sedimenty ze 6 % [14]. Mezi nejvíce znečištěná místa patří pozemní a podzemní skladovací nádrže, oblast úkapů (zpravidla pod vojenskou technikou), skládky a plochy pro nakládání s odpady, skladovací prostory, střelnice a cvičiště ostrého trháání [14].

Hlavní zdroje znečištění představují těkavé a polotěkavé organické sloučeniny, těžké kovy, výbušné slože (TNT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, RDX a HMX), pohonné hmoty a radioaktivní kovy. Tyto kontaminanty se nachází zpravidla v oblastech muničních závodů, testovacích zařízení a cvičištích trhacích prací [14].

### **1.3 Technologie sanace a remediace**

Mezi technologie sanace a remediace půd kontaminovaných těžkými kovy se využívají fyzikálně-chemické, biochemické a biologické technologie. Výčet nejvyužívanějších technologií dle [18] shrnuje obr. 2.



Obr. 2 Technologie remediace půd kontaminovaných těžkými kovy [18]

### 1.3.1 Chemické a fyzikálně-chemické technologie

Z chemických metod se mezi dva hlavní způsoby remediace kontaminovaných půd a sedimentů dle [19, 20], řadí stabilizace a extrakce. Fyzikálně-chemické technologie, mezi které se řadí např. vymývání půd, elektrokinetické remediace, využití oxidačních procesů či remediace s pomocí nanomateriálů, však mohou poškozovat půdní ekosystém, a to kvůli změnám hodnot pH, vlhkosti a oxidačně redukčního potenciálu (ORP) [18, 21].

### 1.3.2 Biologické technologie

Ve srovnání s fyzikálně-chemickými technologiemi představují biologické technologie nižší zátěž pro životní prostředí a jsou také levnější a vhodnější pro rozsáhlou sanaci in situ [22]. Biologické remediační technologie jsou založeny na praktickém využití schopnosti rostlin či mikroorganismů transformovat těžké kovy redukcí jejich biologické dostupnosti [18, 23].

**Mikrobiální remediace.** Tento druh remediační technologie je založen na principu zneškodňování polutantů, nacházejících se v půdě, pomocí mikroorganismů. Mikroorganismy, které se v půdním prostředí přirozeně nachází, jsou schopné do určité míry daná znečištění odstraňovat [18]. Jsou však omezeny toxicitou polutantů a jejich nízkým počtem, s čímž souvisí přirozeně nízká schopnost rozkladu. Na základě četných výzkumů

uvedených mimo jiné ve studii [24], byly zaznamenány mikroorganismy vykazující vysokou odolnost vůči toxicitě, schopnost sorpce těžkých kovů a degradace organických polutantů [18]. Mezi jednu z forem mikrobiální remediace patří bioloužení (angl. *bioleaching*), využití bakterií k odstraňování těžkých kovů z půd [25–26].

**Fytoremediace.** Další technologii představuje využití rostlin a jejich schopnosti transformovat znečišťující látky díky přeměně sluneční energie na energii chemickou. Rostliny, které vykazují vlastnosti vhodné pro sanaci kontaminovaných půd, jsou schopné tolerovat vysoké koncentrace těžkých kovů díky mechanismům detoxikace, kompartmentalizace<sup>1</sup>, exkluze<sup>2</sup>, chelatace<sup>3</sup> a sekvestrace<sup>4</sup> [27]. Pomocí fytoremediace není možné těžké kovy odbourat. Jejich odstranění je prováděnou prostřednictvím stabilizace v oblasti kořenového systému rostlin či jejich akumulací a transferem do nadzemní části, kde je možná jejich volatilizace, tedy odstranění výparem [18, 28]. Jako významné zástupce podílející se na odstraňování těžkých kovů prostřednictvím jejich akumulace uvádí studie [29–30] *Hypericum perforatum* L., či *Achillea millefolium* L.

**Genetické inženýrství.** Pro účely sanací kontaminovaných půd je možné aplikovat rovněž znalosti z oblasti genového inženýrství. Výsledky studie [31] ukazují, že geny, které se podílí na transformaci polutantů, je možné extrahovat, klonovat a následně zkonstruovat nový kmen rostlin či jej začlenit do transgenní rostliny. Tyto geny způsobují rozšíření kořenového systému, čímž je dosaženo zvýšení příjmu těžkých kovů rostlinou a rozptylu xenobiotik obsažených v substrátu [32]. Aplikaci genového inženýrství je však zapotřebí vždy důkladně posoudit a zhodnotit možná rizika spočívající v zavlečení geneticky modifikovaných organismů a poškození ekosystémové rovnováhy [18].

### 1.3.3 Biochemické technologie

Vzhledem ke složitosti reálné kontaminace nebývá jednoduché použít pouze jeden typ sanační technologie. K dosažení požadovaného výsledku se v praxi zpravidla kombinuje použití více technik zároveň. Aplikace biochemických metod, založených na kombinování fyzikálního, chemického a biologického přístupu jsou příkladem takového použití. Nedílnou

---

<sup>1</sup> *Kompartmentalizace* představuje funkci biologických membrán izolovat jednotlivá prostředí buňky [65].

<sup>2</sup> *Exkluze* představuje pojem pro vyloučení [66].

<sup>3</sup> *Chelatace* představuje fyzikálně-chemický proces, při němž organické sloučeniny váží vícevazebné kationty, zpravidla kovy dvěma a více vazbami [67].

<sup>4</sup> *Sekvestrace* představuje oddělení části od celku, zpravidla odumřelé tkáně od tkáně živé [68]. V daném kontextu pojem sekvestrace souvisí s ukládáním těžkých kovů do pletiv.



součástí je pochopení vzájemných vazeb mezi těmito procesy. Příkladem takové technologie je použití chelatačních činidel a povrchově aktivních látek v procesu extrakce těžkých kovů a polyaromatických uhlovodíků (PAU) z kontaminovaných půd za jejich současného promývání s následnou inokulací bakteriemi, které rozkládají zbytky PAU [18, 33].

#### 1.4 Dílčí závěr

Kontaminace půd těžkými kovy představuje reálný problém, který je za účelem udržení správného fungování ekosystému zapotřebí řešit. Existence nespočtu technologií činí tento problém jednodušeji řešitelný, na druhou stranu ne všechny technologie jsou vhodné k danému použití a vyžadují zvážení pro jejich aplikaci, aby nedošlo ke většímu poškození, než jaké remediaci předcházelo.

Využití biologických technologií představuje velký potenciál, a to jak z pohledu ekonomického, tak zejména z pohledu environmentálního. Nejenom znalost navrhované technologie představuje klíč k řešení problému, důležitou část sehrává především znalost chování daných xenobiotik v živém systému, v půdě. Aby byla vhodně zhodnocena aktuální situace, je zapotřebí dobře zvážit všechny faktory mající vliv na úroveň kontaminace a použití vhodných technik remediace.

## 2 TĚŽKÉ KOVY

Definice těžkých kovů není jednoznačná. Jednotlivé definice se mezi sebou liší a vymezují těžké kovy podle jejich hustoty, protonového čísla, atomové hmotnosti či jejich toxicity. Protokol o těžkých kovech k Úmluvě o dálkovém znečišťování ovzduší přesahujícím hranice států definuje těžké kovy jako kovy či polokovy, které „jsou stabilní a mají měrnou hmotnost vyšší než 4,5 g/cm<sup>3</sup>„ [34]. Zjednodušená definice dle [35–36] uvádí, že těžké kovy jsou kovové prvky, jež mají v porovnání s vodou relativně vysokou hustotu.

Kapitola rozebírá problematiku těžkých kovů, jejich charakteristiku s uvedením základních toxikologických vlastností a procesy jejich mobility, transportu a rozpadu. V závěru kapitoly jsou nastíněny základní metody, které se využívají v rámci kvalitativní a kvantitativní analýzy těžkých kovů.

### 2.1 Charakteristika vybraných těžkých kovů

Výskyt těžkých kovů v přírodě je příčinou vážných environmentálních problémů, neboť i při nízkých koncentracích ovlivňují prostředí a zdraví, protože nejsou biologicky rozložitelné [37]. Mezi těžké kovy se zpravidla řadí antimon (Sb), arsen (As), chrom (Cr), kadmium (Cd), kobalt (Co), měď (Cu), nikl (Ni), olovo (Pb), rtuť (Hg), selen (Se), stříbro (Ag), thallium (Tl), zinek (Zn) a železo (Fe). Mezi nejčastěji zkoumané kovy patří Pb, Cr, Cd, Cu, Zn a Hg [38–39]. Napříč jmenovanými kovy, Hg, Pb a As se mohou stát těkavými v podobě AsH<sub>3</sub>; Hg<sup>0</sup> a Hg(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; a Pb(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub> [14]. Základní charakteristika vybraných těžkých kovů je uvedena v tab. 1.

**Tab. 1** Základní charakteristika vybraných těžkých kovů [11]

Prvek	Oxidační stavy	Toxikologie	Průmyslové použití
Sb	+3, +5	zvracení, křeče, průjem	slitiny; ohnivzdorné textilie, keramika, sklárství
As	+3, +5	vysoce toxický; LD = 120 mg (As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> );	metalurgie (součást slitin a polovodičů)
Cr	+2, +3, +6	Cr <sup>6+</sup> vysoce toxický (krvácení do jater, ledvin a dýchacích orgánů; dermatitida a ulcerace; perforace nosní přepážky)	automobilový průmysl (pochromování nárazníků); výroba slitin (nerezová ocel, nichrom)
Cd	+1, +2	toxický (vysoký krevní tlak, srdeční choroby, smrt)	nikelnato-kademnaté baterie; těžba rud

Cu	+1, +2	akutní otrava (kovová pachuť, nevolnost, zvracení, průjem; případně hypertenze, šok a koma)	elektroinstalace (vodiče)
Fe	+2, +3	zabarvení prádla při výskytu ve vodě; chronická otrava způsobuje hemosiderózu doprovázenou fibrózou. LD = 60 mg/kg	širokospektrální využití
Ni	+1, +2, +3, +4	průjem, bolesti břicha, kožní onemocnění	galvanické pokovování; výroba baterií a magnetů
Pb	+2, +4	LD = 20–25 g (akutní otrava vzácná, při chronické otravě je postižena nervová soustava, GIT a krevtvorba)	baterie; zvyšovač oktanového čísla a antidetonační přísada do benzínu (tetraethylolovo <sup>5</sup> ); primární slož rozbušek (azid olova); barviva
Hg	+1, +2	třes, ataxie, podrážděnost, slepota, smrt	náplň přístrojů (teploměry, barometry); slitiny (amalgámy)
Zn	+2	nevolnost, zvracení, žaludeční křeče a průjem	kosmetika (opalovací krémy); baterie; automobilový průmysl (galvanizace)

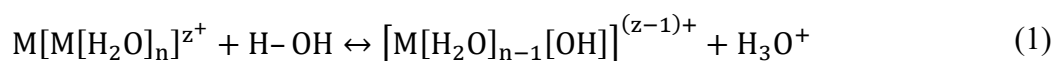
## 2.2 Osud v životním prostředí

Osud, přenos a toxicita těžkých kovů je značně ovlivněna hodnotou pH a redoxním potenciálem půd. Těžké kovy mohou rovněž existovat v různých stavech oxidace, přičemž tyto stavy se liší v hodnotách toxicity, rozpustnosti a reaktivity. Z důvodu častých změn jejich oxidačních čísel není možné tyto kovy ničit spalováním jako formou remediacce. Z téhož důvodu nemůže být uplatňována bioremediace či vzdušný stripping (angl. *air stripping*) [14]. Mezi nejčastější procesy rozpadu těžkých kovů chemickou cestou patří hydrolyza spolu s procesem oxidace a redukce.

### 2.2.1 Hydrolyza

Hydrolyza představuje reakci, při níž dochází k substituci atomu či skupiny atomů v molekule molekulou vody nebo hydroxidem. Chemická vazba je přerušena a dochází k navázání vodíkového protonu ( $H^+$ ) či hydroxidového aniontu ( $OH^-$ ) z molekuly vody [14].

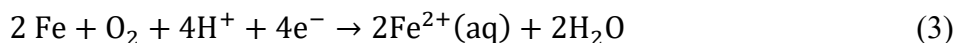
V případě reakce s kovy, pozitivně nabitý kovový ion ( $M$ ) se chová jako lewisovská kyselina, přičemž ionty kovu čerpají elektrony z vazby  $O-H$  ve vodě. Jakmile je vazba  $-OH$  přerušena, vodíkový proton je uvolněn a vzniká kyselý roztok:



<sup>5</sup> *Tetraethylolovo* jako antidetonační přísada do motorových benzínů je v dnešní době nahrazena ferrocenem.

### 2.2.2 Oxidace a redukce

Procesy oxidace, kdy dochází ke ztrátě elektronů, a redukce, naopak přijímání elektronu, jsou komplementární, jinými slovy, jedna reakce nemůže proběhnout bez druhé reakce, neboť elektrony musí být v rovnováze:



Redoxní reakce v biotickém i abiotickém systému jsou dobře pozorovatelné zkoumáním oxidačních čísel atomů. V případě, že redoxní reakce probíhají v rámci anorganických látek, silně závisí na pH a redoxním potenciálu<sup>6</sup>, jež určují toxicitu anorganických látek [14].

## 2.3 Interfázový chemický transport

Interfázový neboli mezifázový chemický přenos představuje fyzikální a chemické procesy probíhající mezi fázemi (plynnými, kapalnými a pevnými) zatímco intrafázový chemický přenos zahrnuje tytéž procesy, které ovšem probíhají v rámci jedné fáze, kupř. v půdě [14]. Mezifázový přenos těžkých kovů se nejčastěji uskutečňuje prostřednictvím solubilizace, srážení, rozpouštění, sorpce a desorpce.

### 2.3.1 Solubilizace, srážení a rozpouštění

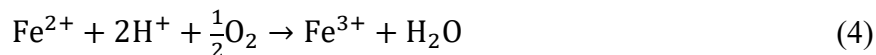
Rozpustnost látky je mírou maximálního množství této látky, jaké lze rozpustit v daném rozpouštědle, zpravidla ve vodě. Látky s vyšší rozpustností jsou jednodušeji rozpustné v podzemních vodách, čímž zvyšují riziko kontaminace okolních půd. Voda se tak stává díky svému polárnímu charakteru výborným rozpouštědlem jiných polárních sloučenin.

Imobilizované kovy obsažené v půdě je možné odstranit tzv. solubilizací – přidáním chelatačních činidel<sup>7</sup> a následným odstraněním vzniklých ve vodě rozpustných komplexů. Těžké kovy obsažené ve spodních vodách je možné odstraňovat prostřednictvím srážecích reakcí [14]:

---

<sup>6</sup> Redoxní potenciál látky představuje schopnost látky vázat či uvolňovat elektrony. Jednotkou redoxního potenciálu je volt (V) či milivolt (mV) [69]. V anglosaské literatuře je častěji uváděn tzv. redukční potenciál (reduction potential) látky, který vyjadřuje pouze schopnost látky v průběhu redukce elektrony vázat [14].

<sup>7</sup> Chelatační činidlo představuje látku, jejíž molekuly jsou schopné vytvářet několik vazeb s jedním kovovým iontem [14].



### 2.3.2 Sorpce a desorpce

Sorpce představuje proces přenosu látky z kapalně či plynné fáze do fáze pevné i kapalně. Proces sorpce je spojován s absorpcí a adsorpcí. Povrchový náboj, měřený jako KVK<sup>8</sup>, určuje kovům v iontové formě jejich schopnost přitahovat kationty na záporně nabitých funkčních skupinách pevné látky. Částice se záporně nabitým povrchem, zpravidla jílu či jiné půdní částice, tak vykazují silnou sorpci vůči kladně nabitým kationtům [14].

## 2.4 Výskyt těžkých kovů

Přestože těžké kovy představují kovy přirozeně se vyskytující v zemské kůře, většina jimi vzniklé kontaminace životního prostředí souvisí s jejich praktickým využíváním. Zpravidla se jedná o jejich průmyslové využití či důsledek antropogenní činnosti, jako kupř. těžbu rud a jejich tavení, použití v domácnostech a zemědělství [35]. Ke kontaminaci životního prostředí může docházet prostřednictvím koroze kovů, atmosférickou depozicí, půdní erozí kovových iontů či vyluhováním a odpařováním. Zvýšeným podílem na kontaminaci těžkými kovy se podílí přírodní jevy, jako zvětrávání či sopečné erupce [35–36, 40].

## 2.5 Instrumentální analýza

Mezi konvenční techniky využívané při analýze kovů se řadí atomová absorpční spektrometrie (AAS, angl. *atomic absorption spectrometry*) spolu s plamenovou AAS (FAAS, angl. *flame atomic absorption spectrometry*), hmotnostní spektrometrie/atomová emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem, UV/VIS spektrofotometrie a rentgenová fluorescenční spektrometrie [11, 41–42].

### 2.5.1 Atomová absorpční spektrometrie

Princip AAS je založen na absorpci elektromagnetického záření ke zjištění přítomnosti sledovaného prvku [11]. Zdrojem záření je nízkotlaká, neonem plněná výbojka s dutou katodou. Měřenou veličinou je absorbance jako míra koncentrace sledovaného prvku, přičemž rozdíly energií mezi elektronovými stavy jsou pro každý prvek příznačné [43].

---

<sup>8</sup> Kationtová výměnná kapacita (KVK) představuje maximální množství celkových kationtů, které je v daném případě půda schopná udržet na dané hodnotě pH [14].

Technika bývá použita jako hlavní nástroj při studiu stopových kovů v životním prostředí a v biologických vzorcích. Výhodou metody se jeví její použití při analýze vzorků, ve kterém je koncentrace kovu poměrně vysoká, a zároveň je pro analýzu dostupné pouze malé množství vzorku [11, 44].

### 2.5.2 Plamenová atomová absorpční spektrometrie

Princip FAAS je založen na odpařování a rozprašování vzorku v plameni o vysoké teplotě. Jedná se o rychlou a velmi přesnou analýzu. Atomy analyzovaného prvku absorbují světlo specifické vlnové délky z duté katodové lampy (HCL, angl. *hollow cathode lamp*) procházející plamenem. Světelný paprsek je veden přes plamen do monochromátoru a následně na detektor, který měří množství světla absorbovaného atomizovaným prvkem v plameni. Cílem je měřit množství energie absorbované těmito atomy, přičemž toto množství je úměrné počtu atomů v dráze světla [11].

### 2.5.3 Emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem

Emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES, angl. *inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*) představuje rychlou a citlivou metodu pro stanovení prvků, a to včetně kovů v roztoku. Princip AES je založen na vystavení analyzovaného vzorku teplotě, která je dostatečná k tomu, aby došlo nejenom k rozpadu na atomy, ale také ke značné srážkové excitaci a ionizaci atomů vzorku. Jakmile se atomy a ionty dostanou do excitovaného stavu, mohou následně snižovat svoji energii tepelným nebo radioaktivním (emisním) přechodem. Cílem AES je měřit intenzitu vyzařovaného světla při určitých vlnových délkách, čímž je stanovována koncentrace zájmových prvků [11].

### 2.5.4 UV/VIS spektrofotometrie

UV/VIS spektrofotometr je určen pro měření v ultrafialové oblasti a oblasti viditelného světla. Přístroje měří absorpci v oblasti 200 až 1000 nm. Pro měření v oblasti nižší než 230 nm musí být spektrofotometr vybaven zdrojem UV záření. Jako zdroj viditelného záření bývá využívána wolframová žárovka a deuteriová výbojka jako zdroj UV záření [11].

### 2.5.5 Rentgenová fluorescenční spektrometrie

Rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF, angl. *X-ray fluorescence*) je založena na „interakci částic nebo záření o vysoké energii s atomy vzorku“ [44]. V důsledku této interakce je atom uveden do vysokoenergetického stavu, za současného vyražení elektronu

z vnitřních vrstev atomového obalu. Vakance vzniklá po vyražení elektronu je zaplněna elektronem z vyšší energetické hladiny. Princip metody je založen na měření uvolněné energie ve formě fotonu či Augerova elektronu<sup>9</sup> postupem elektronu z vyšší energetické hladiny do nižší [44].

