

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2021

Vít Náhlík

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Bioakumulace vzácných kovů z červeného kalu

Diplomová práce

Bc. Vít Náhlík

Školitelka: prof. (FH) RNDr. Milada Vítová, Ph.D.

(Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Třeboň)

České Budějovice

2021

Náhlík V., (2021). Bioakumulace vzácných kovů z červeného kalu [Bioaccumulation of scarce metals from red mud. Mgr. Thesis. In Czech]. – 77 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Tato studie se zabývá bioakumulací vzácných kovů, především lanthanoidů, obsažených v červeném kalu. Působení červeného kalu je studováno na kulturách *La4 mutantu* zelené řasy *Desmodesmus quadricauda* a na červené řase *Galdieria sulphuraria* za různých metabolických režimů po přidání kyselého výluhu červeného kalu.

Klíčová slova: mikrořasy, *La4 mutant*, *Desmodesmus quadricauda*, *Galdieria sulphuraria*, vzácné kovy lanthanoidy, červený kal, bioakumulace, recyklace, toxicita, autotrofie, mixotrofie

Annotation:

This study deals with the bioaccumulation of scarce metals, especially lanthanides, contained in red mud. The effect of red mud is studied on cultures of *La4 mutant* of the green alga *Desmodesmus quadricauda* and on red microalga *Galdieria sulphuraria* under different metabolic regimes with the addition of acidic extract of red mud.

Key words: microalgae, *La4 mutant*, *Desmodesmus quadricauda*, *Galdieria sulphuraria*, scarce metals, lanthanides, red mud, bioaccumulation, recycling, toxicity, autotrophy, mixotrophy

Prohlašuji, že jsem autorem kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím parametrů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 7. 12. 2021

.....
Bc. Vít Náhlík

Poděkování

Mé největší poděkování patří mé školitelce prof. (FH) RNDr. Miladě Vítové, Ph.D. a mým konzultantkám Mgr. Márii Čížkové, Ph.D. a MSc. Anjali Singh, Ph.D. za velkou pomoc při výzkumu, ohromnou trpělivost a pomoc při psaní diplomové práce. Mé poděkování in memoriam patří RNDr. Vilémovi Zachlederovi, CSc., který mi byl nedocenitelným mentorem. Rád bych také poděkoval týmu Mgr. Mariana Ruckého, Ph.D. ze Státního zdravotního ústavu v Praze za analýzy vzorků pomocí ICP-MS a garantovi práce RNDr. Tomášovi Hájkovi Ph.D. za pomoc s formální stránkou mé diplomové práce. Na závěr bych rád poděkoval všem spolupracovníkům z Laboratoře buněčných cyklů řas, své rodině a přátelům za pomoc při výzkumu a velkou podporu, kterou mi po celou dobu věnovali.

Financování

Tento výzkum byl financován Evropským fondem pro regionální rozvoj, program Interreg V-A Rakousko—Česká republika, číslo grantu ATCZ172 REEgain, Grantovou Agenturou České republiky, grant č. 19-12607S a také Konceptí institucionálního výzkumu č. RVO61388971.

Obsah

1 ÚVOD	1
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1 Modelové organismy	2
2.1.1 <i>Desmodesmus quadricauda</i>	2
2.1.2 <i>Galdieria sulphuraria</i>	3
2.2 Buněčný cyklus řas	5
2.2.1 Buněčný cyklus řasy <i>Desmodesmus quadricauda</i>	5
2.2.2 Buněčný cyklus řasy <i>Galdieria sulphuraria</i>	7
2.3 Vzácné kovy	10
2.3.1 Obecný úvod	10
2.3.2 Charakteristika vzácných kovů	10
2.3.3 Výskyt a těžba kovů	14
2.3.3 Působení vzácných kovů na rostliny a řasy	14
2.4 Červený kal (red mud)	16
2.4.1 Obecný úvod	16
2.4.2 Skladování a nové způsoby využití červeného kalu	16
2.4.3 Ekologické nebezpečí	17
2.4.4 Složení červeného kalu	17
2.4.5 Motivace pro výzkum červeného kalu	21
3 CÍLE PRÁCE	22
4 METODIKA	23
4.1 Odebrání vzorků červeného kalu	23
4.2 Příprava kyselého výluhu červeného kalu (RM)	24
4.2.1 Kultivace <i>La4</i> mutantu řasy <i>D. quadricauda</i>	25
4.2.2 Kultivace řasy <i>G. sulphuraria 002</i>	27