## 2.6 Dílčí závěr

Zdroje kontaminace těžkými kovy, obdobně jako zdroje radioaktivity, nejsou pouze umělé, ale rovněž přirozené. Extenzivní důsledky průmyslové činnosti ovšem přirozené koncentrace těžkých kovů navyšují a vytváří tak reálný problém mající důsledky na okolní živé systémy.

Přestože autoři definice těžkých kovů se neshodují na jedné ustálené variantě, shodují se na skutečnosti, že vysoká toxicita i v nepatrném množství představuje hlavní charakteristiku těžkých kovů.

Osvědčené metody instrumentální analýzy vhodné pro analýzu těžkých kovů i jiných prvků, byly uvedeny v této kapitole. V návaznosti na jejich výčet budou vybrané metody, a to především XRF spolu s FAAS využity při řešení experimentální části závěrečné práce.

---

<sup>9</sup> Při přechodu elektronu z vyšší vrstvy atomového obalu do nižší dochází k vyzáření energie, která může být vyzářena ve formě fotonu či může být předána jinému elektronu a ten je pak sekundárně uvolněn z atomu. Takto uvolněný elektron se nazývá *Augerovým elektronem* [70].

### 3 BIOLOUŽENÍ

Množství tuhého odpadu, opuštěných důlních hlušin a zamořených půd mající za následek vysokou koncentraci těžkých kovů v okolní půdě a vodě se s rozvojem průmyslu zvyšuje [45]. Extrémně vysoké koncentrace těžkých kovů zůstávají jako odpad z důlní činnosti, a to především na území Číny a Jižní Koreje, bez jakéhokoli dalšího zpracování [45–47].

Techniky bioloužení (angl. *bioleaching*) jsou stále více využívanou technologií v rámci extrakce a znovuzískávání těžkých kovů z kovových rud, kontaminovaných sedimentů, půd a kalů [48–49], neboť představují metodu založenou schopností mikroorganismů transformovat těžké kovy do rozpustné fáze [46]. Na rozdíl od fyzikálních a chemických procesů se jedná o proces finančně méně nákladný, vysoce efektivní a k přírodě šetrnější [46–50].

Kapitola se zaměřuje na významného zástupce acidofilních bakterií *Acidithiobacillus ferrooxidans*, jež je využíván v procesu bioloužení, uvádí základní přehled faktorů pro jeho úspěšnou kultivaci a popisuje doposud známý proces bioloužení prostřednictvím této bakterie.

#### 3.1 Mikrobiologie

V procesu bioloužení se obecně využívají bakterie se schopností oxidovat železo. Vzhledem ke skutečnosti, že bakteriální loužení probíhá v kyselém prostředí, v němž většina iontů zůstává v roztoku, zvláštní význam sehrávají acidofilní druhy bakterií [51]. Mezi nejvíce využívané patří bakterie rodu *Acidithiobacillus* a *Thiobacillus* jako jsou *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* a *Thiobacillus thioparus* [49, 52]. Z výše zmíněných thiobacilů jsou i ostatní zástupci schopni oxidovat síru a sulfidy, jejich růst je však determinován vyšší hodnotou pH, při které se ionty kovů již neudrží v roztoku [51, 53].

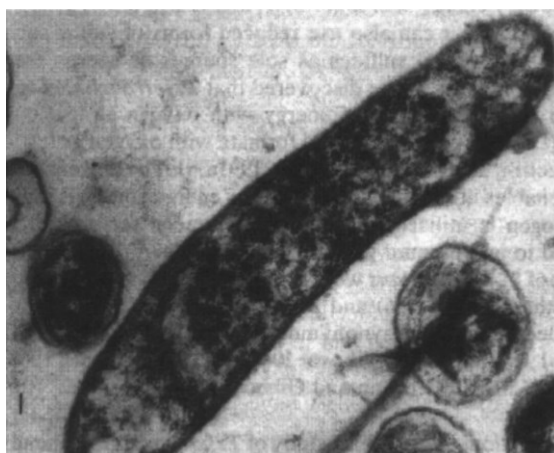
Bakterie *A. ferrooxidans* a *A. thiooxidans* se mohou používat jednotlivě nebo vzájemně kombinovat. Nedávné studie navíc předkládají, že kombinace těchto dvou bakterií v procesu bioloužení těžkých kovů přináší vyšší efektivitu [49, 52].

#### 3.2 Bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans*

*Acidithiobacillus ferrooxidans* patří mezi nejvíce využívané mikroorganismy v procesu odstraňování těžkých kovů z kontaminovaných půd [54]. Řadí se mezi gramnegativní,



chemolitotrofní tyčinkovité bakterie rostoucí v přítomnosti železa či síry jako svého zdroje energie. Fotografie *A. ferrooxidans* je uvedena na obr. 3.



**Obr. 3** *Acidithiobacillus ferrooxidans* [55]

Jako zdroj uhlíku bakterie vyžaduje vzdušný  $\text{CO}_2$ . Energii pro svůj růst získává oxidací iontů  $\text{Fe}^{2+}$  na ionty  $\text{Fe}^{3+}$  [54, 56]. Bakterie se rovněž podílí na redukci sloučenin síry (příjemce elektronu) za současné oxidace  $\text{Fe}^{2+}$  (dárce elektronu). Daná reakce vede k produkci síranu železitého [57–58]. Při nedostatku kyslíku jsou bakterie *A. ferrooxidans* stále schopné růst na redukovaných anorganických sloučeninách síry s využitím  $\text{Fe}^{3+}$  jako alternativního akceptora elektronu [49, 53].

### 3.2.1 Kultivace

Média využívaná pro kultivaci se napříč publikovanými studiemi liší. Mezi nejčastěji využívaná média patří médium 9K [45, 59–60], médium 882 [54] či médium B80. Složení médií 9K a B80 uvádí tabulka 2.

**Tab. 2** Složení médií 9K a B80 [45]

Médium 9K		Médium B80			
		Složka I		Složka II	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 g/L	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5 g/L	KCl	0,1 g	1N $\text{H}_2\text{SO}_4$	2 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/L	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5 g	Destilovaná $\text{H}_2\text{O}$	300 ml
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,01 g/L	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,23 g/L	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,01 g		
KCl	0,1 g/L	Destilovaná $\text{H}_2\text{O}$	700 ml		
Destilovaná $\text{H}_2\text{O}$	1 L				

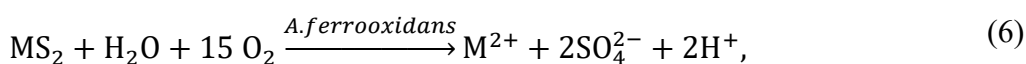
V závislosti na prováděných studiích, kultivace bakterií probíhá za aerobních podmínek v teplotním rozmezí 25–30 °C a protřepávání při 120–180 otáčkách za minutu. Hodnota pH média bývá upravena na hodnoty 1,80 až 2,50 pomocí H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [45–46, 54]. Mezi klíčové parametry úspěšné kultivace thiobacilů patří kyselé pH podporující acidifikaci, vysoký redoxní potenciál udržovaný dostatečným provzdušňováním a dostupností substrátu s obsahem síry [51].

Kultivační proces bakterií je monitorován prostřednictvím sledování dynamického vývoje hodnot pH, ORP a koncentrací Fe<sup>3+</sup> iontů. Závislost změn hodnot pH v čase (s ohledem na růst a množení bakterií) se do jisté míry napříč studii různí. Všeobecný trend však naznačuje počáteční růst a následný pokles pH v čase. Studie [61] uvádí růst pH pouze do druhého dne kultivace, přičemž následující dny činností bakterií jeho hodnota klesá. V jiné studii [62] pH rostlo až do čtvrtého dne, následně začalo klesat. Ačkoli v obou experimentech bylo použito stejné kultivační médium 9K, mírně odlišné podmínky kultivace mohou zapříčinit časový rozdíl v zaznamenání poklesu pH. Hodnota ORP by s dobou kultivace neměla klesat, naopak by měla růst, dle [63] až v rozmezí třetího a pátého dne.

### 3.2.2 Mechanismus bioloužení

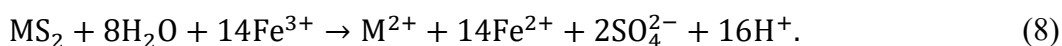
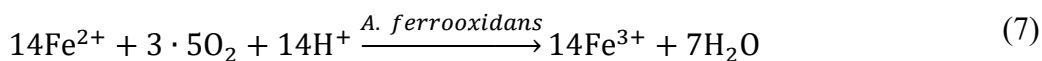
Produkt energetického metabolismu bakterie, síran železitý, slouží jako silné oxidační činidlo schopné mobilizovat kovy [64–65]. Mechanismus bioloužení pomocí *A. ferrooxidans* je tak popisován jako přímé bakteriální napadávání sulfidických minerálů a nepřímé oxidování minerálů Fe<sup>3+</sup>.

**Přímý mechanismus.** Přímé rozpouštění minerálů je způsobeno rozkladem sulfidických minerálů enzymatickým systémem bakterií:



kde MS<sub>2</sub> představuje nerozpustný sulfid kovu a Me<sup>2+</sup> představuje kovový ion [49].

**Nepřímý mechanismus.** V případě nepřímého mechanismu bakterie regenerují Fe<sup>3+</sup> ionty oxidací Fe<sup>2+</sup>, přičemž železité ionty slouží jako oxidační činidlo sulfidických minerálů [49]:



Reakce (7) vyžaduje přítomnost bakterií *A. ferrooxidans*, zatímco (8) představuje čistě chemický proces. Železité ionty získané v (7) tak postupují do reakce (8), čímž je další množství těžkých kovů louženo [66].

Započetí procesu bioloužení by mělo probíhat po dokončení růstové fáze [67], současně je zapotřebí brát v potaz obsah rozpuštěného organického uhlíku, jež má dle [68] toxický vliv na acidofilní bakterie.

### 3.3 Dílčí závěr

Výhody technologie bioloužení naznačují její vhodnost použití při loužení těžkých kovů in-situ bez zásahu do pH půdy a změny ekologické niky, které by s sebou přinášely konvenční chemické metody. Technologie bioloužení po více než dvacet let je zkoumána a prozatím žádná studie nepoukázala na významná úskalí této metody. Dokonce je dle výsledků studií [69, 70] považována za více efektivní než chemické loužení. Nevýhodou je však její časová náročnost.

Vzhledem k velkému počtu provedených studií je možné uvést závěr, že bakterie *A. ferrooxidans* představují významného zástupce acidofilních bakterií, který při mnoha bioloužících experimentech vykazoval dobré výsledky. Z tohoto důvodu byla tato bakterie, včetně vybraných parametrů její kultivace zvolena pro použití v praktické části práce.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Použité materiály a chemikálie

Materiály a chemikálie využitě při řešení praktické části práce uvádí tab. 3.

**Tab. 3** Použité materiály a chemikálie

<b>Materiál / chemikálie</b>	<b>Objem [ml]</b>	<b>Množství [ks]</b>
chlorid draselný, $c(\text{KCl}) = 1 \text{ mol/l}$	100	
chlorid vápenatý, $c(\text{CaCl}_2) = 0,01 \text{ mol/l}$	100	
voda demineralizovaná		
lahvička plastová se šroubovacím uzávěrem	100	12
kelímek žíhací keramický	10	4
exsikátor		1
octan amonný, $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 1 \text{ mol/l}$	1000	
octan amonný, $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 2 \text{ mol/l}$	500	
zásobní standardní roztok draslíku, $c(\text{K}) = 0,01 \text{ mol/l}$	1000	
zásobní standardní roztok sodíku, $c(\text{Na}) = 0,01 \text{ mol/l}$	1000	
zásobní standardní roztok hořčíku, $c(\text{Mg}) = 0,01 \text{ mol/l}$	1000	
zásobní standardní roztok vápníku, $c(\text{Ca}) = 0,01 \text{ mol/l}$	1000	
kyselina chlorovodíková, $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$	1000	
baňka odměrná	100	12
	50	12
kádinka	100	15
	0,01–0,1	1
mikropipeta	0,1–1	1
	0,5–5	1
pipeta skleněná, dělená	10	1
	30	1
filtrační papír ze skleněných mikrovláken, průměr 50 mm		30
kyselina dusičná, $c(\text{HNO}_3) = 2 \text{ mol/l}$	100	
kyselina sírová, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,5\text{--}0,25\text{--}0,1 \text{ mol/l}$	200	
sklíčko podložní s komůrkou počítací Cyrus II, Meopta		2
sklíčko krycí		100
láhev skleněná se šroubovacím uzávěrem	1000	10
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , kultura chlazená	4,5	
thiokyanatan draselný, $c(\text{KSCN}) = 20 \%$	250	

### 4.2 Použité přístroje a pomůcky

Seznam použitých přístrojů a pomůcek uvádí tab. 4.

Tab. 4 Použité přístroje a pomůcky

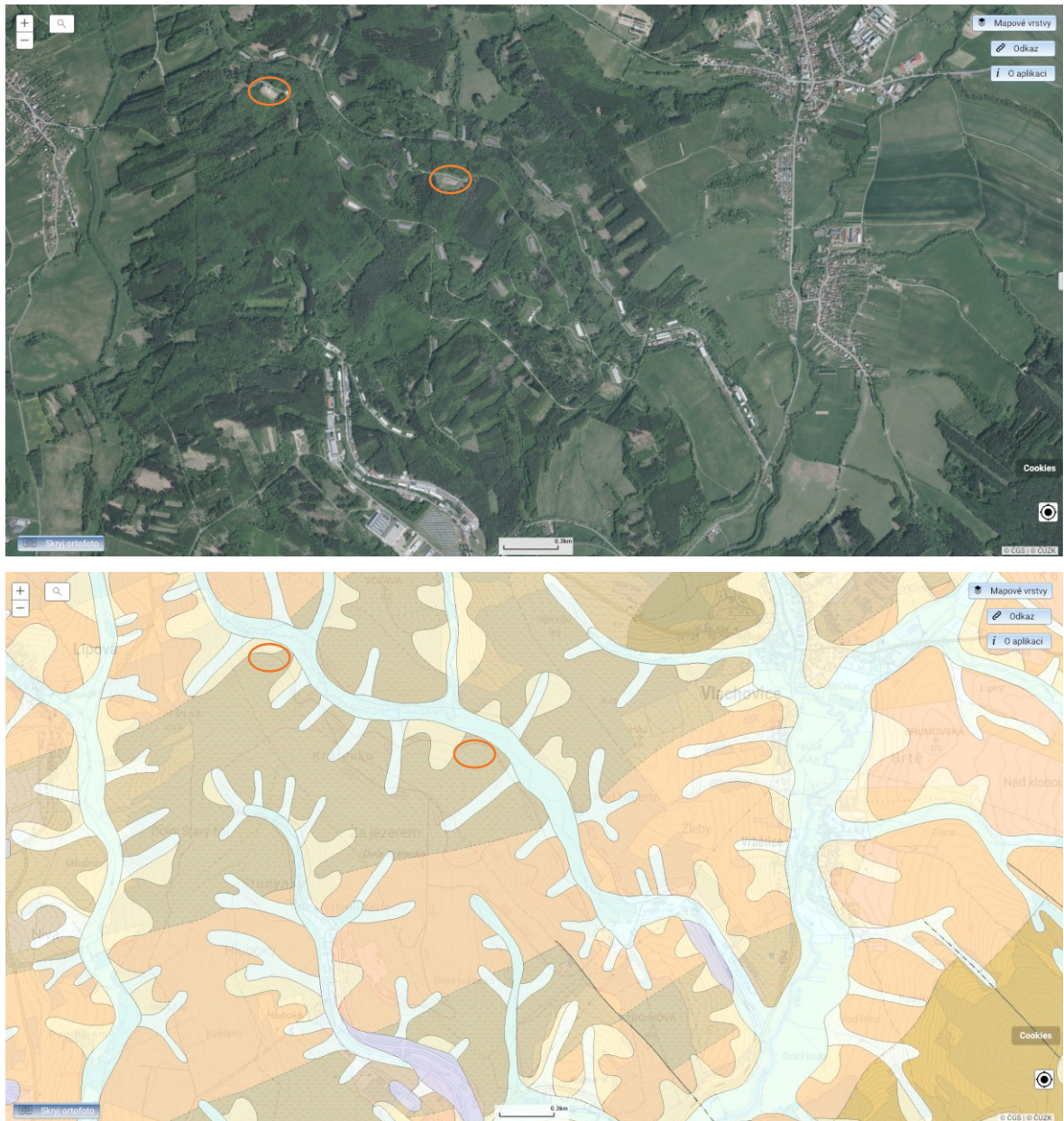
Název	Typ	Výrobce	Země původu
analyzátor vlhkosti	MB 25	Ohaus	USA
elektroda pH	SenTix 81	WTW	SRN
elektroda platinová	BlueLine 31 RX	Schott	SRN
elektroda vodivostní	TetraCon 325	WTW	SRN
FAAS	ContrAA 800D	AnalytikJENA	SRN
konduktometr	inoLab	WTW	SRN
konduktometr	inoLab Cond 730	WTW	SRN
míchačka magnetická	MM4	Lavat	ČR
optický mikroskop	CX41	Olympus	Japonsko
pec muflová	MP 05-0.1	Martínek	ČR
pH a ORP metr	inoLab	WTW	SRN
předvážky laboratorní	EW	Kern	SRN
rentgenový fluorescenční spektrometr	ElvaX	Elvatech	Ukrajina
spektrofotometr	Unicam UV 500	Thermo Spectronic	USA
stolní centrifuga	Rotanta 460 R	Hettich	SRN
sušárna	UM 100	Memmert	SRN
třepací vodní lázeň	1092	GFL	SRN
třepačka lineární malá	RS 10 basic, Yellow line	IKA	SRN
váhy analytické	ABJ 220-4NM	Kern	SRN

### 4.3 Místo a odběr vzorků

Pro účely experimentu byl odběr vzorků proveden v prostoru bývalých vojenských skladů areálu Vrbětice ve vzdálenosti 7 km severovýchodně od města Slavičín, Česká republika.

#### 4.3.1 Místo odběru

Ve vrbětickém areálu byla vybrána dvě místa odběru v přilehlém terénu skladu č. 12 a č. 16. Geologické složení hornin celého prostoru uvádí obr. 4.