4.2.3 Kultivace modelových organismů mikrořas s přidavkem extraktu z červeného kalu	29
4.3 Měření optické density a stanovení sušiny	29
4.4 Mikroskopie.....	30
4.4.1 Barvení buněk pomocí DAPI.....	30
4.4.2 Počítání buněk v Bürkerově komůrce.....	30
4.4.3 Barvení buněk pomocí SYBR Green.....	30
4.5. RNA, DNA, Proteinová analýza.....	31
4.6. Měření maximálního kvantového výtěžku (Fotochemie RCII).....	32
4.7 Stanovení fykobiliproteinů u řasy <i>G. sulphuraria</i>	32
4.8 Stanovení chlorofylu a a karotenoidů u řasy <i>G. sulphuraria</i>	33
4.9 Stanovení pigmentů u <i>La4</i> mutantu řasy <i>D. quadricauda</i>	33
4.10. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP – MS)	34
4.10.1 Příprava vzorků pro ICP – MS.....	34
4.10.2 Elementární analýza vzorků (ICP – MS).....	34
4.11 Zpracování dat	35
5 VÝSLEDKY	36
5.1 Kultivace synchronní kultury <i>La4</i> mutantu řasy <i>D. quadricauda</i> s přidavkem extraktu červeného kalu a stanovení množství naakumulovaných vzácných kovů z biomasy za pomoci ICP-MS.....	36
5.2 Kultivace synchronní kultury extrémofilní řasy <i>G. sulphuraria</i> s přidavkem extraktu červeného kalu a stanovení množství naakumulovaných vzácných kovů z biomasy za pomoci ICP-MS.....	43
5.3 Kultivace nesynchronní kultury řasy <i>G. sulphuraria</i> v různých trofických režimech s extraktem červeného kalu.....	53
6 DISKUZE.....	55
7 ZÁVĚR.....	59
8 SEZNAM LITERATURY	60

9 ZDROJ OBRÁZKŮ A TABULEK.....	74
10 SEZNAM ZKRATEK.....	76

1 ÚVOD

Tuto diplomovou práci jsem vypracoval na Mikrobiologickém ústavu, AV ČR v.v.i., v Laboratoři buněčných cyklů řas v Centru Algtech v Třeboni. Skupina prof. (FH) RNDr. Milady Vítové, Ph.D, které mám tu čest být součástí, se zde zabývá regulací buněčného cyklu řas externími faktory, transportem kovů a jejich metabolismem a bioremediací za pomoci řas.

Vzácné kovy jsou nepostradatelné pro moderní průmysl, ale i v zemědělské produkci. Omezený export těchto kritických surovin a navyšující se cena nutí k hledání alternativních metod pro jejich zpětné použití. Průmyslové odpady poskytují v podstatě nevyčerpatelný zdroj pro možnou recyklaci. Zapojení mikroorganismů je jednou z vhodných možností, jak recyklovat kovy z různých odpadů.

Průmyslový odpad, který vzniká jako vedlejší toxický produkt Bayerova zásaditého procesu při výrobě hliníku, je znám pod názvem červený kal („red mud“ v anglickém jazyce). Po protržení hráze skladovacího odkaliště červeného kalu v Maďarsku v roce 2010 vznikly podněty k výzkumu bioremediace kovů z postižené oblasti.

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřil na výběr vhodného modelového organismu pro kultivaci řas s přidavkem surového červeného kalu. Z těchto poznatků jsem vycházel v této diplomové práci, zabývající se bioakumulací vzácných kovů z červeného kalu za pomoci řas. Po vytvoření kyselého extraktu červeného kalu, který měl za úkol vyřešit limitaci světlem způsobenou surovým červeným kalem, jsme tímto extraktem působili nejdříve na kultury mutantu *La4* zelené řasy *Desmosdesmus quadricauda* a následně i extrémofilní červenou řasu *Galdieria sulphuraria*, kterou je možné pěstovat za různých trofických režimů. Oba modelové organismy jsme podrobili sérii pokusů a analýz, které měly ukázat, zda dochází ke změnám v buněčném cyklu ovlivněných řasových kultur a také, zda jsou tyto řasové modelové organismy schopny akumulovat vysoké množství vzácných kovů z extraktu červeného kalu.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Modelové organismy

Jako modelové organismy byly zvoleny dva zástupci mikrořas. Prvním vybraným zástupcem byla zelená řasa z oddělení Chlorophyta, *Desmodesmus quadricauda*, přesněji jeho mutant selektovaný na vysokých dávkách lanthanoidů, který nese označení *La4*. Druhým zvoleným modelovým organismem byla jednobuněčná extrémofilní červená řasa *Galdieria sulphuraria* třídy Cyanidiophyceae. Oba modelové organismy se jeví, jako slibní zástupci pro biotechnologické účely.

2.1.1 *Desmodesmus quadricauda*

Zelená cenobiální řasa *Desmodesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson kmen Greifswald/15 byla dovezena ze Sbírký autotrofních mikroorganismů (CCALA – Culture Collection of Autotrophic Organisms) Botanického ústavu AV ČR, Dukelská 135, Třeboň. Ve sbírce je uváděna pod bývalou taxonomickou klasifikací *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson (kmen Greifswald/15), která se užívala v mnoha starších publikacích.

Rod *Desmodesmus* (Chlorophyta, Sphaeropleales, Scenedesmaceae) byl separován od rodu *Scenedesmus* (An et al., 1999) a následná fylogenetická analýza zakládající se na plastidové genomice dále odlišuje *Desmodesmus quadricauda* od blízce příbuzného *Desmodesmus communis* (Buchheim et al., 2012).

Rozmnožování buněk řasy *Desmodesmus* z jedné mateřské buňky vegetativním dělením je typické pro většinu zástupců rodu Scenedesmaceae. Vznikají vzácněji dvoubuněčná, obvykle čtyř-, nebo osmi-buněčná cenobia, která jsou tvořena propojením buněk společnou buněčnou stěnou. Na okrajových buňkách vynikají dva ostny. V buňce rozlišujeme jádro s okolním jednoduchým chloroplastem a pyrenoidem (Fott, 1967).

Řasy rodu *Desmodesmus* a *Scenedesmus* můžeme nalézt v nejrůznějších vodních biotopech, také tvoří nezanedbatelnou část fytoplanktonu stojatých vod, důležitou ve výživě živočichů (Fott, 1967).



Řasa *Desmodesmus quadricauda* slouží jako modelový organismus pro širokou paletu výzkumných projektů. Díky jejím vlastnostem, je na ní možno studovat efekty změn světelných podmínek nebo nutrientů v médiu, které působí na zásobní a jiné látky v buňkách, jako například na produkci luteinu (Xie et al., 2013), nebo biodieselu a omega-3 mastných kyselin (Nagappan & Verma, 2018). Je také často využívána na testy toxicity (Čížková et al., 2019a). Díky těmto vlastnostem je tato řasa předurčena pro biotechnologické účely.

Obrázek č. 1: *Desmodesmus quadricauda* – čtyř a osmibuněčné cenobium Náhlík, (2021).

2.1.1.1 *La4* mutant řasy *Desmodesmus quadricauda*

La4 mutant byl vytvořen na Mikrobiologickém ústavu, AV ČR v.v.i., v Laboratoři buněčných cyklů v Centru Algotech v Třeboni a doposud nebyl publikován. Záměrem byl výběr takových fenotypů mutované řasy *D. quadricauda*, které by nejlépe rostly v přítomnosti lanthanoidů. Lanthanoidové mutanty byly vytvořené EMS indukovanou mutagenézí a selektovány na agarových plotnách obsahujících lanthanoidy, se široce lišily ve svých reakcích na přítomnost lanthanoidů v médiu, přidaných nejprve v nízkých a poté ve vysokých koncentracích. Vysoká variabilita růstových reakcí byla způsobena náhodnou mutací DNA (Bökel, 2008). Takto vyselektovaný druh mutanta je využitelný v projektech pro recyklaci lanthanoidů in situ ze znečištěných odpadních vod, průmyslových odpadů atd. (Čížková et al., 2019; Das & Das, 2013; Palmieri et al., 2000). Pro tuto práci byl vybrán nejslibnější mutant s označením *La4*. *La4* mutant má identický buněčný cyklus jako kontrolní kmen řasy *D. quadricauda* s tím rozdílem, že vykazuje vyšší toleranci k lanthanoidům.

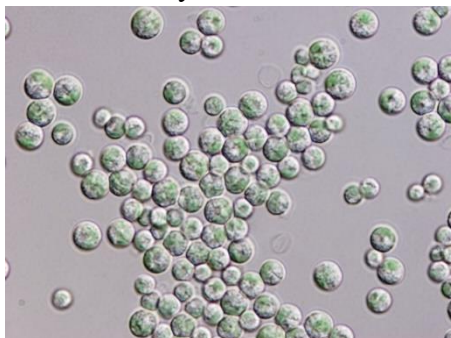
2.1.2 *Galdieria sulphuraria*

Červená jednobuněčná řasa *Galdieria sulphuraria* (Galdieri) Merola, 002 byla získána z the Algal Collection of Dipartimento delle Scienze Biologiche, Section of Plant Biology, University „Federico II“ of Naples, Italy. Řasa *Galdieria sulphuraria* je zařazena do třídy Cyanidiophyceae, která je rozdělena na tři rody *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* a *Galdieria*