**Obr. 4** Ortofoto a typy hornin vrbětického areálu

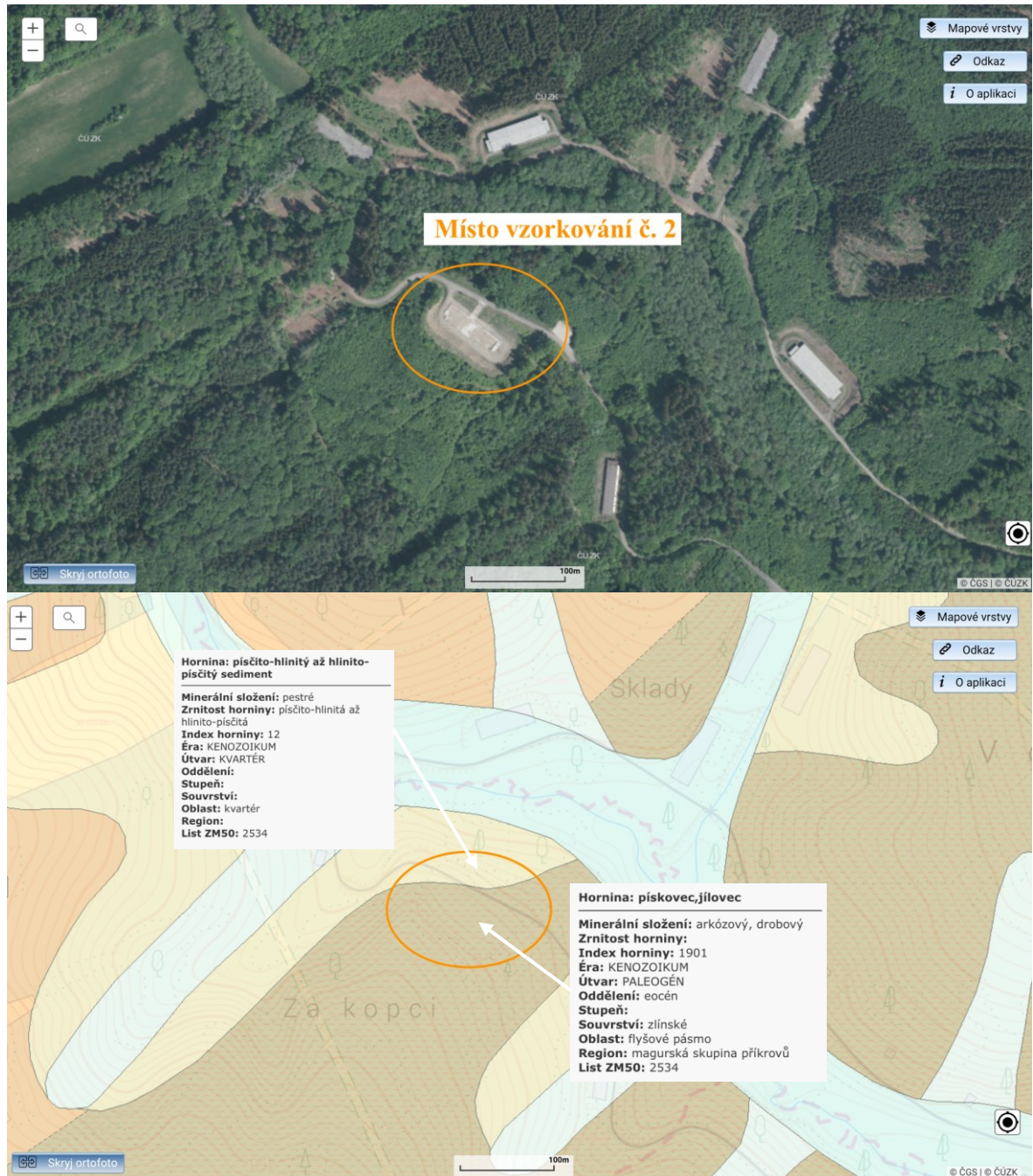
Místo vzorkování I bylo zvoleno v okolí skladu č. 16. V místě odběru se nacházela pískovcovo-jílovitá hornina. Ortofoto spolu s geologickým podkladem místa vzorkování I je uvedeno na obr. 5



**Obr. 5** Ortofoto a typ hornin místa vzorkování I

Místo vzorkování II bylo vybráno v okolí skladu č. 12. V okolí se převážně nachází rovněž pískovcovo-jílovitá hornina, do místa odběru také zasahuje písčito-hlinitý až hlinito-písčitý sediment. Ortofoto spolu s typem hornin místa vzorkování II uvádí obr. 6.





Obr. 6 Ortofoto a typ hornin místa vzorkování II

#### 4.3.2 Plán a schéma vzorkování

Cíl vzorkování byl zaměřen na zhodnocení kontaminace půd jako součásti analýzy rizik, rekultivačních a remediačních postupů [64] pro zjištění možností bioloužení a porovnání s loužením chemickým. Vzorkování bylo prováděno v prostoru muničních skladů areálu Vrbětice, a to na dvou místech. Podmínky, při nichž byly vzorky odebrány, uvádí tab. 5.

Tab. 5 Podmínky vzorkování

	Vzorkování I	Vzorkování II
Místo vzorkování	Prostor muničních skladů Vrbětice (sklad č. 16)	Prostor muničních skladů Vrbětice (sklad č. 12)
Datum a čas odběru	13. října 2023 13:00–15:00	6. října 2023 10:00–13:00
Teplota a vítr	22 °C, jasno, slunečno, bezvětrí	12 °C, polojasno, mírný SZ vítr
Způsob odběru	Malý ruční vzorkovač o délce 380 mm s průměrem drážky 17 mm	Malý ruční vzorkovač o délce 380 mm s průměrem drážky 17 mm
Plocha odběru	10 x 10 m	10 x 20 m
Počet míst odběru	3	2
Hloubka odběru	30 cm	30 cm
Počet dílčích vzorků	24 ks	12 ks
Hmotnost dílčího vzorku	42 g	84 g
Hmotnost směsného vzorku	1000 g	1000 g

Na místě vzorkování I bylo odebráno celkem 24 vzorků na třech místech, každé o rozměru  $10 \times 10$  m v přilehlé oblasti skladu č. 16. Pro vzorkování II bylo odebráno 12 dílčích vzorků na dvou místech, každé o rozměru  $10 \times 20$  metrů v oblasti muničního skladu č. 12.

Základní vzorkovací schéma bylo vybráno jako schéma systematické z důvodu rovnoměrného rozmístění vzorků na ploše [71]. Schémata vzorkování jsou uvedena na obr. 7 a 8.



Obr. 7 Schéma vzorkování I



**Obr. 8** Schéma vzorkování II

Z 24 dílčích vzorků o hmotnosti 42 g vzorkování I a 12 dílčích vzorků o hmotnosti 84 g vzorkování II byly vytvořeny dva směsné vzorky o celkové hmotnosti 1000 g. S těmito směsnými vzorky byly následně prováděny experimenty.

#### **4.4 Stanovení fyzikálně-chemických charakteristik**

Za účelem zjištění chemických charakteristik směsných vzorků bylo změřeno jejich pH a konduktivita, byl stanoven obsah oxidovatelného uhlíku, změřena kationtová výměnná kapacity a obsah těžkých kovů. Současně jako fyzikální charakteristika byl ve vzorcích stanoven obsah sušiny.

##### **4.4.1 Stanovení pH**

Hodnota pH sehrává klíčovou roli při většině chemických a biologických procesů v půdách, přičemž stanovení pH směsných vzorků půd bylo provedeno podle normy ISO 10390 [72]. Vlhké dílčí vzorky ze dvou míst vzorkování byly dány do dvou mís a promíseny za vzniku dvou směsných vzorků. Vzorky byly vysušeny při laboratorní teplotě a rozemlety pomocí třecí misky a tloučku. Následně byly přesity přes síto o průměru ok 2 mm.

Z každého přesitého směsného vzorku bylo odebráno 6 x 5 g půdy, kdy tato množství byla smíchána s 25 ml (1) demineralizované H<sub>2</sub>O, (2) 1M roztoku KCl a (3) 0,01M roztoku CaCl<sub>2</sub> (viz tab. 6).

**Tab. 6** Vzorky připravené pro stanovení pH

Médium	Název vzorku	Médium	Název vzorku
H <sub>2</sub> O	I A	H <sub>2</sub> O	II A
	I B		II B
KCl	I A	KCl	II A
	I B		II B
CaCl <sub>2</sub>	I A	CaCl <sub>2</sub>	II A
	I B		II B

Vytvořené vzorky pro měření pH byly umístěny do 12 plastových lahví o objemu 100 ml se šroubovacím uzávěrem a vloženy do třepačky na 60 minut při 120 RPM. Po uplynutí této doby byly vzorky přeneseny a ponechány v klidu po dobu dalších 60 minut. U připravených vzorků byla změřena hodnota jejich pH. Pro změření hodnoty pH v připravených vzorcích byl využit pH metr inoLab od německé firmy WTW s elektrodou SenTix 81 téže firmy.

Každá láhev s daným vzorkem byla vložena na magnetickou míchačku (bez zapnutého ohřevu). Do lahvičky byla vložena elektroda SenTix 81, jež byla předem zkalibrována pomocí připravených kalibračních (pufračních) roztoků. Na digitálním panelu pH metru byla po ustálení odečítána naměřená hodnota pH. Mezi každým dalším měřením byla elektroda vymyta destilovanou vodou.

Hodnocení aktivního pH při použití s H<sub>2</sub>O a výměnného pH při použití KCl a CaCl<sub>2</sub> je provedeno s využitím údajů uvedených v tab. 7.

**Tab. 7** Hodnocení aktivního a výměnného pH [73–74]

Půdní reakce	pH/KCl	pH/H <sub>2</sub> O	pH/CaCl <sub>2</sub>
velmi silně kyselá	méně než 3,0	méně než 3,5	Méně než 4,5
silně kyselá	3,0 – 4,0	3,5 – 4,4	4,6 – 5,0
středně kyselá	4,1 – 5,0	4,5 – 5,5	5,1 – 5,0
mírně kyselá	5,1 – 6,0	5,6 – 6, 5	5,6 – 6,5
neutrální	6,1 – 7,0	6,6 – 7,2	6,6 – 7,2
mírně alkalická	více než 7,0	více než 7,2	více než 7,3

Výpočet výběrové směrodatné odchylky u získaných hodnot byl proveden dle vztahu:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (9)$$

kde  $x_i$  je naměřená hodnota,  $\bar{x}$  je průměrná hodnota a  $n$  je počet měření.

#### 4.4.2 Stanovení konduktivity

Pro stanovení hodnoty konduktivity směsných vzorků byla využita norma ČSN ISO 11265 [75], přičemž byly použity vzorky připravené pro stanovení pH, a to  $2 \times 5$  g půdy ze směsného vzorku I a směsného vzorku II, kdy tyto byly smíchány s 25 ml demineralizované vody. Postup jejich přípravy je shodný s postupem uvedeným v oddílu 4.4.1. Připravené vzorky uvádí tab. 8.

**Tab. 8** Vzorky připravené pro stanovení konduktivity

Médium	Název vzorku	Médium	Název vzorku
H <sub>2</sub> O	I A	H <sub>2</sub> O	II A
	I B		II B

Hodnota konduktivity byla měřena pomocí konduktometru inoLab od německé firmy WTW s vodivostní elektrodou TetraCon 325 téže firmy. Lahve byly postupně vkládány na magnetickou míchačku, přičemž do každé byla vložena platinová elektroda. Po ustálení měřené hodnoty byla tato odečtena z digitálního panelu konduktometru. Mezi každým měřením byla elektroda omyta destilovanou vodou.

#### 4.4.3 Stanovení sušiny

Stanovení sušiny bylo prováděno podle ČSN EN 12902 [76]. Z každého směsného vzorku byly připraveny dva vzorky o hmotnosti 5 g. U každého vzorku byla pomocí analytických vah zjištěna jejich přesná hmotnost. Vzorky byly umístěny do sušicí pece a sušeny při 60 °C po dobu dvou hodin a následně při 105 °C po dobu dalších čtyř hodin. Následně byly vzorky vyjmuty a vloženy do exsikátoru ke zchlazení. Vzorky o laboratorní teplotě byly následně zváženy. Výpočet obsahu vody byl proveden dle vztahu (10):

$$x [\%] = 100 - \left( \frac{m_1 - m_2}{m_1} \cdot 100 \right), \quad (10)$$

kde  $m_1$  značí hmotnost vzorku před vysušením [g],  $m_2$  hmotnost vzorku po vysušení [g] a  $x$  procentuální zastoupení sušiny.

Hodnoty stanovené výpočtem byly porovnány s výsledky získanými pomocí analyzátoru vlhkosti MB 25 americké firmy Ohaus. Pro tyto účely byly do analyzátoru vlhkosti naváženy  $2 \times 2$  g z každého směsného vzorku. Vzorky byly následně analyzovány, přičemž výsledná hodnota sušiny v jednotlivých vzorcích byla odečtena z digitálního panelu přístroje.

#### 4.4.4 Stanovení oxidovatelného uhlíku

Stanovení oxidovatelného uhlíku za účelem zjištění procentuálního obsahu organických látek bylo provedeno podle ČSN EN 16070 [77]. Jedná se o tzv. ztrátu žiháním. Do předem vyžiháných kelímků bylo vloženo  $2 \times 5$  g vysušeného směsného vzorku I a směsného vzorku II při  $105^\circ\text{C}$ . Vzorky byly na analytických vahách zváženy a následně vloženy do předem do muflové pece, kde byly žihány při  $650^\circ\text{C}$  po dobu tří hodin. Po uplynutí této doby byly vzorky vyjmuty, přesunuty do exsikátoru a následně na analytických vahách zváženy. Procentuální stanovení oxidovatelného uhlíku bylo provedeno dle vztahu (11):

$$c [\%] = 100 - \left( \frac{m_1 - m_2}{m_1} \cdot 100 \right), \quad (11)$$

kde  $m_1$  představuje hmotnost vzorku před žiháním (hmotnost vysušeného vzorku při  $105^\circ\text{C}$ ) [g] a  $m_2$  značí hmotnost vzorku po žihání [g].

#### 4.4.5 Stanovení výměnných kationtů

Stanovení výměnných sodných, draselných, vápenatých a hořečnatých kationtů bylo provedeno podle Podlešákové a kol., 1992 [78]. Stanovení kationtů bylo provedeno ve výluhu octanem amonným. Účelem této metody bylo vytěsnit výměnné kationty ze zeminy opakovanou extrakcí roztokem octanu amonného o pH 7,0 a jednotlivé kationty stanovit pomocí atomové absorpční spektrometrie.

Do čtyř kádinek o objemu 100 ml bylo naváženo 10 gramů zeminy (dva vzorky z každého směsného vzorku). Zemina byla přelita 20 ml octanu amonného o koncentraci 1 mol/l a vzorky byly promíchány. Po důkladném promíchání byly kádinky ponechány v klidu po dobu 30 minut. Po této době se zemina usadila na dně kádinek a eluát byl přes skládaný filtr sléván do odměrné baňky o objemu 100 ml. Zemina v kádince byla vymývána dekantací dvěma opakovanými dávkami 20 ml roztoku octanu amonného o koncentraci 1 mol/l. Poté byla zemina přenesena na filtr, kde byla promývána roztokem octanu, dokud byla odměrná

baňka doplněna po značku. Doba stání mezi jednotlivými promýváními 20 ml octanu amonného dosahovala 30 minut.

Mezitím byly připraveny směsné standardní roztoky pro kalibraci. Ze zásobního standardního roztoku pro draslík o koncentraci 0,01 mol/l a zásobního standardního roztoku pro sodík o koncentraci 0,01 mol/l byl připraven směsný standardní roztok pro draslík (K) a sodík (Na). Výsledná koncentrace K ve směsném standardním roztoku byla 2 mmol/l a Na byla 4 mmol/l. Dále byl připraven směsný standardní roztok pro vápník (Ca) a hořčík (Mg) ze zásobního standardního roztoku pro Mg o koncentraci 0,01 mol/l a zásobního standardního roztoku pro Ca o koncentraci 0,025 mol/l. Výsledná koncentrace Mg ve směsném standardním roztoku byla 0,4 mmol/l a Ca byla 5 mmol/l.

Ze směsných standardních roztoků byly připraveny kalibrační roztoky. Do šesti odměrných baněk o objemu 50 ml bylo pomocí mikropipety a skleněné pipety dávkováno 0,00 – 1,25 – 2,50 – 5,00 – 7,50 – 12,50 ml směsného standardního roztoku K a Na. Dále bylo k roztokům přidáno 25 ml octanu amonného o koncentraci 2 mol/l a doplněno demineralizovanou vodou po značku. Bylo vytvořeno šest kalibračních roztoků s různou koncentrací výměnného K (viz tab. 9)<sup>10</sup>. Obdobným způsobem byly připraveny kalibrační roztoky ze směsného standardního roztoku Ca a Mg. Do dalších šesti odměrných baněk o objemu 50 ml bylo dávkováno 0,00 – 1,25 – 2,50 – 5,00 – 7,50 – 10,00 ml směsného standardního roztoku Ca a Mg. Dále bylo k roztokům přidáno 10 ml octanu amonného o koncentraci 1 mol/l a 2,5 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 4 mol/l a doplněno demineralizovanou vodou po značku. Bylo vytvořeno šest kalibračních roztoků s různou koncentrací Ca a Mg (viz tab. 9).

Posléze bylo do čtyř odměrných baněk o objemu 25 ml odpipetováno 10 ml výluhu zeminy, ke kterým bylo přidáno 1,25 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 4 mol/l a baňky byly doplněny po značku demineralizovanou vodou. Takto připravené roztoky spolu s kalibračními roztoky byly proměřovány na FAAS.

---

<sup>10</sup> Pro účely následného měření pomocí FAAS byly molární koncentrace přepočítány na koncentrace hmotnostní [mg/l].

Tab. 9 Směsné standardní roztoky připravené pro stanovení výměnných kationtů

Směsný standardní roztok	Číslo vzorku	Hmotnostní koncentrace [mg/l]			
		Na	K	Mg	Ca
Sodík a draslík	1	0,00	0,00		
	2	2,30	1,95		
	3	4,60	3,90		
	4	9,20	7,80		
	5	13,80	11,70		
	6	23,00	19,50		
Vápník a hořčík	1			0,00	0,00
	2			0,24	5,00
	3			0,48	10,00
	4			0,96	20,00
	5			1,44	30,00
	6			1,92	40,00

Pro měření byl využit FAAS typu ContraAA 800D od německého výrobce AnalytikJENA. Kalibrační roztoky byly proměřovány při vlnových délkách 769,9 nm (K), 589,0 nm (Na), 422,7 nm (Ca) a 285,2 nm (Mg). Obsah výměnných kationtů byl stanoven dle vztahů (12–15):

$$Na_{ex} = 21,749 \cdot \frac{(\beta - \beta_b)}{m}, \quad (12)$$

$$K_{ex} = 12,788 \cdot \frac{(\beta - \beta_b)}{m}, \quad (13)$$

$$Mg_{ex} = 411,4 \cdot \frac{(\beta - \beta_b)}{m}, \quad (14)$$

$$Ca_{ex} = 249,6 \cdot \frac{(\beta - \beta_b)}{m}, \quad (15)$$

kde  $X_{ex}$  značí obsah výměnného prvku (Na, K, Mg, Ca) v půdě [mmol chem.ekv./kg],  $\beta$  představuje koncentraci prvku (Na, K, Mg, Ca) ve zředěném extraktu [mg/l],  $\beta_b$  značí koncentraci prvku ve zředěném slepém pokusu [mg/l] a  $m$  představuje hmotnost půdy naváženou pro analýzu [g].

#### 4.4.6 Stanovení kationtové výměnné kapacity

Pro výpočet KVK sloužily výsledky získané v kroku 4.4.5. Výpočet KVK byl proveden podle vztahu (16):



$$\text{KVK} = \frac{\text{Ca}}{20,04} + \frac{\text{Mg}}{12,1525} + \frac{\text{K}}{39,098} + \text{H}^+ + \frac{\text{Na}}{22,9898}, \quad (16)$$

kde (Ca, Mg, K, H<sup>+</sup>, Na) představují obsahy jednotlivých prvků [mg/kg] a KVK značí kationtovou výměnnou kapacitu [mmol chem.ekv./kg].

#### 4.4.7 Stanovení obsahu kovů

Stanovení obsahu kovů ve směsných vzorcích půdy bylo provedeno s pomocí XRF a FAAS. Obsah kovů byl nejprve stanoven pomocí rentgenové fluorescence na přístroji ELVA X ukrajinského výrobce ElvaTech, u něhož zdrojem ionizačního záření byla rhodiová výbojka. Pro stanovení těžkých (lehkých) kovů byl přístroj nastaven se vstupním napětím 45 (10) kV a proudem 10 (25) μA.

Přibližně 5 g směsného vzorku I a II bylo postupně umístěno do přístroje a s pomocí programového vybavení bylo v jednotlivých vzorcích půdy zobrazeno zastoupení nalezených prvků.

### 4.5 Bioloužení

Metoda kultivace byla zvolena jako vsádková (z angl. *batch*). Loužicí bioreaktor představovalo celkem 11 skleněných nádob o objemu 1000 ml s plastovým uzávěrem. Skleněné nádoby spolu s uzávěry byly předem sterilizovány horkou párou v autoklávu.

#### 4.5.1 Médium

Ke množení bakterií bylo zvoleno médium B80, jehož složení je uvedeno v tab. 2. Médium bylo připraveno den předem, přičemž obě složky média byly připraveny zvlášť. Hodnota jejich pH byla v souladu s [45, 46, 54] upravena na hodnotu 1,8. Proměrování pH bylo prováděno pomocí pH metru inoLab WTW s elektrodou SenTix 81. Dosažení požadované hodnoty pH bylo provedeno přidáním dalších 330 μl kyseliny sírové. Následně byly obě složky média smíchány.