(Ciniglia et al., 2014; Del Mondo et al., 2019; Gross et al., 2002). Třída Cyanidiophyceae je především známa obýváním různých přírodních lokalit včetně horkých sirných pramenů, potoků, skalních stěn, či endolitických stanovišť. Řasa *Galdieria* je extrémofilní organismus přežívající v sirných geotermálních podmínkách s velmi nízkými pH hodnotami mezi 1 - 3 a vysokými teplotami kolem 40 °C. Vykazuje jedinečný metabolismus umožňující auto-, mixo- a heterotrofní růst (Čížková et al., 2019b; Vítová et al., 2016). Všestrannost ve využívání zdrojů uhlíku pro heterotrofní růst je obrovská, včetně velkého rozsahu cukrů a alkoholů (Gross & Schnarrenberger, 1995; Scherhag & Ackermann, 2021).

Morfologie jednobuněčných taxonů Cyanidiales je poměrně jednoduchá. Silnostěnné buňky mají sférický tvar a obvykle obsahují jeden chloroplast, 1–3 mitochondrie, jádro, vakuolu a produkty energetické rezervy (Merola et al., 1981; Pinto et al., 2003; Sentsova, 1994). Buňky *G. sulphuraria* jsou morfologicky nerozeznatelné od buněk řasy *Cyanidium caldarium*, jsou však dobře rozpoznatelné díky jejich schopnosti růst heterotrofně ve tmě (Ferris et al., 2005). Ve svém přirozeném prostředí, řasa *G. sulphuraria* má žlutou až zelenou barvu, pokud však roste heterotrofně v kapalném médiu, vypadá jako žlutozelená až tmavě modrozelená. Velikost buněk řasy *G. sulphuraria* je větší než řasy *C. caldarium*. Reprodukce endospór je v rozmezí od čtyř do dvaatřiceti. Jak bylo výše popsáno, řasa *G. sulphuraria* má jediný miskovitý parietálně lokalizovaný chloroplast, zahrnuje vakuolu a mitochondrie (Cozzolino et al., 2000; Čížková et al., 2019b). Morfologická podobnost mezi řasou *G. sulphuraria* a *G. phlegrea* je tak vysoká, že se používají metody pro rozpoznávání těchto druhů, jejich stanovišť a růstových požadavků, spolu s molekulárními analýzami (Čížková et al., 2019b).

Místa výskytu řasy *G. sulphuraria* jsou známa v Itálii (Ciniglia et al., 2004; Yoon et al., 2006), Yellowstonském národním parku v USA (Ferris et al., 2005; Skorupa et al., 2013), Novém Zélandě (Toplin et al., 2008), ale také nedávno byla popsána v České republice (Barcyte et al., 2018; Gross et al., 2002). Fylogenetické analýzy genu *rbcL* také ukázaly, že kmen řasy *Galdieria* z lokality těžby uhlí v Ostravě v České republice patří



ke kosmopolitním druhům řasy *G. sulphuraria*, jakožto jediný eukaryotický organismus vytvářející viditelnou biomasu na hořících hromadách uhelného odpadu (Barcyte et al., 2018; Ciniglia et al., 2014).

Obrázek č. 2: Asynchronní kultura řasy *G. sulphuraria* (Náhlík, 2021).

2.2 Buněčný cyklus řas

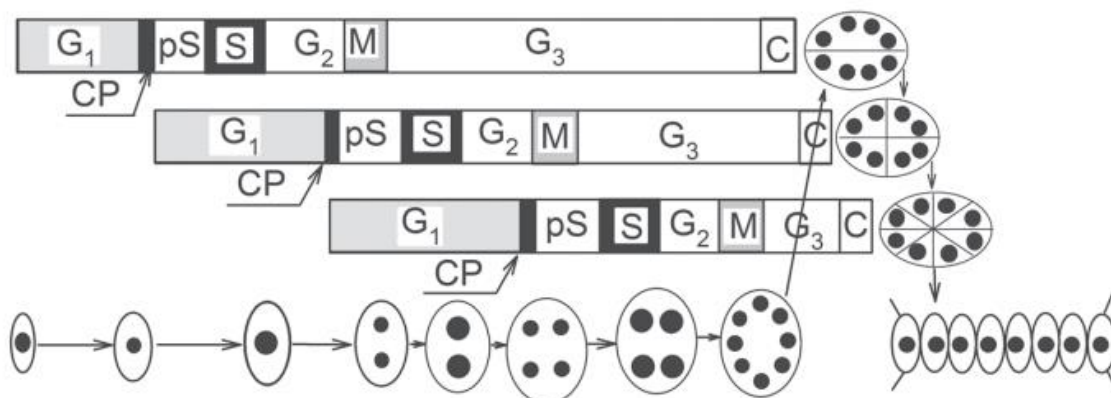
2.2.1 Buněčný cyklus řasy *Desmodesmus quadricauda*

Řasa *D. quadricauda* je charakteristická svým buněčným cyklem C_n , v literatuře též nazývaným **následný model**, nebo typ buněčného cyklu *Scenedesmus* (Zachleder et al., 2016). Jedná se o násobné dělení, při němž se buňky dělí na 2^n buněk (n je počet dělení) během jednoho buněčného cyklu. Po celý buněčný cyklus setrvávají buňky po rozdělení v cenobiích, tudíž sdílejí jednu společnou vrstvu buněčné stěny (Bíšová & Zachleder, 2014).

Hlavním znakem mnohonásobného dělení u řasy *D. quadricauda* je proběhnutí postupně několika (n) růstových a reprodukčních fází během jednoho buněčného cyklu, přičemž je možnost překrývání jednotlivých fází. Proto, aby mohla proběhnout růstová fáze G1 je zapotřebí dostatečné množství energie z CO_2 a světla. Pokud buňka doroste potřebného objemu a nashromáždí energetické rezervy, může spustit kaskádu reprodukčních kroků regulačního bodu neboli „commitment pointu“ (dále jako CP), jako například dělení jader a protoplastů, replikaci DNA a vytváření dceřiných buněk (Šetlík et al., 1984).

Prvním spuštěným reprodukčním pochodem po dosažení CP v buňce je presyntetická fáze – pS, která je následována replikací DNA a mitózou (Zachleder et al., 1997). Buňky mohou stále navyšovat svůj objem během tohoto reprodukčního období a dosáhnout druhého CP, který je spouštěčem kaskády reprodukčních procesů (Zachleder et al., 2016).

Po dokončení každé fáze M, je na řadě fáze G3, při které dojde k pauze mezi mitózou a cytokinezí (Zachleder et al., 1997). Buňky se během této fáze stanou mnohojadernými a cytokineze může proběhnout až na konci buněčného cyklu, kdy jsou všechny fáze M ukončeny, viz obrázek č. 3 (Zachleder et al., 2002).



Obrázek č. 3: Zjednodušené zobrazení buněčného cyklu řasy *D. quadricauda* (Zachleder et al., 1997). Specifické vysvětlení je možné nalézt v textu nad obrázkem.

Kromě běžných fází buněčného cyklu (G1, S, G2, M) je možno v buněčném cyklu řasy *D. quadricauda* rozlišit presyntetickou fází (pS) a fází G3. Spouštěčem presyntetické fáze je CP, a tato fáze je ukončena začátkem S fáze. Pokud buňka dosáhne CP, dojde k průběhu všech fází buněčného cyklu, i v případě zastavení růstu (např. tmou), za využití energetických rezerv, jako jsou například lipidy, polyfosfáty a škroby (Zachleder et al., 1997).

C_n cykly jsou charakteristické pro většinu buněk řas Chlorococcales a Volvocales, jako jsou *Chlorella*, *Desmodesmus*, *Scenedesmus* nebo *Chlamydomonas*. Tyto řasy se staly populárními ve studiích buněčného cyklu (Lorenzen, 1957; Tamiya, 1966), protože je lze snadno synchronizovat střídáním časových etap světla a tmy, což je postup, který je považován za přirozený, a kde je indukovaná synchronie velmi vysoká. Vzhledem k přítomnosti více replikací DNA, jaderného a buněčného dělení, je cyklus mnohem složitější než klasické schéma a má řadu modifikací. Důležité je, že dochází k rozsáhlému překrývání duplikace genomu replikací DNA, separace genomu jaderným dělením a k dělení buněk. Všechny procesy buněčného cyklu komplikují navíc ekvivalentní procesy v mitochondriích i chloroplastech (Zachleder et al., 2016). Je zajímavé, že buněčný cyklus C_n sdílí některé společné rysy s prokaryotickým buněčným cyklem (Šetlík et al., 1972).