#### 4.5.2 Kultivace bakterií

Do všech sterilizovaných skleněných nádob bylo odměřeno 100 ml média B80 spolu s 0,5 ml bakterií *A. ferrooxidans* (kromě nádoby č. 1, jež sloužila jako blank pro srovnání). Připravené vzorky uvádí tab. 10.

Tab. 10 Vzorčky pro vsádkovou kultivaci

Vzorek	Inokulace	Vzorek	Inokulace
1	100 ml B80	6	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>
2	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>	7	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>
3	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>	8	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>
4	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>	9	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>
5	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>	10	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>

Nádoby byly vloženy do třepačky s nastavenou rychlostí třepání 120 ot/min. Třepačka byla temperována na hodnotu 25 °C.

#### 4.5.3 Měření pH a ORP

Za účelem zjištění aktivity (růstu a množení) bakterií *A. ferrooxidans*, byly v intervalech 24 hodin měřeny hodnoty pH a ORP. Pokles hodnoty pH indikuje aktivitu bakterií [57–58, 66], neboť produkt jejich metabolismu představuje kyselina sírová, jež médium okyseluje. Díky použití vsádkové kultivace je tak možné monitorovat pokles hodnoty pH. Současně vysoký redoxní potenciál patří mezi klíčové parametry úspěšné kultivace *A. ferrooxidans* a jejich schopnosti oxidovat  $\text{Fe}^{2+}$  ionty na ionty  $\text{Fe}^{3+}$  [51]. Pro měření pH byl využit pH metr inoLab WTW s elektrodou SenTix 81, měření ORP bylo prováděno pomocí ORP metru inoLab WTW s platinovou elektrodou BlueLine 31 RX Schott. Měření pH a ORP bylo prováděno při konstantním promíchávání na magnetické míchačce bez zapnutého ohřevu).

#### 4.5.4 Měření železitých iontů

Aktivita bakterií byla dále měřena spektrofotometricky, kdy byly pomocí spektrofotometru Unicam UV 500 americké firmy Thermo Spectronic měřeny ionty  $\text{Fe}^{3+}$ .

Pro spektrofotometrickou analýzu bylo periodicky připravováno vždy devět vzorků z nádob 2–10 obsahujících bakterie *A. ferrooxidans* v médiu B80. Z každé nádoby bylo odebráno 250  $\mu\text{l}$  do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněno destilovanou vodou po rysku. Takto připravený vzorek byl přelit do kádinky o objemu 50 ml a ke vzorku bylo přidáno 1,25 ml kyseliny chlorovodíkové v ředění 1:1. Vzorek byl řádně promíchán a následně bylo k němu přidáno 2,5 ml thiokyanatanu draselného (KSCN). Přibližně 2 ml takto připraveného vzorku pro spektrofotometrickou analýzu bylo s pomocí stříkačky převedeno do křemíkové kyvety spektrofotometru.

Spektrofotometr byl nejprve zkalibrován a následně byla prováděna měření jednotlivých vzorků. Úrovně absorbance byly měřeny při vlnových délkách 480, 490, 500, 510 a 520 nm.

Důvodem měření při několika vlnových délkách bylo současné hledání vhodné vlnové délky pro měření iontů  $\text{Fe}^{3+}$ .

#### 4.5.5 Počítání bakterií

S pomocí optického mikroskopu CX41 japonské firmy Olympus byl sledován růst a množení bakterií. Ze vzorků 2–10 bylo odebráno 10  $\mu\text{l}$  média s bakteriemi a vloženo na podložní sklíčko Cyrus II s počítací komůrkou českého výrobce Meopta. Takto vytvořený preparát byl překryt krycím sklíčkem a vložen na stolek mikroskopu.

Po zapnutí mikroskopu spolu s programem Quick Photo Micro byl preparát pozorován při 400 $\times$  zvětšení (10 $\times$  zvětšení pomocí okuláru WHB a 40 $\times$  zvětšení pomocí tubusu). Počítání živých (pohybujících se) bakterií bylo prováděno na nejmenším čtverci počítací komůrky o rozměru 50  $\times$  50  $\mu\text{m}$ . Násobení počtu bakterií bylo prováděnou v souladu s [79]. Mezi jednotlivými pozorováními byla podložní sklíčka vymyta pomocí destilované vody a ethanolu. Po jejich vysušení byla připravena pro nanesení dalšího vzorku.

#### 4.5.6 Loužení pomocí *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Po osmi dnech, kdy byly v devíti nádobách bakterie kultivovány, byla do šesti z nich přidána navážka 10 g půdy ze směsného vzorku I a II. Navážka 10 g byla zvolena za účelem dodržení loužicího poměru 1:10. Připravené vzorky uvádí tab. 11, přičemž vzorky 8–10 sloužily jako blank pro srovnání.

**Tab. 11** Vzorky pro bioloužení

Vzorek pro bioloužení	Složení
2	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i> + 10 g směsného vzorku I
3	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i> + 10 g směsného vzorku I
4	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i> + 10 g směsného vzorku I
5	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i> + 10 g směsného vzorku II
6	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i> + 10 g směsného vzorku II
7	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i> + 10 g směsného vzorku II

Byly prováděny celkem 3 odběry po 24 hodinách, přičemž půda byla loužena po dobu 24, 48 a 72 hodin.

První odběr (po 24 hodinách loužení) byl proveden devátý den kultivace. Odebráno bylo 25 ml ze vzorků 2–7 a tyto byly přemístěny do šesti centrifugačních zkumavek. Zkumavky byly vloženy do stolní centrifugy Rotanta 460 R německého výrobce Hettich. Vzorky byly centrifugovány po dobu 10 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Po uplynutí této doby

vzorky z centrifugy byly vyjmuty a získaný supernatant byl přefiltrován s pomocí 20ml plastové stříkačky s filtrem z regenerované celulózy o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$  a přenesen do nové centrifugační zkumavky. Současně bylo odebráno 25 ml ze vzorků 8–10 sloužících jako blank. Analogickým způsobem bylo postupováno při odběru po 48 a 72 hodinách. Získané přefiltrované supernatanty a blanky byly uloženy v chladničce při 5 °C. Jedenáctý den kultivace byl proveden poslední odběr (po 72 hodinách) a filtráty získané za 24 a 48 hodin loužení spolu s blanky byly analyzovány pomocí FAAS.

#### 4.6 Chemické loužení

Pro srovnání efektivity biologického loužení bylo provedeno rovněž chemické loužení pomocí 2M  $\text{HNO}_3$  a 0,5 – 0,25 – 0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Hmotnostní koncentrace kovů byla stanovena pomocí FAAS. Obdobně, jako v případě stanovení výměnných kationtů v oddíle 4.4.5 byl využit FAAS typu ContrAA 800D od německého výrobce AnalytikJENA.

Směsné vzorky na vzduchu vysušené při laboratorní teplotě byly namlety. Ze směsného vzorku I bylo odváženo 4 × 5 g půdy a současně bylo totéž množství odváženo ze směsného vzorku II. Dva vzorky z každého směsného vzorku byly smíchány s 50 ml 2M kyseliny dusičné ( $\text{HNO}_3$ )<sup>11</sup> a zbylé dva vzorky s 50 ml 0,5M kyselinou sírovou ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Všech 8 vzorků bylo ponecháno 6 hodin na třepačce. Vzorky byly přefiltrovány za sníženého tlaku a vzniklý filtrát byl použit pro měření pomocí FAAS (viz tab. 12).

**Tab. 12** Vzorky připravené ke stanovení obsahu kovů pomocí FAAS

Médium	Název vzorku	Médium	Název vzorku
$\text{HNO}_3$	I A	$\text{HNO}_3$	II A
	I B		II B
$\text{H}_2\text{SO}_4$	I A	$\text{H}_2\text{SO}_4$	II A
	I B		II B

Měření probíhalo v plameni acetylen-vzduch, přičemž přístroj byl nastaven podle doporučení výrobce. Měření připravených roztoků probíhalo po dobu 3–5 s. Pomocí softwaru a programu MS excel byly vyhodnoceny obsahy kovů v jednotlivých směsných vzorcích.

<sup>11</sup> Kyselina dusičná o koncentraci 2 mol/l je normovaná pro použití v analýze půd při stanovování prvků obsažených v půdách dle vyhlášky Ministerstva životního prostředí č. 13/1994 Sb. [86].

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Studii byly podrobeny dva směsné vzorky půdy sesbírané v prostoru vrbětického areálu, jež obsahovaly mírně odlišné složení půdy a vzhledem k různým místům odběru též odlišné zastoupení těžkých kovů. S pomocí živného média B80 byly kultivovány bakterie *A. ferrooxidans*, které byly v experimentu využity pro jejich schopnost loužit těžké kovy z kontaminovaných půd. Efektivita procesu bioloužení byla následně srovnána s klasickou metodou extrakce těžkých kovů pomocí kyselin.

### 5.1 Charakteristika půd

Vzorky půdy při použití KCl, H<sub>2</sub>O a CaCl<sub>2</sub> při stanovení hodnoty pH ve všech případech vykazovaly neutrální půdní reakci. Naměřené hodnoty pH obou směsných vzorků půdy lze s využitím [73–74] hodnotit jako neutrální. Naměřené hodnoty pH spolu s hodnotou konduktivity uvádí tab. 13.

**Tab. 13** Konduktivita a pH půdy

Směsný vzorek	Konduktivita [μS/cm]	Médium	Navážka půdy [g]	pH	Půdní reakce dle [73–74]
I	383,5 ± 6,4	KCl	5,0181 ± 0,0001	6,36 ± 0,11	neutrální
		CaCl <sub>2</sub>	5,0334 ± 0,0255	6,58 ± 0,03	
		H <sub>2</sub> O	4,9995 ± 0,0114	6,70 ± 0,03	
II	424,5 ± 4,9	KCl	5,0403 ± 0,0008	6,26 ± 0,17	neutrální
		CaCl <sub>2</sub>	5,0045 ± 0,0112	6,72 ± 0,01	
		H <sub>2</sub> O	5,0130 ± 0,0256	7,06 ± 0,01	

Sušina v obou směsných vzorcích půdy dosahovala hodnoty přibližně 97 %. Procentuální zastoupení oxidovatelného uhlíku v obou směsných vzorcích současně nepřesahovalo hodnotu 10 %. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tab. 14.

**Tab. 14** Obsah sušiny a oxidovatelného uhlíku v půdě

Směsný vzorek	I	II
Navážka půdy [g]	2,0200 ± 0,0170	2,0325 ± 0,0248
Obsah sušiny [%]	96,92 ± 0,21	96,68 ± 0,21
Navážka půdy [g]	5,0601 ± 0,0767	5,1169 ± 0,1288
Hmotnost půdy po 105 °C [g]	4,4310 ± 0,0633	4,6440 ± 0,5735
Hmotnost půdy po 550 °C [g]	4,0299 ± 0,0228	4,0945 ± 0,1399
Obsah oxidovatelného uhlíku [%]	9,04 ± 1,81	6,78 ± 1,51

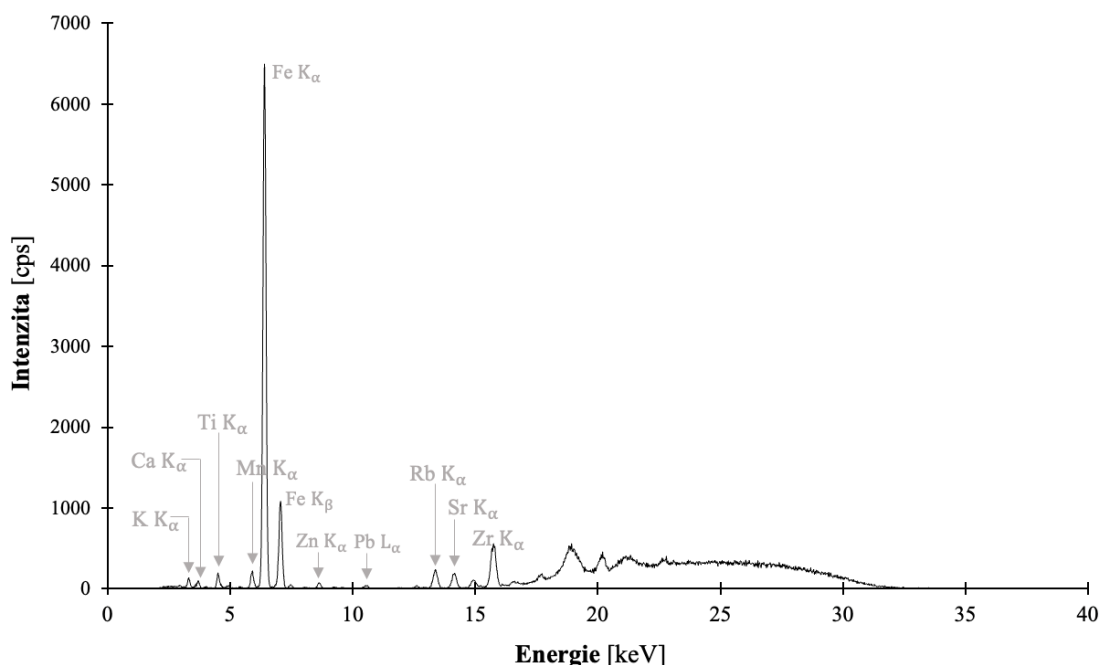
Koncentrace sodíku, draslíku, vápníku a hořčíku ve vzorcích půdy uvádí tab. 15. Hodnoty hmotnostních koncentrací jednotlivých prvků byly spočítány dle provedené kalibrace. Tab. 15 současně uvádí obsahy výměnných prvků a hodnoty kationtové výměnné kapacity.

Výpočet kationtové výměnné kapacity byl proveden dle vztahu (16) pro oba směsné vzorky a pro výpočet obsahu výměnného prvku byly využity vztahy (12–15). Výstupy měření slepých pokusů pomocí FAAS uvedly, že koncentrace prvků ve zředěném slepém pokusu je rovna 0. Z tohoto důvodu byla hodnota  $\beta_b$  ve výpočtech obsahu výměnného prvku z výše uvedených vztahů rovna nule.

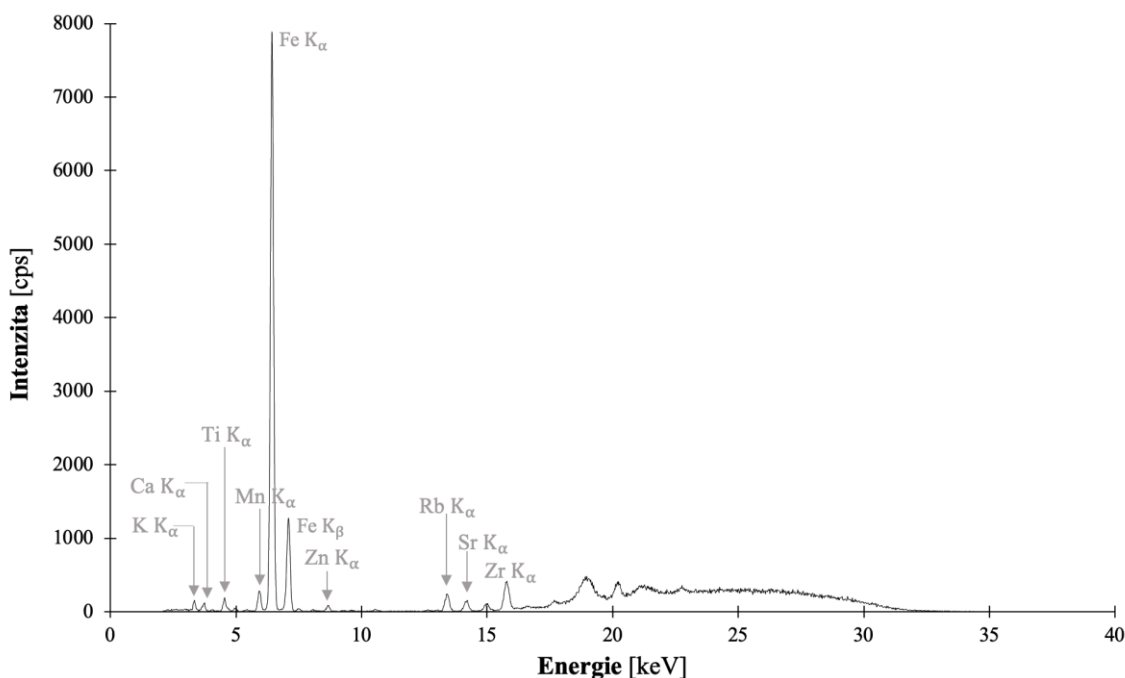
**Tab. 15** Kationtová výměnná kapacita, koncentrace a obsah výměnných prvků v půdě

Směsný vzorek		I	II
Koncentrace prvku [mg/l]	Na	$1,67 \pm 0,66$	$2,69 \pm 0,02$
	K	$0,55 \pm 0,04$	$1,75 \pm 0,04$
	Ca	$35,10 \pm 0,69$	$52,09 \pm 1,07$
	Mg	$1,88 \pm 0,07$	$2,98 \pm 0,02$
Obsah výměnného prvku [mmol chem. ekv./kg]	Na <sub>ex</sub>	$3,60 \pm 1,44$	$5,70 \pm 0,24$
	K <sub>ex</sub>	$0,69 \pm 0,04$	$2,18 \pm 0,02$
	Ca <sub>ex</sub>	$871,31 \pm 2,56$	$1268,77 \pm 16,25$
	Mg <sub>ex</sub>	$76,92 \pm 13,40$	$119,49 \pm 4,85$
Kationtová výměnná kapacita		$1,99 \pm 0,01$	$3,01 \pm 0,05$

S pomocí XRF byly v obou směsných vzorcích identifikovány lehké a těžké kovy. Výstupy rentgenové fluorescence uvádí obr. 9 a 10.



**Obr. 9** Kovy ve směsném vzorku I (stanoveno pomocí XRF)



**Obr. 10** Kovy ve směsném vzorku II (stanoveno pomocí XRF)

Jak je patrné z obr. 9 a 10, v obou vzorcích půdy byl nalezen draslík, vápník, titan, mangan, železo, zinek, rubidium, stroncium a zirkon. Ve vzorku I byla navíc identifikována přítomnost olova. Kovy nalezené s pomocí rentgenové fluorescence (vyjma draslíku a vápníku) sloužily v další části experimentu jako vstup pro identifikaci a stanovení hmotnostních koncentrací vyloučených prvků pomocí klasické extrakce a bioloužením.

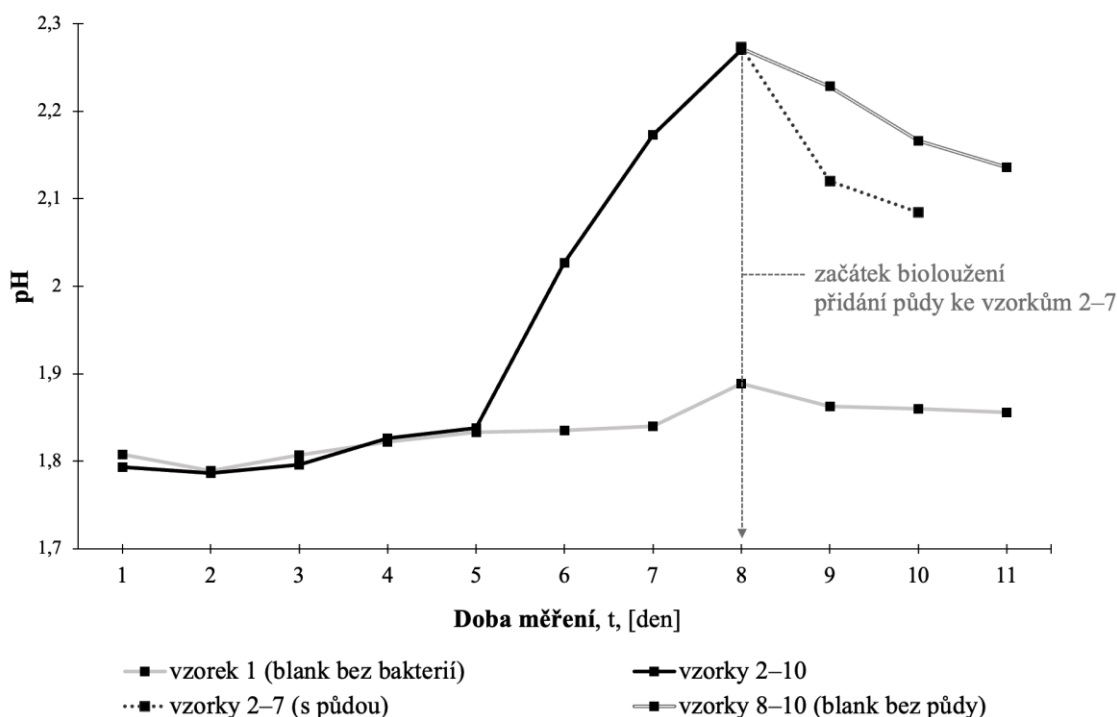
## 5.2 Dynamické změny pH a oxidačně redukčního potenciálu

U deseti vzorků připravených pro vsádkovou kultivaci bakterií a následné bioloužení byly změřeny vstupní hodnoty, jež uvádí tab. 16.