2.2.2 Buněčný cyklus řasy *Galdieria sulphuraria*

Podobně jako některé jiné mikrořasy se i řasa *G. sulphuraria* dělí mnohonásobným dělením na čtyři nebo až 32 dceřiných buněk (Albertano et al., 2000; Jong et al., 2021; Merola et al., 1981). Vícenásobné dělení vede k uvolnění 2^n dceřiných buněk z jediné mateřské buňky v rámci jednoho buněčného cyklu. Buněčný cyklus zahrnuje procesy buněčného růstu (růstová sekvence – G1 fáze) a reprodukce (reprodukční sekvence – replikace a jaderné dělení – S a M fáze, v tomto pořadí). Vícenásobný růst a reprodukční sekvence, překrývající se v cyklu mnohočetného dělení, jsou navzájem propojeny s buněčným dělením. Růstová fáze buňky vede k přibližnému zdvojnásobení velikosti i buněčné hmoty, a také ke zvýšení obsahu RNA a proteinů v buňce (Bišová et al., 2014; Zachleder et al., 2016). Zdvojnásobení nebo dosažení kritické velikosti buněk se zdá být nezbytným předpokladem pro vstup do buněčného cyklu v regulačním bodě (CP), který je funkčním ekvivalentem STARTu u kvasinek (Reed, 1980) a restričního bodu u savčích buněk (Pardee, 1974).

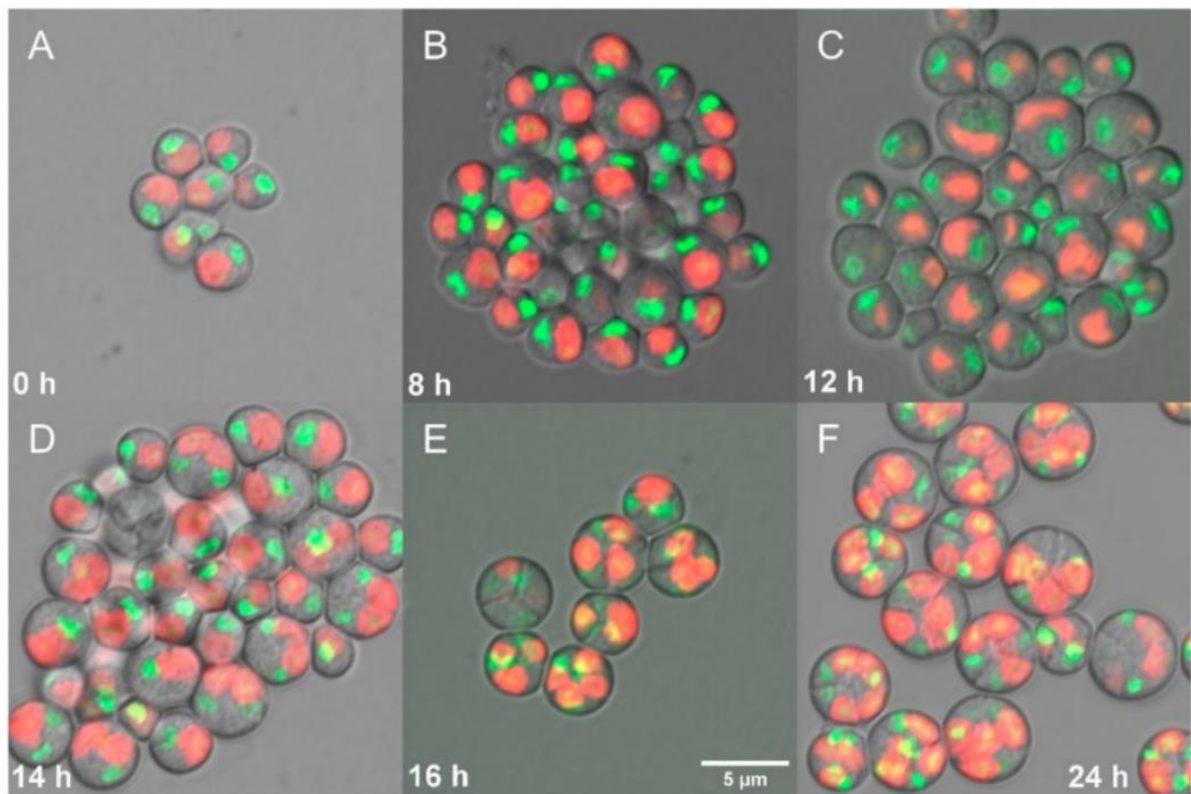
Kultury řas jsou běžně synchronizovány střídáním režimu světlo/tma (L/D), které napodobují situaci v přírodě. Když řasy rostou autotrofně, buňky v temnostní fázi růst nemohou, ale jsou schopny se dělit. Proto definovaným střídáním světla a tmy se buňky sjednotí ve stejné životní fázi a čase, což vede k synchronní populaci (Zachleder et al., 2016).

Zatímco metodika synchronizace zelených řas je dobře propracována (Hlavová et al., 2016), synchronizace červených mikrořas zůstává omezená. U specializovaných extremofilních řas příbuzných řase *G. sulphuraria*, byl rozsáhle studován pouze jeden druh, řasa *Cyanidioschyzon merolae*, která se dělí binárním štěpením s fázemi S a M probíhajícími ve tmě. Úspěšná synchronizace byla provedena režimem střídání světla a tmy (L/D) (Miyagishima et al., 2014). Buněčný cyklus řasy *C. merolae* byl rozsáhle studován zejména z pohledu koordinace mezi mitotickým a organelovým dělením (Fujiwara et al., 2020; Ichinose & Iwane, 2021; Imoto et al., 2010). Podobně byl studován také buněčný cyklus mezofilní jednobuněčné červené řasy *Porphyridium sp.* (Simon-Bercovitch et al., 1999) a synchronizace řas pomocí režimu světlo/tma byla popsána pro *Porphyridium purpureum* (Kopecký et al., 2004) a *Porphyridium cruentum* (Fuentes et al., 1999).

Nedávno byl kmen *G. sulphuraria* 074W částečně synchronizován L/D režimem 12/12 h při nízké intenzitě světla ($100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Tento druh kultivace vedl k obohacení dělicích se buněk v temné fázi, ale celkové procento dělicích se buněk v populaci bylo poměrně nízké, 10–15 % (Jong et al., 2021). Tato studie umožnila mikroskopickou analýzu

počtu vzniklých dceřiných buněk a prokázala existenci kritické velikosti buněk pro CP, ale neumožnila důkladnější analýzu postupu buněčného cyklu.

Synchronizace kultury *G. sulphuraria* za optimálních růstových podmínek L/D cyklem a charakterizace děju buněčného cyklu, jako dosažení CP, replikace DNA, jaderné a buněčné dělení byla popsána až v práci Náhlík et al., (2021). V této studii byl vyvinut protokol pro synchronizaci *G. sulphuraria* za optimálních podmínek (500 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 40 °C, pH 3). L/D cyklus byl stanoven na 16/8 h. Aplikací tohoto L/D cyklu bylo dělení na 4 dceřiné buňky dokončeno během 24 hodin v celé populaci. Podobně u řasy *G. sulphuraria* kmene 074W bylo pozorováno dělení většinou na 4 nebo 8 a zřídka 16 dceřiných buněk (Jong et al., 2021). Ostatní druhy *Galdieria* se dělí na 32 autospor nebo 16 autospor (Albertano et al., 2000). Počet dělení může záviset jak na daném kmenu, tak na použitých kultivačních podmínkách. V našem případě synchronizovaná kultura dosáhla dvou CP se středními hodnotami přibližně v 10. a 13. hodině buněčného cyklu. Dosažení CP umožnilo dvě kola replikace DNA, která začala ve 12. hodině a byla dokončena ve 22. hodině. Pro replikaci DNA nebyl patrný postupný model, ale došlo k očekávanému čtyřnásobnému zmnožení DNA. Po replikaci DNA následovalo dělení jádra a dvě kola dělení protoplastů se středními hodnotami v 15. a 19. hodině. Dceřiné buňky *G. sulphuraria* zůstaly v mateřské buněčné stěně i během temnostní fáze, a byly uvolněny až na začátku další světelné fáze, což je v souladu s pozorováním *G. sulphuraria* kmen 074W dle Jong et al., (2021).



Obrázek č. 4: Fluorescenční mikrofotografie synchronní kultury *Galdieria sulphuraria* pěstované za optimálních podmínek ($500 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 3). Dceřiné buňky ((A) 0 h), rostoucí jednotlivé buňky ((B) 8 h), chloroplast a jádra se začínají dělit ((C) 12 h), dělení na 2 buňky ((D) 14 h), dělení na 4 buňky, patrné dělení protoplastů ((E) 16 h), čtyři dceřiné buňky rostoucí uvnitř původní mateřské buněčné stěny před jejich uvolněním ((F) 24 h). Jádra (zeleně) byla obarvena SYBR Green I, chloroplasty (červeně) – autofluorescence chlorofylu. Měřítko představuje $5 \mu\text{m}$. Převzato z Náhlík et al., (2021).

2.3 Vzácné kovy

2.3.1 Obecný úvod









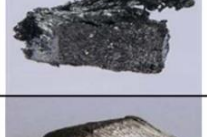


Společnost po celém světě čelí velkým výzvám v podobě změny klimatu, zásobování energiemi a dostupnosti vzácných, nebo také jinak nazývaných kritických kovů. Kovy jsou zásadním artiklem hospodářství a nepostradatelné v technologiích. Společnost stojí před řešením problému s nedostatkem těchto kovů a recyklací nejen v Evropské unii, ale ve všech průmyslových regionech na světě (Gunn, 2014).