**Tab. 16** Hodnoty pH a ORP vzorků první den kultivace

Vzorek	Inokulace	pH	ORP, mV
1	100 ml B80	1,808	545,1
2	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>	1,802	550,2
3	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>	1,785	549,4
4	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>	1,805	550
5	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>	1,796	549,1
6	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>	1,791	549
7	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>	1,788	549
8	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>	1,789	550,5
9	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>	1,791	549,7
10	100 ml B80 + 0,5 ml <i>A. ferrooxidans</i>	1,795	549,2

Naměřené hodnoty pH korelují s hodnotou pH připraveného kultivačního média B80. Dynamické změny pH důsledku činnosti bakterií po dobu 11 dnů graficky znázorňuje obr. 11.

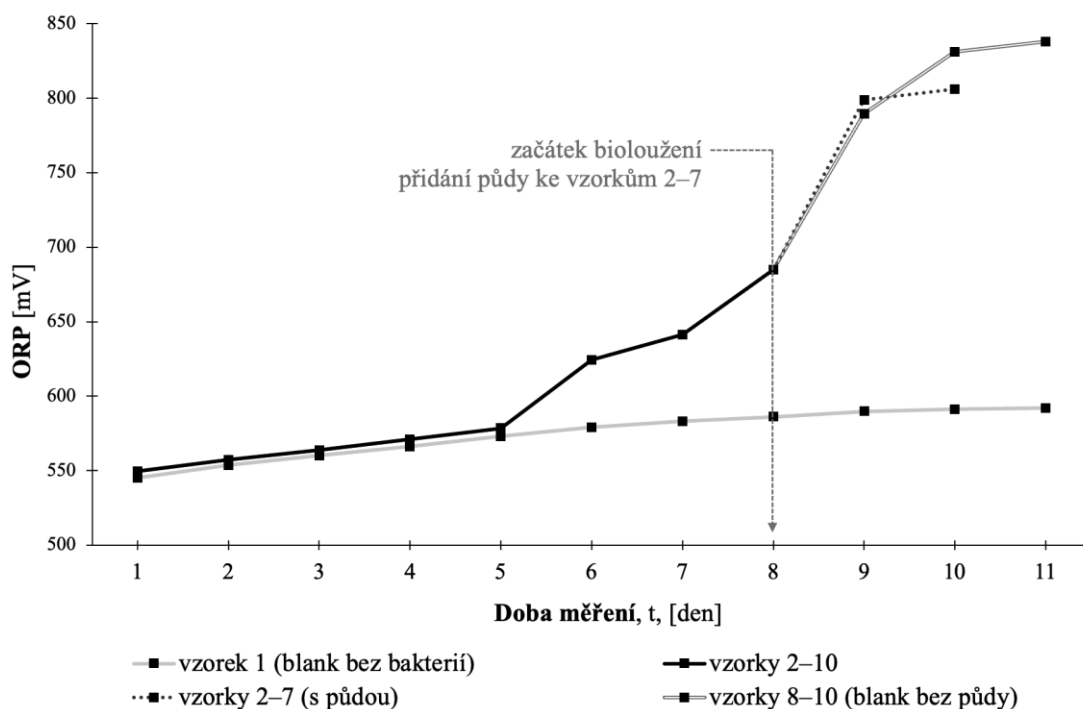


**Obr. 11** Změny pH v průběhu kultivace a loužení

Pro názornější zobrazení byly uvedeny průměrné hodnoty pH jednotlivých vzorků. Jak je patrné z obr. 11, šestý den kultivace začalo u vzorků 2–10 docházet k navyšování hodnoty pH, která dále rostla až do osmého dne, kdy byly ke vzorkům 2–7 přidány směsné vzorky půdy (směsný vzorek I ke vzorkům 2–4 a ke vzorkům 5–7 směsný vzorek II) a pH začalo klesat. Vzhledem k zásadité povaze půdy lze konstatovat, že hodnota pH pravděpodobně začala klesat vlivem činnosti bakterií. Naměřené hodnoty se do jisté míry shodují s výsledky studií [61–62], jež uvádí, že růst a množení bakterií je doprovázeno růstem hodnoty pH, přičemž samotná bioloužící aktivita *A. ferrooxidans* je doprovázena poklesem pH v důsledku jejich metabolické tvorby kyseliny sírové. Rozdílnost naměřených hodnot ve srovnání se studii spočívá v delším období růstu pH. Ačkoli experimentálně naměřené hodnoty modelují všeobecný trend růstu a následného poklesu pH, odlišnost v podobě delší doby růstu pH může být zapříčiněna odlišnými podmínkami kultivace (zejména použitím média B80).



Dynamické změny ORP jsou graficky znázorněny na obr. 12. Obdobně jako v případě změn pH byly uvedeny průměrné hodnoty ORP pro jednotlivé vzorky.

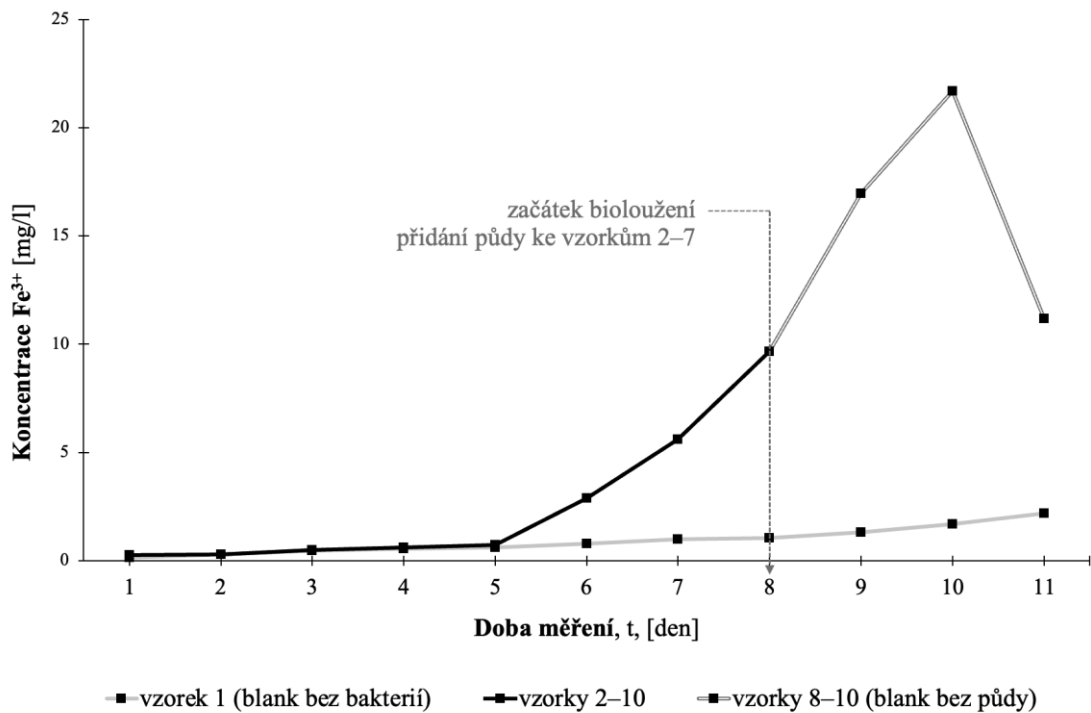


**Obr. 12** Změny ORP v průběhu kultivace a loužení

Vývoj hodnot ORP v průběhu kultivace koreluje s výsledky studie [63], kdy se hodnota ORP v průběhu kultivace zvyšuje, a to zejména v průběhu třetího až pátého dne. Ve srovnání se vzorkem 1, jež neobsahoval kulturu *A. ferrooxidans*, lze pozorovat, že pátý den kultivace začalo docházet k růstu hodnot ORP v důsledku činnosti bakterií.

### 5.3 Koncentrace železitých iontů v průběhu kultivace

Hodnoty koncentrace železitých iontů v průběhu kultivace ilustruje graf na obr. 13. Růst koncentrace  $\text{Fe}^{3+}$  iontů indikuje aktivitu bakterií, jež oxidují ionty  $\text{Fe}^{2+}$ , které byly dodány ve formě heptahydrátu síranu železnatého ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) v kultivačním médiu.

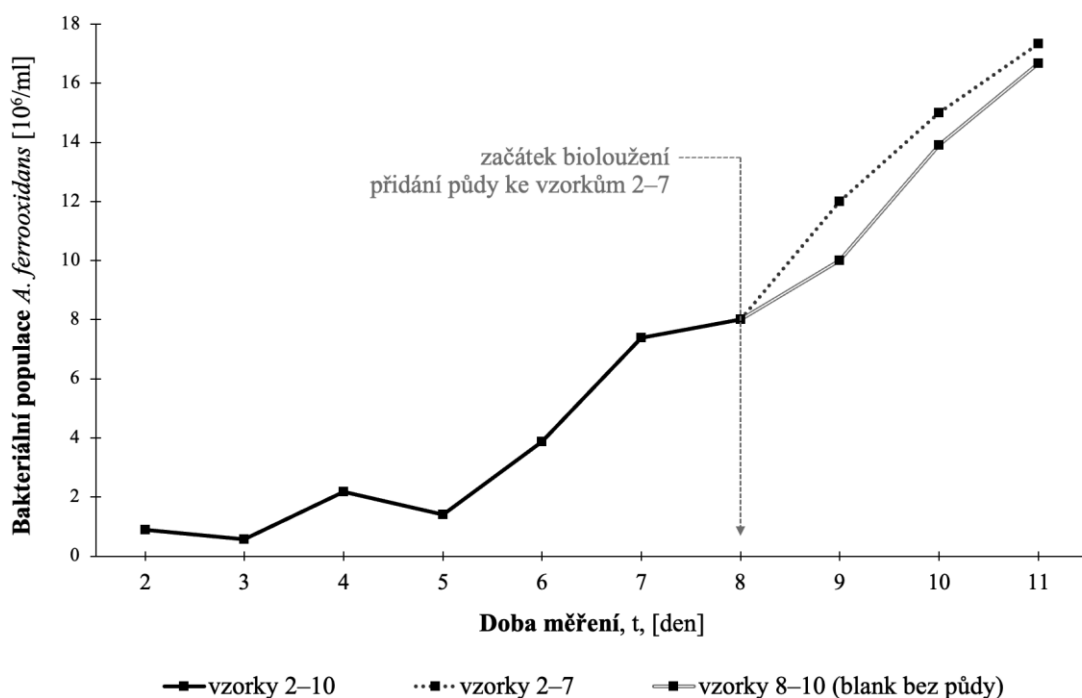


**Obr. 13** Změny koncentrace iontů  $\text{Fe}^{3+}$  v průběhu kultivace

Jak je patrné z obr. 13, aktivita bakterií se začala ve srovnání se vzorkem 1, jež neobsahoval bakteriální kulturu, projevovat šestý den kultivace. Své nejvyšší úroveň dosáhla desátý den a následně začala klesat. Z důvodu zakalení vzorků 2–7 přidanou půdou byly koncentrace  $\text{Fe}^{3+}$  měřeny od osmého dne pouze ve vzorcích bez půdy.

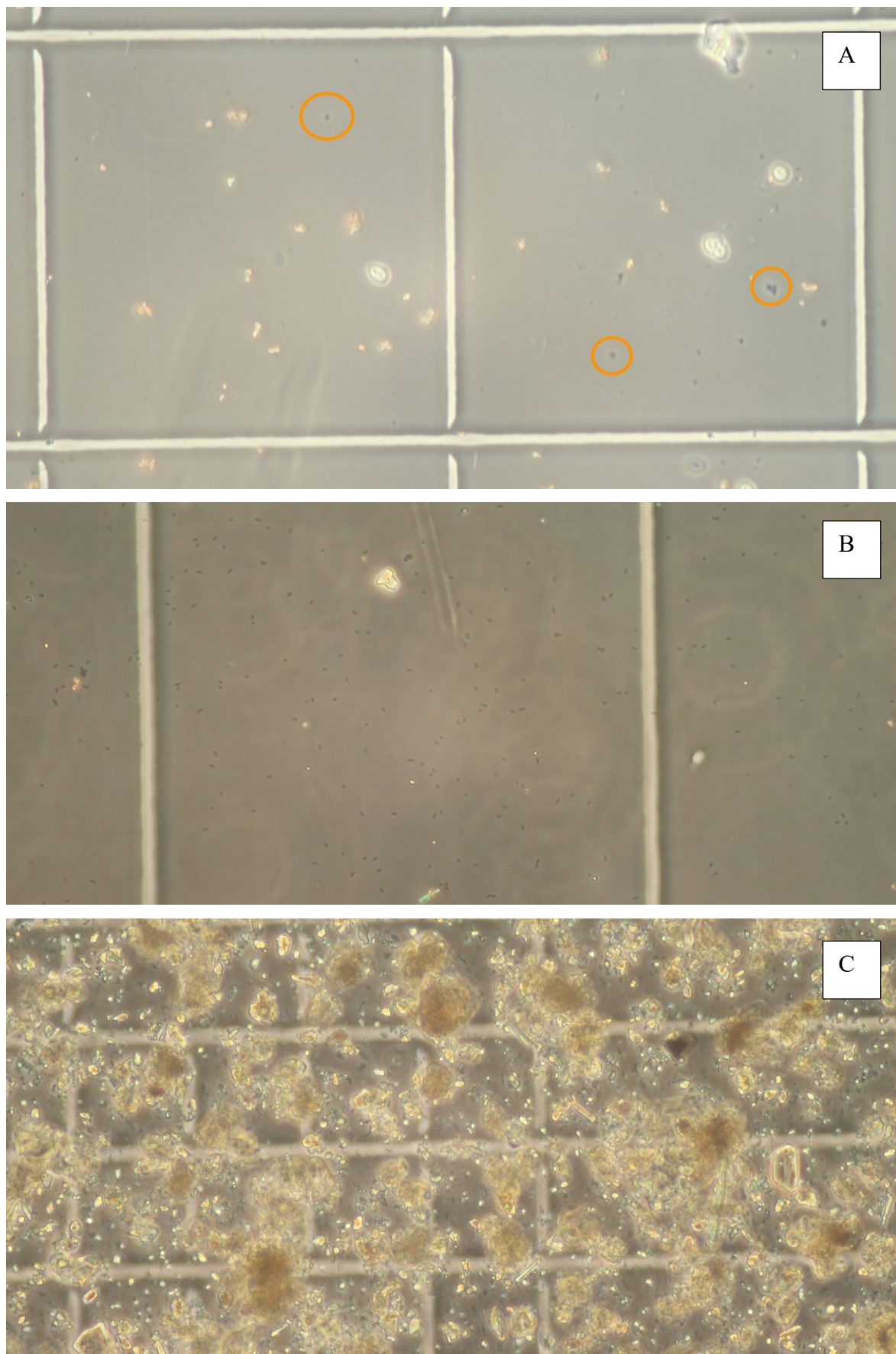
#### 5.4 Růstová křivka bakterií

Růst kolonií bakterií byl zaznamenáván od druhého dne kultivace, tedy den poté, co byly vzorky 2–10 naočkovány kulturou *A. ferrooxidans*. Růstová křivka je graficky znázorněna na obr. 14.



**Obr. 14** Růstová křivka bakterií *A. ferrooxidans*

Z grafu na obr. 14 je pozorovatelná lagová fáze přibližně mezi druhým a pátým dnem následovaná fází zrychleného růstu do konce měření, tedy jedenáctého dne. Z důvodu krátké doby kultivace není pozorována fáze zpomaleného růstu. S ohledem na výsledky publikovaných studií lze konstatovat, že pro růst bakterií a efektivitu loužení se osmý den, kdy byl započat proces bioloužení, neprojevil jako nejvhodnější. Kultivace se v tomto bodě nacházela ve fázi zrychleného růstu. I přes to, že dle výsledků studie [67] by osmý den se mohl jevit jako dostatečně dlouhá doba od počátku kultivace, růstová křivka následujících dní naznačuje, že růstová fáze stále pokračuje. Za nastavených podmínek experimentu by bylo vhodnější započít bioloužení mezi 12–14 dnem kultivace. Pořízené fotografie bakterií uvádí obr. 15, kde fotografie (A) byla pořízena čtvrtý den kultivace, (B) sedmý den kultivace a (C) jedenáctý den, kdy se půda ve vzorku loužila po dobu 72 h.



Obr. 15 Fotografie bakterií *A. ferrooxidans*

### 5.5 Loužení kovů pomocí *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Devátý den od začátku kultivace bylo započato loužení kovů z kontaminované půdy, a to po 24, 48 a 72 hodinách. Hmotnostní koncentrace vyloužených prvků změřených pomocí FAAS uvádí tab. 17.

**Tab. 17** Koncentrace prvků v půdě po bioloužení

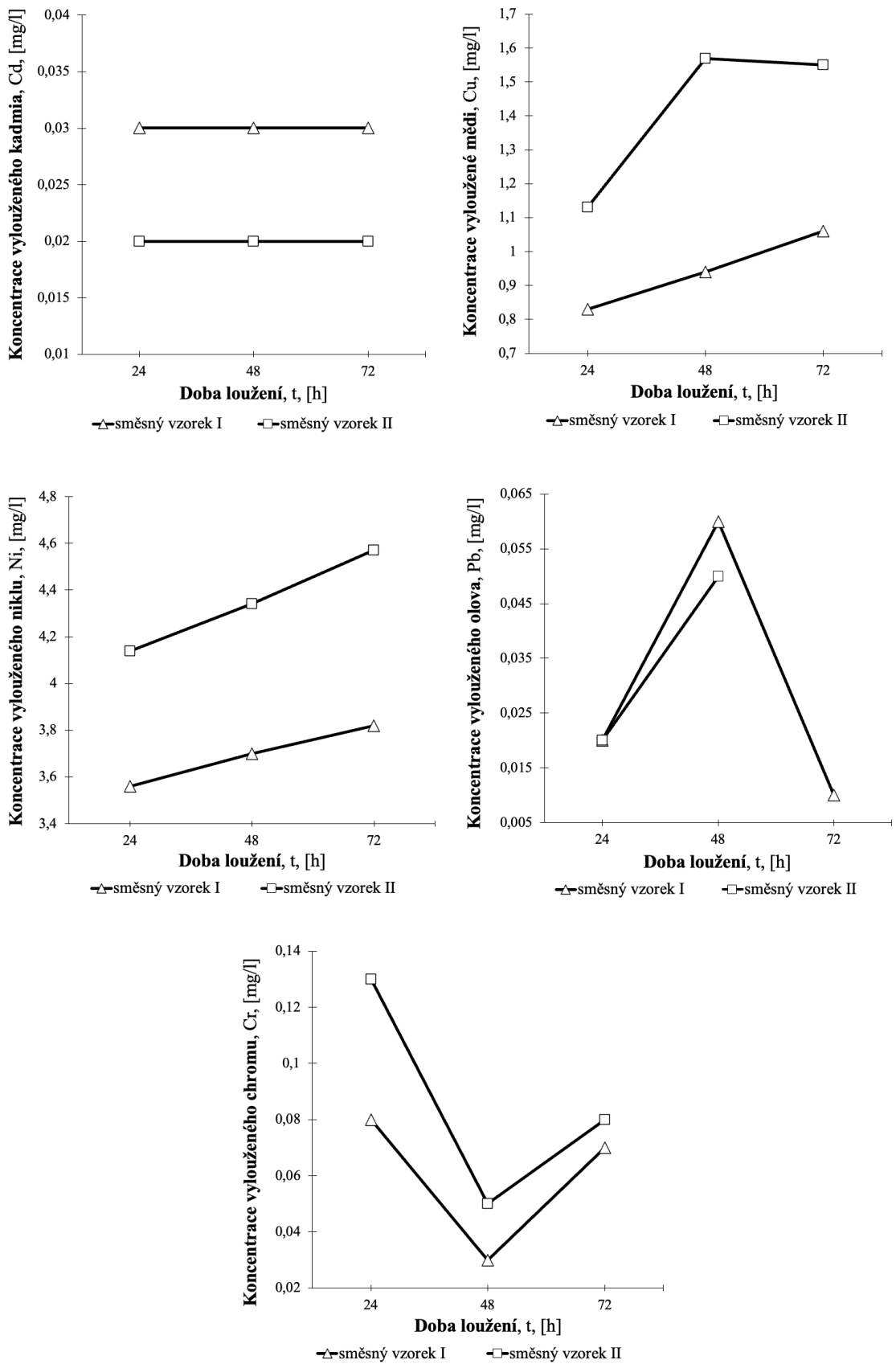
Směsný vzorek	Prvek	Koncentrace prvku po bioloužení [mg/l] <sup>12</sup>		
		24 hodin	48 hodin	72 hodin
I	Cd	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
	Cu	0,83 ± 0,04	0,94 ± 0,18	1,06 ± 0,48
	Zn	2,60 ± 0,08	ND	ND
	Ni	3,56 ± 0,07	3,70 ± 0,12	3,82 ± 0,11
	Fe	> DL	> DL	> DL
	Pb	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,00
	Mn	> DL	> DL	> DL
	Sb	> DL	1,94 ± 0,00	ND
	Cr	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,01
	II	Cd	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Cu		1,13 ± 0,15	1,57 ± 0,47	1,55 ± 0,43
Zn		6,69 ± 0,61	ND	ND
Ni		4,14 ± 0,61	4,34 ± 0,52	4,57 ± 0,38
Fe		> DL	> DL	> DL
Pb		0,02 ± 0,02	0,05 ± 0,01	< DL
Mn		> DL	> DL	> DL
Sb		1,58 ± 0,22	< DL	ND
Cr		0,13 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,08 ± 0,00

Vzhledem ke skutečnosti, že nebyly nalezeny všechny prvky, které byly identifikovány pomocí rentgenové fluorescenční metody, jmenovitě Ti, Rb, Sr a Zr, ale pouze Mn, Fe a Zn, bylo provedeno rozšíření hledaných těžkých kovů o Cd, Cu, Ni, Pb, Sb a Cr.

Jak uvádí data v tab. 17, hmotnostní koncentrace vylouženého Zn byla změřena pouze při prvním vyloužení po 24 hodinách a hodnoty koncentrací Fe, Mn a Sb byly vyšší (příp. nižší či nebyla identifikována) než limit detekce pro vytvořenou kalibraci. Z tohoto důvodu bylo při dalším hodnocení pracováno pouze s hmotnostními koncentracemi Cd, Cu, Ni, Pb a Cr.

Jednotlivé koncentrace vylouženého Cd, Cu, Ni, Pb a Cr po 24, 48 a 72 hodinách jsou graficky znázorněny na obr. 16.

<sup>12</sup> DL = detection limit (limit detekce); ND = no data (žádné údaje)



Obr. 16 Koncentrace vylouženého Cd, Cu, Ni, Pb a Cr po bioloužení

Koncentrace vylouženého Cd byla na rozdíl od ostatních kovů v průběhu 24–72 hodin konstantní. Ze směsného vzorku I bylo vylouženo 0,03 mg/l Cd a ze směsného vzorku II 0,02 mg/l Cd.

Cu vyloužená ze vzorku I vykazovala rostoucí tendenci, tedy nejvyšší hodnoty vyloužení bylo dosaženo po 72 h. Koncentrace mědi vyloužené po 72 h byla přibližně o 28 % vyšší než v prvním loužení po 24 h. V případě vzorku II byla tato rostoucí tendence pozorována mezi prvním a druhým loužením. Množství mědi vyloužené po 72 h bylo nepatrně nižší, přičemž stále bylo o 37 % vyšší než po 24 h.

Koncentrace vylouženého Ni z obou vzorků půdy vykazovala rostoucí tendenci. Rozdíl mezi prvním a třetím loužením u vzorku I činil přibližně 7 % a u vzorku II byla koncentrace vylouženého niklu po 72 h o 10,4 % vyšší než po 24 h.

Tendence rostoucího množství vylouženého prvku s dobou bioloužení již nebyla v případě Pb a Cr pozorována. V případě vylouženého Pb bylo po 48 h u směsného vzorku I vylouženo 3× větší množství než po 24 h, u vzorku II bylo vyloužené množství po 48 h 2,5× větší než při prvním bioloužení. V případě Cr byla rostoucí tendence pozorována mezi druhým a třetím bioloužením, přičemž ve vzorku I bylo po 72 h vylouženo 2,3× více Cr a ve vzorku II bylo při třetím loužení vylouženo 1,6× více Cr než po 48 h. V obou případech bylo po 24 h vylouženo více Pb a Cr než po 48 a 72 h.

## 5.6 Loužení kovů chemickou cestou

Chemickým rozkladem pomocí kyselin ( $\text{HNO}_3$  a  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) o různé molární koncentraci (2 – 0,5 – 0,25 – 0,1M) byla provedena tzv. klasická chemická metoda extrakce. Hmotnostní koncentrace vyloužených kovů uvádí tab. 18. Obdobně jako v případě koncentrací vyloužených prvků pomocí bioloužení rovněž v případě klasické metody extrakce nebyly zaznamenány hodnoty u Fe, Mn a Sb.

Tab. 18 Koncentrace prvků v půdě po chemickém loužení

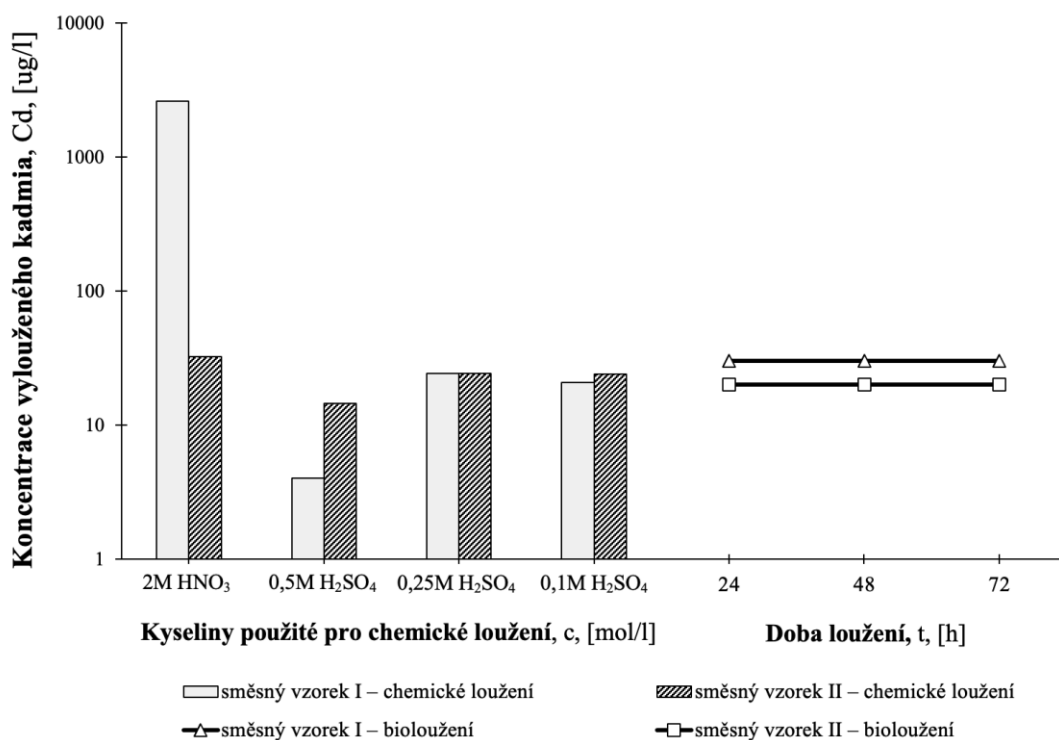
Směsný vzorek	Prvek	Koncentrace prvku [mg/l] <sup>13</sup>			
		2M HNO <sub>3</sub>	0,5M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
I	Cd	2,63 ± 1,41	< DL	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01
	Cu	3,88 ± 0,01	2,08 ± 0,49	1,32 ± 0,63	1,40 ± 0,54
	Zn	8,66 ± 0,96	5,91 ± 0,35	3,95 ± 1,02	3,39 ± 0,68
	Ni	4,54 ± 0,37	3,48 ± 0,77	1,89 ± 0,08	1,60 ± 0,44
	Fe	> DL	> DL	> DL	> DL
	Pb	6,69 ± 2,37	0,84 ± 0,27	0,50 ± 0,16	0,40 ± 0,27
	Mn	> DL	> DL	> DL	> DL
	Sb	> DL	1,94 ± 0,00	ND	ND
	Cr	0,56 ± 0,01	1,58 ± 0,26	0,83 ± 0,02	0,53 ± 0,07
	II	Cd	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Cu		2,31 ± 1,11	2,06 ± 0,50	1,38 ± 0,29	1,27 ± 0,24
Zn		4,63 ± 1,86	8,08 ± 3,41	3,83 ± 1,15	3,43 ± 0,94
Ni		2,65 ± 0,35	3,27 ± 0,30	2,16 ± 0,32	1,68 ± 0,49
Fe		> DL	> DL	> DL	> DL
Pb		2,82 ± 0,13	0,79 ± 0,25	0,53 ± 0,17	0,47 ± 0,33
Mn		> DL	> DL	> DL	> DL
Sb		1,58 ± 0,22	< DL	ND	ND
Cr		0,41 ± 0,11	1,47 ± 0,10	1,81 ± 0,64	0,50 ± 0,05

## 5.7 Porovnání bioloužení s klasickou metodou extrakce

Za účelem porovnání hodnot koncentrací vyloužených prvků bylo potřeba pracovat pouze s prvky, které byly identifikovány v obou procesech – bioloužení za použití bakterií *A. ferrooxidans* a klasickou metodou extrakce, rozkladem pomocí kyselin. Komparaci výsledků těchto dvou metod byly podrobeny prvky: Cd, Cu, Ni, Pb a Cr. Jednotlivá srovnání mezi hodnotami koncentrací vyloužených prvků uvádí grafy na obr. 17–21.

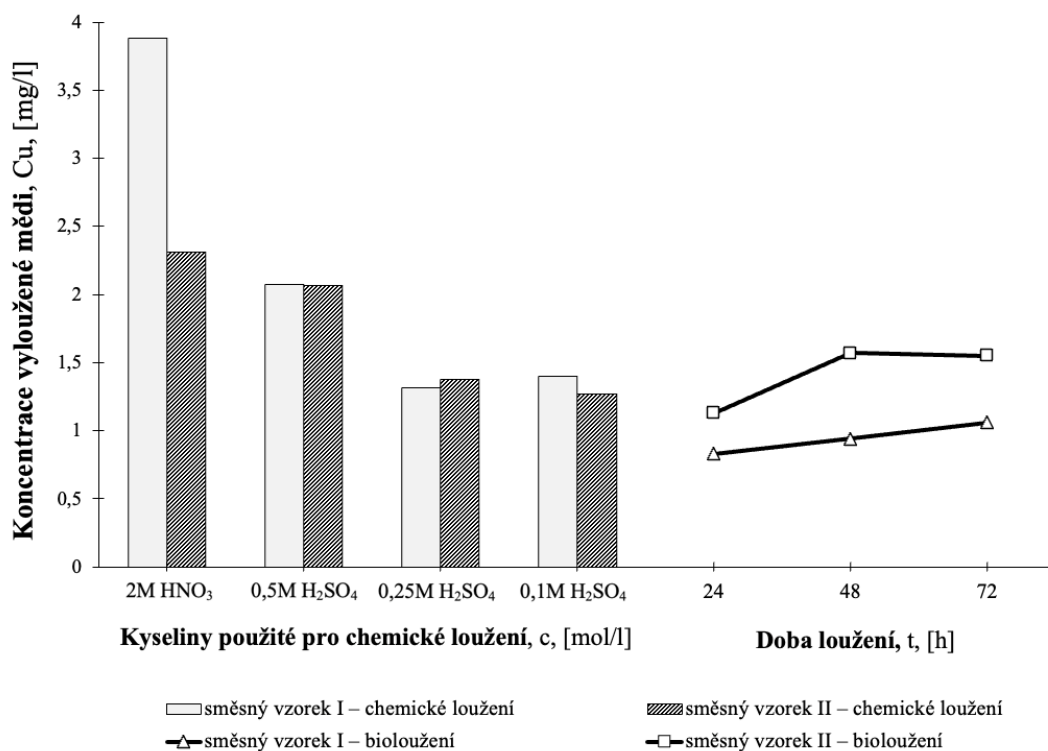
<sup>13</sup> DL = detection limit (limit detekce); ND = no data (žádné údaje)





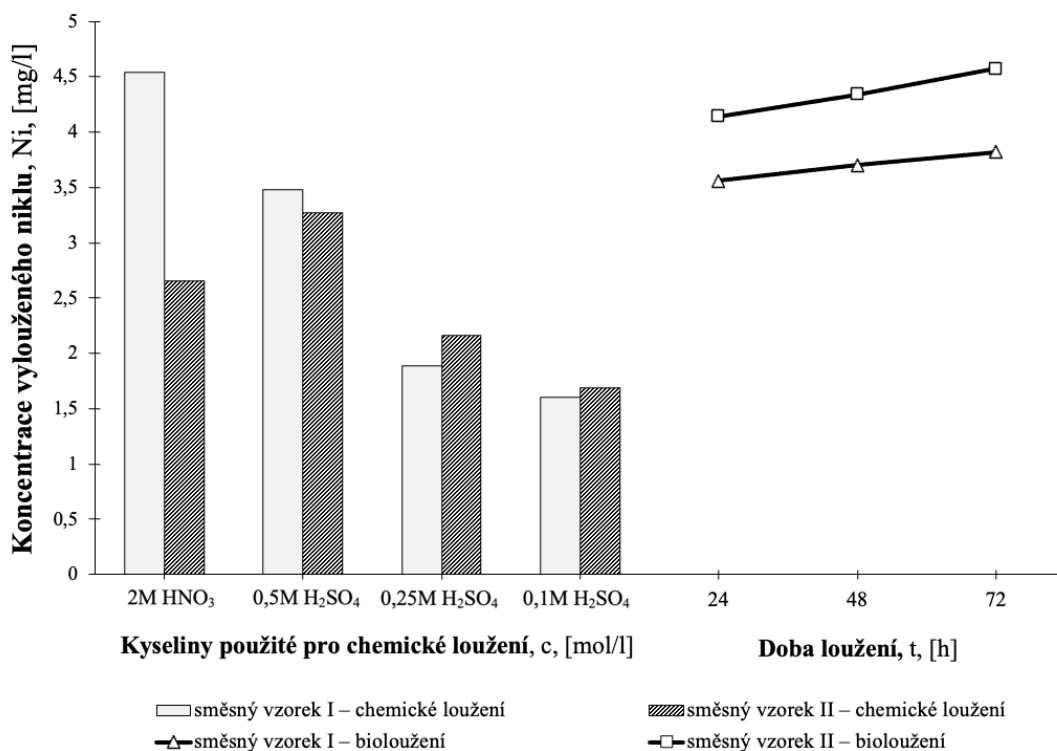
**Obr. 17** Vyloužení kadmia chemickou cestou a bioloužením: komparace

Pro účely grafického porovnání koncentrací vylouženého Cd chemickou cestou a bioloužením bylo zapotřebí hodnoty hmotnostních koncentrací přepočítat na µg/l a převést do logaritmického měřítko. Důvodem byly vysoké koncentrace vylouženého Cd u směsného vzorku I při použití 2M HNO<sub>3</sub>. Z obr. 17 je patrné, že koncentrace vylouženého Cd pomocí *A. ferrooxidans* jsou srovnatelné s vylouženým množstvím Cd pomocí 0,5–0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a rovněž s 2M HNO<sub>3</sub> v případě vzorku II. Bakterie současně dokázaly ze vzorku I vyloužit o 50 % více Cd než 0,25M a 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u téhož vzorku.



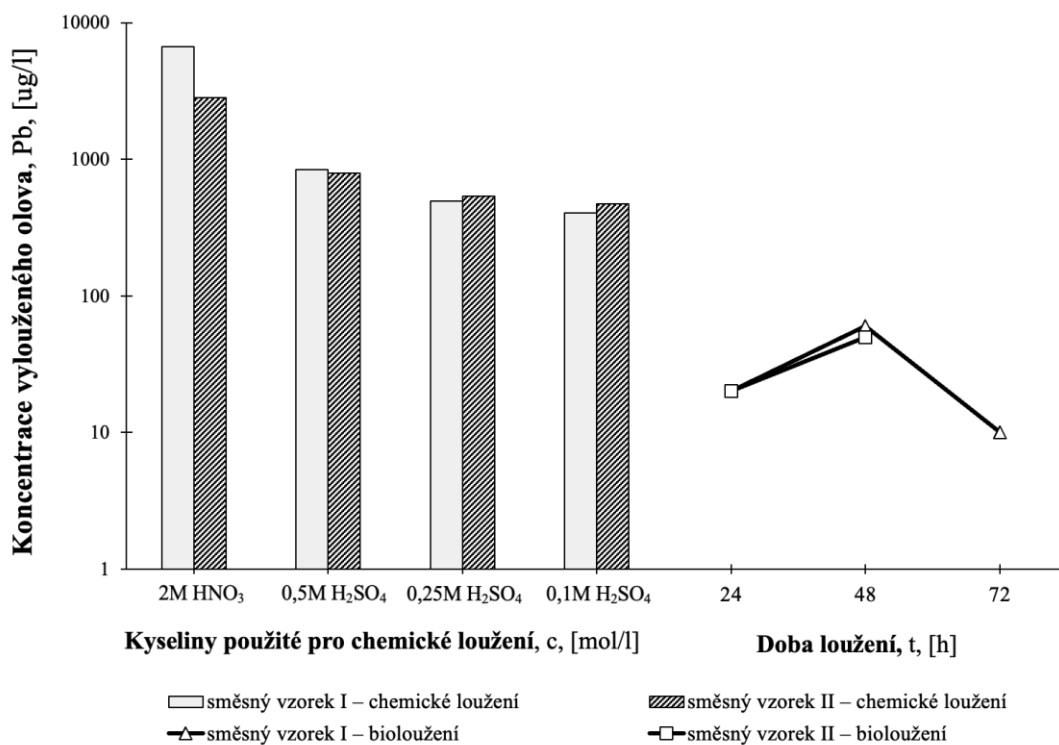
**Obr. 18** Vyloužení mědi chemickou cestou a bioloužením: komparace

Grafické srovnání vylouženého obsahu Cu klasickou extrakcí a bioloužením uvádí obr. 18. Z grafu je patrné, že použití 2M HNO<sub>3</sub> a 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vedlo k vyšší výtěžnosti, nicméně vyšší hodnoty vylouženého Cu pomocí bakterií lze pozorovat v případě loužení vzorku II po 72 h o 13,8 % ve srovnání s použitím 0,25M a 12 % ve srovnání 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u téhož vzorku půdy. V případě vzorku I byla metoda klasické extrakce účinnější.



**Obr. 19** Vyloužení niklu chemickou cestou a bioloužením: komparace

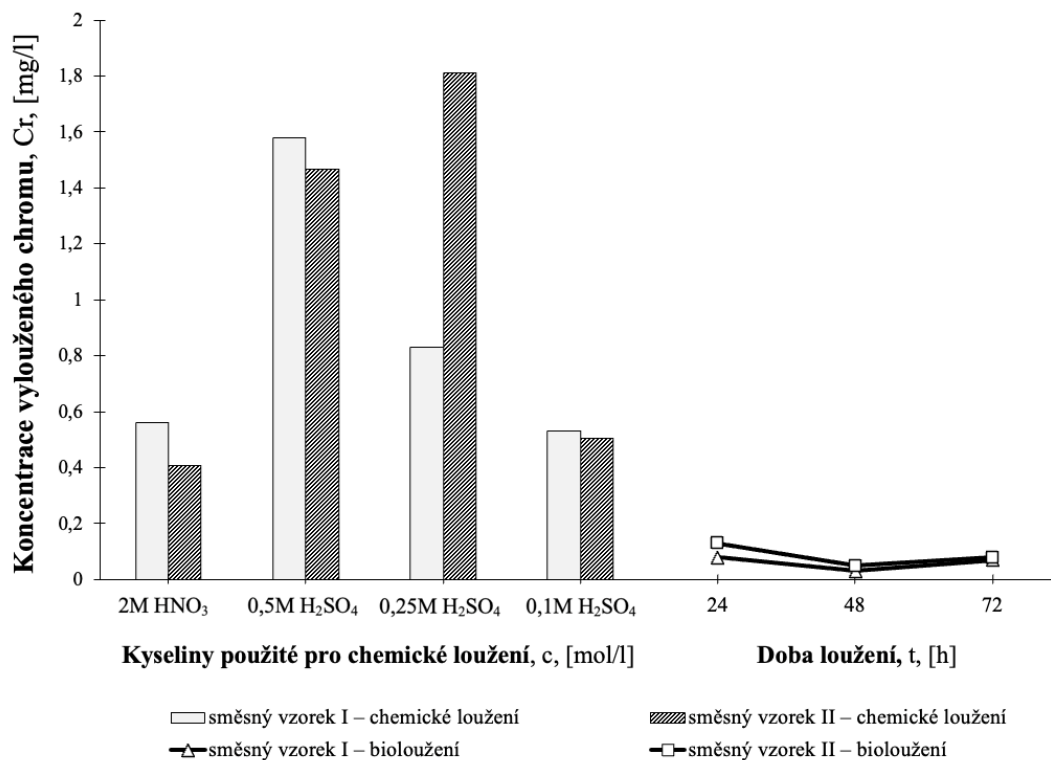
Na první pohled je z obr. 19 pozorovatelné, že účinnost bioloužení Ni byla po 72 h vyšší než v případě chemického loužení kyselinou sírovou. Hodnoty vylouženého Ni ve vzorku I byly již po 24 h o 88 % vyšší než při použití 0,25M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a více než 1,2× vyšší než při použití 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. V případě použití 2M HNO<sub>3</sub> byla účinnost chemického loužení vzorku I o 27,5 % vyšší než po 72 h bioloužení. Při loužení vzorku II byla ve všech případech metoda biologického loužení již po 24 h účinnější. V porovnání s 2M HNO<sub>3</sub> bylo bakteriemi ze vzorku II po 24 (72) h vylouženo o 56,0 (72,5) % více Ni, s 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o 26,6 (40,0) %, s 0,25M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o 91,6 (111,6) % a s 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> byla účinnost bioloužení 1,5 (1,7)× vyšší.



**Obr. 20** Vyloužení olova chemickou cestou a bioloužením: komparace

Pro účely grafického porovnání koncentrací vylouženého Pb chemickou cestou a bioloužením bylo zapotřebí hodnoty hmotnostních koncentrací přepočítat na µg/l a převést do logaritmického měřítka (obdobně jako v případě naměřených hodnot vylouženého Cd).

Z obr. 20 je patrné, že účinnost loužení Pb klasickou extrakcí kyselinami je účinnější. Ani po 72 h bioloužení nebylo dosaženo vyšší výtěžnosti. Ze vzorku I bylo pomocí 2M HNO<sub>3</sub> vylouženo 110× více Pb než po 48 h bioloužení. Obdobně ze vzorku II bylo pomocí 2M HNO<sub>3</sub> vylouženo 56× více Pb než po 48 h bioloužení. Možnou příčinou slabého vyloužení je schopnost Pb tvořit pouze mírně rozpustné soli.



**Obr. 21** Vyloužení chromu chemickou cestou a bioloužením: komparace

Obdobně jako u Pb, bioloužení Cr rovněž nepřineslo vyšší výtěžek ve srovnání s loužením pomocí HNO<sub>3</sub> a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Použití 0,5M a 0,25M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dokázalo vyloužit mnohonásobně vyšší množství Cr než použité bakterie.

## ZÁVĚR

Problematika odstraňování těžkých kovů z kontaminovaných vod, půd a sedimentů se řadí stále mezi aktuální témata mající dopad na chod celé společnosti. Nejenom staré ekologické zátěže, ale rovněž nové technologické postupy s doposud neznámými dlouhodobými dopady či konvenční ozbrojené konflikty spoluvytváří tlak na optimalizaci současných a hledání nových metod odstraňování těchto negativních aspektů antropogenní činnosti.

Ačkoli konvenční ozbrojený konflikt na evropském území, jehož jsme nyní svědky na Ukrajině, byl do nedávné doby považován spíše za kapitolu z učebnice historie, rozsáhlé kontaminace území těžkými kovy a organickými polutanty v důsledku vedení ozbrojené činnosti, přesunu vojenské techniky a zejména používání konvenčních zbraňových systémů jsou realitou, kterou bude po skončení tohoto konfliktu nutné řešit. Hledání účinné, finančně příznivé, a především optimalizované metody pro odstraňování těžkých kovů z půd bude představovat jeden z hlavních úkolů poválečné obnovy zasaženého území.

Závěrečná práce se zaměřila na problematiku bioloužení jako environmentálně šetrné a relativně ekonomicky dostupné metody odstraňování těžkých kovů z kontaminovaných půd. První, teoretická, část práce se zaměřila na problematiku půd kontaminovaných těžkými kovy, zdroje kontaminace a možnosti jejich remediace. Dále byl rozebrán výskyt, instrumentální analýza a osud těžkých kovů v životním prostředí. Teoretická část práce byla uzavřena shrnutím základních poznatků z oblasti bioloužení s akcentem na současné znalosti o využití bakterií *A. ferrooxidans* k tomuto účelu.

Druhá, experimentální, část práce se zaměřila na proces bioloužení kovů z půd kontaminovaných vojenskou municí, jež byly s pomocí pracovníků Vojenských lesů a statků sesbírány v prostoru bývalého vojenského areálu Vrbětice a sloužily jako simulace zeminy kontaminované v důsledku vedení vojenské činnosti. Pro samotný proces bioloužení byly využity heterotrofní bakterie *A. ferrooxidans*, jež byly kultivovány pomocí vsádkové kultivace. Cílem experimentální části bylo optimalizovat měření a srovnat výsledky bioloužení s klasickou metodou extrakce pomocí  $\text{HNO}_3$  a  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Dle dosažených výsledků je možné uvést závěr, že nejvyšší účinnost vyloužení byla zaznamenána u Ni, zatímco nejnižší účinnost v porovnání s klasickou metodou extrakce byla zjištěna u Pb. Bioloužení Cd po dobu 24, 48 a 72 h bylo stejně účinné jako loužení pomocí 0,5M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a o 50 % účinnější ve srovnání s 0,25M a 0,1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Výsledky bioloužení Cu vykazovaly rostoucí trend, nicméně pouze u vzorku II bylo dosaženo vyšší účinnosti,

kdy po 72 h bylo bioloužení účinnější o 13,8 (12) % ve srovnání s 0,25M (0,1M) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Výrazně pozitivních výsledků ve prospěch bioloužení bylo dosaženo při loužení Ni, neboť bioloužení obou vzorků půd přineslo již po 24 h vyšší účinnosti než rozklad pomocí H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. V případě vzorku II bylo v porovnání s 2M HNO<sub>3</sub> po 24 (72) h vylouženo o 56,0 (72,5) % více Ni, ve srovnání s 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o 26,6 (40,0) %, s 0,25M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o 91,6 (111,6) % a v porovnání s 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> byla účinnost bioloužení 1,5 (1,7)× vyšší. Na druhou stranu účinnost bioloužení Pb a Cr byla v porovnání s chemickým loužením nižší. Ze vzorku I bylo s pomocí 2M HNO<sub>3</sub> vylouženo až 110× více Pb než po 48 h bioloužení. Obdobně tomu bylo u vzorku II, z něhož bylo pomocí téže kyseliny vylouženo až 56× více Pb než po 48 h bioloužení. Rovněž použití 0,5M a 0,25M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dokázalo vyloužit mnohonásobně vyšší množství Cr než v průběhu loužení bakteriemi. Účinnost solubilizace kovů pomocí bioloužení z kontaminovaných půd lze zapsat v sestupném pořadí následovně:



Dosažené výsledky experimentální části práce ukazují, že biologické loužení pomocí bakterií *A. ferrooxidans* zastává nedílnou součást účinných metod odstraňování těžkých kovů z kontaminovaných půd. Nejenom, že metoda bioloužení oproti tradičním chemickým metodám sanace a remediace je šetrnější k životnímu prostředí, jedná se rovněž o nákladově efektivní řešení, jež využívá přirozeně se vyskytující bakterie k odstraňování těžkých kovů a nepřináší sekundární znečištění.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KUTZ, Myer. *Handbook of Environmental Engineering*. 1. 2018. ISBN 9781118712948.
- [2] BURAK, Diego Lang, Mauricio P.F. FONTES, Nerilson Terra SANTOS, Lena Virginia Soares MONTEIRO, Eder de Sousa MARTINS a Thierry BECQUER. Geochemistry and spatial distribution of heavy metals in Oxisols in a mineralized region of the Brazilian Central Plateau. *Geoderma* [online]. 2010, **160**(2), 131–142 [cit. 2024-01-24]. ISSN 00167061. Dostupné z: doi:10.1016/J.GEODERMA.2010.08.007
- [3] MILLER, Jerry R. The role of fluvial geomorphic processes in the dispersal of heavy metals from mine sites. *Journal of Geochemical Exploration* [online]. 1997, **58**(2–3), 101–118 [cit. 2024-01-24]. ISSN 0375-6742. Dostupné z: doi:10.1016/S0375-6742(96)00073-8
- [4] PEREL'MAN, A. I. Geochemical barriers: theory and practical applications. *Applied Geochemistry* [online]. 1986, **1**(6), 669–680 [cit. 2024-01-24]. ISSN 0883-2927. Dostupné z: doi:10.1016/0883-2927(86)90088-0
- [5] CORREA, Juan Esteban, Ramiro RAMÍREZ, Orlando RUÍZ a Edna Ivonne LEIVA. Effect of soil characteristics on cadmium absorption and plant growth of *Theobroma cacao* L. seedlings. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2021, **101**(13), 5437–5445 [cit. 2024-01-24]. ISSN 10970010. Dostupné z: doi:10.1002/JSFA.11192
- [6] SINTORINI, M. M., H. WIDYATMOKO, E. SINAGA a N. ALIYAH. Effect of pH on metal mobility in the soil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [online]. 2021, **737**(1) [cit. 2024-01-24]. ISSN 17551315. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/737/1/012071
- [7] ADAMCZYK-SZABELA, Dorota a Wojciech M. WOLF. The Impact of Soil pH on Heavy Metals Uptake and Photosynthesis Efficiency in *Melissa officinalis*, *Taraxacum officinalis*, *Ocimum basilicum*. *Molecules* [online]. 2022, **27**(15) [cit. 2024-01-24]. ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/MOLECULES27154671/S1
- [8] LI, Qi, Yanhong WANG, Yichun LI, Linfeng LI, Mingdeng TANG, Weifang HU, Li CHEN a Shaoying AI. Speciation of heavy metals in soils and their immobilization at micro-scale interfaces among diverse soil components. *Science of the Total Environment* [online]. 2022, **825** [cit. 2024-01-24]. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2022.153862
- [9] IKHAIJAGBE, B, S I MUSA a J O OKEME. Effects of Changes in Soil Cation Exchange Capacity on the Reclamation of Lead by *Eleusine Indica* (L.) Gaertn. *FUDMA Journal of Sciences* [online]. 2019, **3**(4), 176–183. ISSN 2616-1370. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/338384705\\_EFFECT\\_OF\\_CHANGES\\_IN\\_SOIL\\_CATION\\_EXCHANGE\\_CAPACITY\\_ON\\_THE\\_RECLAMATION\\_OF\\_LEAD\\_BY\\_ELEUSINE\\_INDICA#fullTextFileContent](https://www.researchgate.net/publication/338384705_EFFECT_OF_CHANGES_IN_SOIL_CATION_EXCHANGE_CAPACITY_ON_THE_RECLAMATION_OF_LEAD_BY_ELEUSINE_INDICA#fullTextFileContent)
- [10] GAN, M, Z SONG, J ZHU a X LIU. Efficient Bioremediation of Heavy Metals from Contaminated Sediment in Batch Method Coupled with the Assistance of Heterotrophic Microorganisms. *Environ Earth Sci* [online]. 2016, **75**(457). Dostupné z: doi:10.1007/s12665-016-5307-0
- [11] CSUROS, Maria a Csaba CSUROS. *Environmental Sampling and Analysis for Metals*. 1. B.m.: Lewis Publishers, CRC Press Company, 2002. ISBN 1-56670-572-X.
- [12] PITCHEL, J. *Fundamentals of Soil Remediation*. 1. B.m.: Rockville, MD: Government Institutes. 2000
- [13] *Země brownfieldů* [online]. 2015. Dostupné z: <https://www.ceskovdatech.cz/clanek/59-zeme-brownfieldu-v-cesku-je-temer-500-lokalit-pripravenych-pro-investory/>



- [14] ZHANG, Chunlong. *Soil and Groundwater Remediation: Fundamentals, Practices and Sustainability*. 1. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2020. ISBN 9781119393153.
- [15] USEPA. *Analysis of Facility Corrective Action Data*. 1. 1994
- [16] USEPA. *Draft Regulatory Impact Analysis for the Final Rulemaking on Corrective Action for Solid Waste Management Units Proposed Methodology for Analysis*. 1. 1993
- [17] TREMBLAY, D L, D TULIS a P KOSTECKI. *Innovation Skyrockets at 50 000 LUST Sites*. 1. 1995
- [18] YE, Shujing, Guangming ZENG, Haipeng WU, Chang ZHANG, Juan DAI, Jie LIANG, Jiangfang YU, Xiaoya REN, Huan YI, Min CHENG a Chen ZHANG. Biological technologies for the remediation of co-contaminated soil. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2017, **37**(8), 1062–1076 [cit. 2024-01-24]. ISSN 15497801. Dostupné z: doi:10.1080/07388551.2017.1304357
- [19] PENG, Jian feng, Yong hui SONG, Peng YUAN, Xiao yu CUI a Guang lei QIU. The remediation of heavy metals contaminated sediment. *J Hazard Mater* [online]. 2009, **161**(2–3), 633–640 [cit. 2023-12-14]. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2008.04.061
- [20] GAN, Min, Shiqi JIE, Mingming LI, Jianyu ZHU a Xinxing LIU. Bioleaching of multiple metals from contaminated sediment by moderate thermophiles. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 2015, **97**(1–2), 47–55 [cit. 2023-12-14]. ISSN 0025-326X. Dostupné z: doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2015.06.040
- [21] CHENG, Min, Guangming ZENG, Danlian HUANG, Cui LAI, Piao XU, Chen ZHANG a Yang LIU. Hydroxyl radicals based advanced oxidation processes (AOPs) for remediation of soils contaminated with organic compounds: A review. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2016, **284**, 582–598 [cit. 2024-01-25]. ISSN 1385-8947. Dostupné z: doi:10.1016/J.CEJ.2015.09.001
- [22] EPELDE, Lur, Iker MIJANGOS, José M. BECERRIL a Carlos GARBISU. Soil microbial community as bioindicator of the recovery of soil functioning derived from metal phytoextraction with sorghum. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2009, **41**(9), 1788–1794 [cit. 2024-01-24]. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/J.SOILBIO.2008.04.001
- [23] ZHU, Zhi qiang, Xiao e. YANG, Kai WANG, Hua gang HUANG, Xincheng ZHANG, Hua FANG, Ting qiang LI, A. K. ALVA a Zhen Li HE. Bioremediation of Cd-DDT co-contaminated soil using the Cd-hyperaccumulator *Sedum alfredii* and DDT-degrading microbes. *Journal of hazardous materials* [online]. 2012, **235–236**, 144–151 [cit. 2024-01-24]. ISSN 1873-3336. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2012.07.033
- [24] WANG, Ting, Hongwen SUN, Hongjun MAO, Yanfeng ZHANG, Cuiping WANG, Zhiyuan ZHANG, Baolin WANG a Lei SUN. The immobilization of heavy metals in soil by bioaugmentation of a UV-mutant *Bacillus subtilis* 38 assisted by NovoGro biostimulation and changes of soil microbial community. *Journal of hazardous materials* [online]. 2014, **278**, 483–490 [cit. 2024-01-25]. ISSN 1873-3336. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2014.06.028
- [25] GAN, Min, Zibo SONG, Jianyu ZHU a Xinxing LIU. Efficient bioleaching of heavy metals from contaminated sediment in batch method coupled with the assistance of heterotrophic microorganisms. *Environmental Earth Sciences* [online]. 2016, **75**(6), 1–10 [cit. 2023-12-14]. ISSN 18666299. Dostupné z: doi:10.1007/S12665-016-5307-0/METRICS
- [26] GAN, Min, Shuang ZHOU, Mingming LI, Jianyu ZHU, Xinxing LIU a Liyuan CHAI. Bioleaching of multiple heavy metals from contaminated sediment by mesophile consortium. *Environ Sci Pollut Res* [online]. 2015, **22**(8), 5807–5816 [cit. 2023-12-14]. ISSN 16147499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-014-3759-x

- [27] WANG, Wenyun, Xuefeng ZHANG, Jing HUANG, Chongling YAN, Qiong ZHANG, Haoliang LU a Jingchun LIU. Interactive effects of cadmium and pyrene on contaminant removal from co-contaminated sediment planted with mangrove *Kandelia obovata* (S., L.) Yong seedlings. *Marine pollution bulletin* [online]. 2014, **84**(1–2), 306–313 [cit. 2024-01-25]. ISSN 1879-3363. Dostupné z: doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2014.04.046
- [28] KUTROWSKA, Agnieszka a Malgorzata SZELAG. Low-molecular weight organic acids and peptides involved in the long-distance transport of trace metals. *Acta Physiologiae Plantarum* [online]. 2014, **36**(8), 1957–1968 [cit. 2024-01-25]. ISSN 01375881. Dostupné z: doi:10.1007/S11738-014-1576-Y/FIGURES/4
- [29] SCHNEIDER, Martin a R MARQUARD. Investigation on the Uptake of Cadmium in *Hypericum Perforatum* L. (St. John's Wort). *Acta Horticulturae* [online]. 1996, (426), 435–442. Dostupné z: doi:10.17660/ActaHortic.1996.426.48
- [30] RADANOVIC, D., S. ANTIC-MLADENOVIC a M. JAKOVLJEVIC. Influence of some soil characteristics on heavy metal content in *Hypericum perforatum* L. and *Achillea millefolium* L. *Acta Horticulturae* [online]. 2002, **576**, 295–301 [cit. 2024-01-24]. ISSN 05677572. Dostupné z: doi:10.17660/ACTAHORTIC.2002.576.44
- [31] TRIPATHI, Vishal, Leonardo F. FRACETO a P. C. ABHILASH. Sustainable clean-up technologies for soils contaminated with multiple pollutants: Plant-microbe-pollutant and climate nexus. *Ecological Engineering* [online]. 2015, **82**, 330–335 [cit. 2024-01-25]. ISSN 0925-8574. Dostupné z: doi:10.1016/J.ECOLENG.2015.05.027
- [32] ARSHAD, Muhammad, Muhammad SALEEM a Sarfraz HUSSAIN. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in biotechnology* [online]. 2007, **25**(8), 356–362 [cit. 2024-01-25]. ISSN 0167-7799. Dostupné z: doi:10.1016/J.TIBTECH.2007.05.005
- [33] CHEN, Fu, Min TAN, Jing MA, Gang LI a Junfeng QU. Restoration of manufactured gas plant site soil through combined ultrasound-assisted soil washing and bioaugmentation. *Chemosphere* [online]. 2016, **146**, 289–299 [cit. 2024-01-25]. ISSN 1879-1298. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2015.12.050
- [34] *Protokol o těžkých kovech k Úmluvě o dálkovém znečišťování ovzduší přesahujícím hranice států* [online]. 2022. Dostupné z: [https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/informacni\\_brozury\\_chemicke\\_latky/\\$FILE/OZV-protokol\\_o\\_tezkych\\_kovech-20120327.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/informacni_brozury_chemicke_latky/$FILE/OZV-protokol_o_tezkych_kovech-20120327.pdf)
- [35] TCHOUNWOU, Paul B., Clement G. YEDJOU, Anita K. PATLOLLA a Dwayne J. SUTTON. Heavy Metals Toxicity and the Environment. *EXS* [online]. 2012, **101**, 133 [cit. 2024-01-26]. ISSN 1023294X. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-7643-8340-4\_6
- [36] FERGUSSON, J. E. The heavy elements in water and sediments. *The heavy elements : chemistry, environmental impact and health effects* [online]. 1990, 243–327 [cit. 2024-01-26]. Dostupné z: [https://books.google.com/books/about/The\\_Heavy\\_Elements.html?hl=cs&id=qRISAAAAMAAJ](https://books.google.com/books/about/The_Heavy_Elements.html?hl=cs&id=qRISAAAAMAAJ)
- [37] PEAVY, HS, DR ROWE a G TCHOBANOGLIOUS. *Environmental Engineering*. B.m.: McGraw Hill Inc. 1988
- [38] BARONDEAU, David P., Carey J. KASSMANN, John A. TAINER a Elizabeth D. GETZOFF. Structural chemistry of a green fluorescent protein Zn biosensor. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2002, **124**(14), 3522–3524 [cit. 2024-01-05]. ISSN 00027863. Dostupné z: doi:10.1021/JA0176954/SUPPL\_FILE/JA0176954\_S1.PDF
- [39] LIU, Juewen a Yi LU. A colorimetric lead biosensor using DNAzyme-directed assembly of gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2003, **125**(22), 6642–

- 6643 [cit. 2024-01-05]. ISSN 00027863. Dostupné z: doi:10.1021/JA034775U/SUPPL\_FILE/JA034775USI20030425\_034247.PDF
- [40] BRADL, H., C. KIM, U. KRAMAR a D. STÜBEN. Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation. *Interface Science and Technology* [online]. 2005, **6**, 28–164 [cit. 2024-01-26]. ISSN 15734285. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1573428505800213>
- [41] BREUIL, P., D. DI BENEDETTO a J. P. POYET. On-line analysis of copper and zinc in industrial effluents by UV-visible spectrometry (in French). *Analisis* [online]. 1998, **26**(8), 63–66 [cit. 2024-01-05]. ISSN 0365-4877. Dostupné z: doi:10.1051/ANALISIS:199826080063
- [42] *Sci-Hub | Biosensors for heavy metals. BioMetals, 18(2), 121–129 | 10.1007/s10534-004-5787-3* [online]. [cit. 2024-01-05]. Dostupné z: <https://sci-hub.se/10.1007/s10534-004-5787-3>
- [43] KROFTA, Jiří. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II*. 6. B.m.: VŠCHT, Praha, 2001. ISBN 80-7080-451-3.
- [44] OTRUBA, Vítězslav. Analytická RTG spektrometrie (XRF spektrometrie) [online]. nedatováno [cit. 2024-01-26]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/C7031/um/14\\_AS\\_RTG.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/C7031/um/14_AS_RTG.pdf)
- [45] LUO, Wei a Xuecheng ZHENG. Adsorption Behaviors of *Rhodotorula* sp. in the Bioleaching Process of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Environmental Engineering* [online]. 2019, **145**(11), 04019073 [cit. 2023-12-15]. ISSN 0733-9372. Dostupné z: doi:10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001592/SUPPL\_FILE/SUPPLEMENTAL\_DATA\_EE.1943-7870.0001592\_LUO.PDF
- [46] KO, Myoung Soo, Hyun Sung PARK, Kyoung Woong KIM a Jong Un LEE. The role of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in arsenic bioleaching from soil. *Environmental geochemistry and health* [online]. 2013, **35**(6), 727–733 [cit. 2024-01-27]. ISSN 1573-2983. Dostupné z: doi:10.1007/S10653-013-9530-2
- [47] OK, Yong Sik, Sung Chul KIM, Dong Kuk KIM, Jeffrey G. SKOUSEN, Jin Soo LEE, Young Wook CHEONG, Su Jung KIM a Jae E. YANG. Ameliorants to immobilize Cd in rice paddy soils contaminated by abandoned metal mines in Korea. *Environmental Geochemistry and Health* [online]. 2011, **33**(SUPPL. 1), 23–30 [cit. 2024-01-27]. ISSN 02694042. Dostupné z: doi:10.1007/S10653-010-9364-0/FIGURES/6
- [48] CHEN, S Y a J G LIN. Enhancement of metal bioleaching from contaminated sediment using silver ion. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2009, **161**(2–3), 893–899. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2008.04.035
- [49] NGUYEN, Van Khan, Mu Hyun LEE a Hyung Jun PARK. Bioleaching of arsenic and heavy metals from mine tailings by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. 2015, **21**, 451–458. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiec.2014.03.004
- [50] ZHU, Jianyu, Jingxia ZHANG, Qian LI, Tao HAN, Jianping XIE, Yuehua HU a Liyuan CHAI. Phylogenetic analysis of bacterial community composition in sediment contaminated with multiple heavy metals from the Xiangjiang River in China. *Mar Pollut Bull* [online]. 2013, **70**(1–2), 134–139 [cit. 2023-12-14]. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2013.02.023
- [51] AKINCI, Gorkem a Duyusen E. GUVEN. Bioleaching of heavy metals contaminated sediment by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp. *Desalination* [online]. 2011, **268**(1–3), 221–226 [cit. 2024-01-27]. ISSN 0011-9164. Dostupné z: doi:10.1016/J.DESAL.2010.10.032

- [52] KREBS, W, C BROMBACHER a P P BOSSHARD. Microbial recovery of metals from solids. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2006, **20**(3–4), 605–617. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.1997.tb00341.x
- [53] BOSECKER, K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 1997, **20**(3–4), 591–604. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article/20/3-4/591/517205>
- [54] PARK, Jeonghyun, Yosep HAN, Eunseong LEE, Uikyu CHOI, Kyungkeun YOO, Youngsoo SONG a Hyunjung KIM. Bioleaching of highly concentrated arsenic mine tailings by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Separation and Purification Technology* [online]. 2014, **133**, 291–296 [cit. 2024-01-27]. ISSN 1383-5866. Dostupné z: doi:10.1016/J.SEPPUR.2014.06.054
- [55] EHRLICH, Henry Lutz. Uppermost lithosphere as a microbial habitat. *Ehrlich's Geomicrobiology, Sixth Edition* [online]. 2015, 55–68 [cit. 2024-01-27]. Dostupné z: doi:10.1201/B19121/EHRLICH-GEOMICROBIOLOGY-ANDREAS-KAPPLER-HENRY-LUTZ-EHRLICH-DIANNE-NEWMAN
- [56] MUÑOZ, J. A., F. GONZÁLEZ, M. L. BLÁZQUEZ a A. BALLESTER. A study of the bioleaching of a Spanish uranium ore. Part I: A review of the bacterial leaching in the treatment of uranium ores. *Hydrometallurgy* [online]. 1995, **38**(1), 39–57 [cit. 2024-01-27]. ISSN 0304386X. Dostupné z: doi:10.1016/0304-386X(94)00039-6
- [57] BRIERLEY, C L. Microbiological Mining. *Scientific American* [online]. 1982, **247**(2), 44–53. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/24966658>
- [58] RUIZ, L M, M CASTRO, A BARRIGA, C A JEREZ a N GUILIANI. The extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* possesses a c-di-GMP signalling pathway that could play a significant role during bioleaching of minerals. *Lett Appl Microbiol* [online]. 2011, **54**(2), 133–139. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03180.x.
- [59] KONISHI, Y a H KUBO. Bioleaching of zinc sulfide concentrate by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1992, **39**(1), 66–74. Dostupné z: doi:10.1002/bit.260390111
- [60] SILVERMAN, M P a D G LUNDGREN. Studies on the Chemoautotrophic Iron Bacterium *Ferrobacillus Ferrooxidans*. *J. Bacteriol* [online]. 1959, **77**(5), 642–647. Dostupné z: doi:10.1128/jb.77.5.642-647.1959
- [61] DENG, Chengxun, Mei YUE, Ling WANG a Yuhui LI. Molecular identification of a strain *acidithiobacillus ferrooxidans* and its biological characteristics. *Advanced Materials Research* [online]. 2012, **402**, 3–6 [cit. 2024-05-11]. ISSN 10226680. Dostupné z: doi:10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/AMR.402.3
- [62] CHENG, Hai na, Yue hua HU, Jian GAO a Heng MA. Bioleaching of anilite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* [online]. 2008, **18**(6), 1410–1414 [cit. 2024-05-11]. ISSN 1003-6326. Dostupné z: doi:10.1016/S1003-6326(09)60017-0
- [63] POURHOSSEIN, Fatemeh a Seyyed Mohammad MOUSAVI. Enhancement of copper, nickel, and gallium recovery from LED waste by adaptation of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Waste Management* [online]. 2018, **79**, 98–108 [cit. 2024-05-11]. ISSN 0956-053X. Dostupné z: doi:10.1016/J.WASMAN.2018.07.010
- [64] CHEN, S Y a L C CHOU. Relationship between microbial community dynamics and process performance during thermophilic sludge bioleaching. *Environ Sci Pollut Res Int.* [online]. 2016, **23**(16), 16006–16014. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-016-6716-z
- [65] TAVAKOLI, H Z, M BAHRAMI-BAVANI, Y MIYANMAHALEH a P TAJER-MOHAMMAD-GHAZVINI. Identification and Characterization of a Metal-resistant

- Acidithiobacillus ferrooxidans as important potential application for bleaching. *Biologia* [online]. 2021, **76**, 1327–1337. Dostupné z: doi:10.1007/s11756-021-00687-z
- [66] KIM, In S., Jong Un LEE a Am JANG. Bioleaching of heavy metals from dewatered sludge by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2005, **80**(12), 1339–1348 [cit. 2023-12-15]. ISSN 1097-4660. Dostupné z: doi:10.1002/JCTB.1330
- [67] HEDRICH, Sabrina, Catherine JOULIAN, Torsten GRAUPNER, Axel SCHIPPERS a Anne Gwenaëlle GUÉZENNEC. Enhanced chalcopyrite dissolution in stirred tank reactors by temperature increase during bioleaching. *Hydrometallurgy* [online]. 2018, **179**, 125–131 [cit. 2024-05-12]. ISSN 0304-386X. Dostupné z: doi:10.1016/J.HYDROMET.2018.05.018
- [68] GAN, Min, Zibo SONG, Jianyu ZHU a Xinxing LIU. Efficient bioleaching of heavy metals from contaminated sediment in batch method coupled with the assistance of heterotrophic microorganisms. *Environmental Earth Sciences* [online]. 2016, **75**(6) [cit. 2024-05-11]. ISSN 18666299. Dostupné z: doi:10.1007/S12665-016-5307-0
- [69] ESCOBAR, Blanca, Elizabeth HUENUPI a Jacques V. WIERTZ. Chemical and biological leaching of enargite. *Biotechnology Letters* [online]. 1997, **19**(8), 719–722 [cit. 2024-05-11]. ISSN 01415492. Dostupné z: doi:10.1023/A:1018367621547/METRICS
- [70] BAYAT, Belgin a Bulent SARI. Comparative evaluation of microbial and chemical leaching processes for heavy metal removal from dewatered metal plating sludge. *Journal of hazardous materials* [online]. 2010, **174**(1–3), 763–769 [cit. 2024-05-11]. ISSN 1873-3336. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2009.09.117
- [71] KOTLÍK, Bohumil, Jan LANGHANS, Pavel BERNÁTH a Vladimír KRAJÁK. *Vzorkování. Český Těšín: 2 Theta*, 2016.
- [72] *Půdy, upravený bioodpad a kaly – Stanovení pH*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. 2022
- [73] *Stanovení půdní reakce* [online]. Dostupné z: <http://vedajeabava.upol.cz/docs/analyza%20pudy.pdf>
- [74] *Stanovení výměnné půdní reakce* [online]. 2020. Dostupné z: [https://web2.mendelu.cz/af\\_221\\_multitext/laborator/index.php?N=1&I=3&J=4&K=2](https://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/laborator/index.php?N=1&I=3&J=4&K=2)
- [75] *Kvalita půdy. Stanovení elektrické konduktivity*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. 1996
- [76] *Výrobky používané pro úpravu vody určené k lidské spotřebě – Pomocné anorganické a filtrační materiály – Metody zkoušení*. Praha: Ústav pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. 2005
- [77] *Výrobky používané pro úpravu vody určené k lidské spotřebě – Přírodní zeolit*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. 2014
- [78] PODLEŠÁKOVÁ, E a kol. *Rozbory půd, vod a rostlin*. Praha: VÚMOP, 1992.
- [79] RŮŽIČKA, Jan. *Mikrobiologická cvičení*. nedatováno.
- [80] *Buňka* [online]. 2021. Dostupné z: <https://www.biomach.cz/bunecná-a-molekulárn%C3%AD-biologie/buňka>
- [81] *Exkluze* [online]. 2013. Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/exkluze-2>
- [82] *Chelatace* [online]. 2012. Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/pojem/chelatace>
- [83] *Sekvestrace* [online]. 2017. Dostupné z: <https://slovník-cizich-slov.abz.cz/web.php/slovo/sekvestrace>
- [84] STOKLASOVÁ, Alena, Josef KŘÍŽALA a Pavel ŠIMAN. *Obecná, fyzikální a anorganická chemie pro studující medicíny*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1996. ISBN 80-7066-949-7.

- [85] REICHL, Jaroslav a Martin VŠETIČKA. *Augerův jev* [online]. 2019. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/1682-augeruv-jev>
- [86] *Vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu* [online]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1994-13>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	síran amonný
AAS	atomová absorpční spektrometrie
Ag	stříbro
As	arsen
$\text{AsH}_3$	hydrid arsenitý
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	dusičnan vápenatý
$\text{CaCl}_2$	chlorid vápenatý
Cd	kadmium
Co	kobalt
Cr	chrom
Cu	měď
ČSN	Česká technická norma
DL	limit detekce
DNT	dinitrotoluen
FAAS	plamenová atomová absorpční spektrometrie
Fe	železo
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu železnatého
$\text{H}_2\text{SO}_4$	kyselina sírová
HCL	dutá katodová výbojka
Hg	rtuť
$\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$	dimethylrtuť
HMX	oktogen
ICP-AES	emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem
ISO	Mezinárodní organizace pro standardizaci
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	hydrogenfosforečnan draselný
KCl	chlorid draselný
keV	kiloelektronvolt
KSCN	thiokyanatan draselný
kV	kilovolt
LD	letální dávka
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu hořečnatého
ND	bez dat

---

Ni	nikl
NPL	Seznam národních priorit
ORP	oxidačně redukční potenciál
Pb	olovo
Pb(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>4</sub>	tetraetylolovo
RDX	hexogen
Sb	antimon
Se	selen
SRN	Spolková republika Německo
Tl	thallium
TNT	trinitrotoluen
USA	Spojené státy americké
UV/VIS	ultrafialové / viditelné světlo
XRF	rentgenová fluorescenční spektrometrie
Zn	zinek
μA	mikroampér
μS	mikrosiemens



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<b>Obr. 1</b> Hlavní skupiny znečišťujících látek [14] .....	13
<b>Obr. 2</b> Technologie remediace půd kontaminovaných těžkými kovy [18].....	15
<b>Obr. 3</b> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> [55].....	25
<b>Obr. 4</b> Ortofoto a typy hornin vrbětického areálu.....	31
<b>Obr. 5</b> Ortofoto a typ hornin místa vzorkování I .....	32
<b>Obr. 6</b> Ortofoto a typ hornin místa vzorkování II.....	33
<b>Obr. 7</b> Schéma vzorkování I .....	34
<b>Obr. 8</b> Schéma vzorkování II .....	35
<b>Obr. 9</b> Kovy ve směsném vzorku I (stanoveno pomocí XRF).....	46
<b>Obr. 10</b> Kovy ve směsném vzorku II (stanoveno pomocí XRF) .....	47
<b>Obr. 11</b> Změny pH v průběhu kultivace a loužení.....	48
<b>Obr. 12</b> Změny ORP v průběhu kultivace a loužení.....	49
<b>Obr. 13</b> Změny koncentrace iontů Fe <sup>3+</sup> v průběhu kultivace.....	50
<b>Obr. 14</b> Růstová křivka bakterií <i>A. ferrooxidans</i> .....	51
<b>Obr. 15</b> Fotografie bakterií <i>A. ferrooxidans</i> .....	52
<b>Obr. 16</b> Koncentrace vylouženého Cd, Cu, Ni, Pb a Cr po bioloužení.....	54
<b>Obr. 17</b> Vyloužení kadmia chemickou cestou a bioloužením: komparace.....	57
<b>Obr. 18</b> Vyloužení mědi chemickou cestou a bioloužením: komparace.....	58
<b>Obr. 19</b> Vyloužení niklu chemickou cestou a bioloužením: komparace .....	59
<b>Obr. 20</b> Vyloužení olova chemickou cestou a bioloužením: komparace.....	60
<b>Obr. 21</b> Vyloužení chromu chemickou cestou a bioloužením: komparace .....	61

**SEZNAM TABULEK**

<b>Tab. 1</b> Základní charakteristika vybraných těžkých kovů [11].....	18
<b>Tab. 2</b> Složení médií 9K a B80 [45] .....	25
<b>Tab. 3</b> Použité materiály a chemikálie .....	29
<b>Tab. 4</b> Použité přístroje a pomůcky.....	30
<b>Tab. 5</b> Podmínky vzorkování .....	34
<b>Tab. 6</b> Vzorky připravené pro stanovení pH.....	36
<b>Tab. 7</b> Hodnocení aktivního a výměnného pH [73–74].....	36
<b>Tab. 8</b> Vzorky připravené pro stanovení konduktivity .....	37
<b>Tab. 9</b> Směsné standardní roztoky připravené pro stanovení výměnných kationtů.....	40
<b>Tab. 10</b> Vzorky pro vsádkovou kultivaci.....	42
<b>Tab. 11</b> Vzorky pro bioloužení .....	43
<b>Tab. 12</b> Vzorky připravené ke stanovení obsahu kovů pomocí FAAS.....	44
<b>Tab. 13</b> Konduktivita a pH půdy.....	45
<b>Tab. 14</b> Obsah sušiny a oxidovatelného uhlíku v půdě.....	45
<b>Tab. 15</b> Kationtová výměnná kapacita, koncentrace a obsah výměnných prvků v půdě....	46
<b>Tab. 16</b> Hodnoty pH a ORP vzorků první den kultivace .....	47
<b>Tab. 17</b> Koncentrace prvků v půdě po bioloužení .....	53
<b>Tab. 18</b> Koncentrace prvků v půdě po chemickém loužení .....	56