2.3.2 Charakteristika vzácných kovů

Vzácné nebo kritické kovy jsou velice odlišné svými vlastnostmi napříč periodickou tabulkou prvků. Jejich chemické vlastnosti s obrázky a příklady použití blíže přiblíží tabulka č. 1, jež byla převzata z Rema systém a.s., (2015).

Tabulka č. 1: Základní vlastnosti a využití vybraných vzácných kovů. Tabulka byla převzata z Rema Systém, a.s.; (2015).

Skupina prvků	Český název	Chemická značka	Protonové číslo / Relativní atomová hmotnost	Hustota (g/cm ³) / skupenství za normálních podmínek	Obrázek - kov	Příklady použití
I.A	Lithium	Li	3 / 6,941	0,534 / pevné		keramika a sklo (Li ₂ CO ₃); pyrotechnika (LiNO ₃ , LiClO ₃); betonové podlahy (Li ₂ SiO ₃); chladiva (LiBr); katalyzátory; Li-ion články (LiFePO₄) ; slitiny
II.A	Berylium	Be	4 / 9,012	1 848 / pevné		slitiny pro jadernou techniku; keramika (Be ₃ N ₂); elektrotechnika - izolant v polovodičových součástkách a součást teplovodních past (BeO)
III.B	Scandium	Sc	21 / 44,956	3,0 / pevné		oceli; žáruvzdorné materiály a speciální skla; rtuťové výbojky (ScJ3)

Yttrium	Y	39 / 88,906	4,47 / pevné		červený luminofor barevných obrazovek; slitiny; sklo; supravodiče; palivové články (MCFC, SOFC); vysokotlaké rtuťové výbojky; lasery (KY(WO ₄) ₂ :Yb); autokatalyzátory
Lanthan	La	57 / 138,906	6,7 / pevné		skla (La ₂ O ₃); slitiny; NiMH akumulátory (LaH₃); palivové články (SOFC); luminofory; krakovací katalyzátory
Cer	Ce	58 / 140,115	6,78 / pevné		keramika a sklo (Ce ₂ S ₃); autokatalyzátory (CeO₂); palivové články (SOFC); žáruvzdorné materiály (CeB ₆); součást prostředků pro leštění skel; LED diody
Praseodym	Pr	59 / 140,908	6,77 / pevný		slitiny; keramika a sklo (Pr ₂ O ₃); palivové články (SOFC); permanentní magnety
Neodym	Nd	60 / 144,24	7 / pevné		permanentní magnety; lasery; keramika a sklo; slitiny; kondenzátory
Promethium	Pm	61 / (144,912)	6,475 / pevné		zářiče; jaderná technika
Samarium	Sm	62 / 150,360	7,536 / pevné		sklo; lasery; permanentní magnety (SmCo₅, Sm₂Co₁₇); jaderná technika; mikrovlnná technika
Europium	Eu	63 / 151,965	5,259 / pevné		červené luminofory CRT obrazovek; barviva
Erbium	Er	68 / 167,26	9,05 / pevné		jaderná technika; slitiny; keramika a sklo (Er ₂ O ₃); luminofory; optická vlákna; lasery
Thulium	Tm	69 / 168,934	9,33 / pevné		luminofory; ochranné prvky na bankovkách; lasery; mikrovlnná technika
Ytterbium	Yb	70 / 173,04	6,98 / pevné		keramika (Yb ₂ O ₃); slitiny; optická vlákna; lasery
Lutecium	Lu	71 / 174,967	9,85 / pevné		katalyzátory (Lu ₂ O ₃); detektory záření (LuTaO ₄); X-ray luminifory

	Gadolinium	Gd	64 / 157,25	7,895 / pevné		PC harddisky a paměťová media ; jaderná technika; keramika a sklo ($GdNO_3$) ₃ ; lasery ($KGd(WO_4)_2:Nd$)
	Terbium	Tb	65 / 157,25	8,253 / pevné		zelené luminofory pro barevné TV obrazovky; magnetooptická záznamová zařízení; permanentní magnety
	Dysprosium	Dy	66 / 162,5	8,536 / pevné		jaderná technika; světelná technika (DyJ3); permanentní magnety
	Holmium	Ho	67 / 164,93	8,78 / pevné		jaderná technika; permanentní magnety , sklo (Ho_2O_3); lasery
V.B	Niob	Nb	41 / 92,906	8,57 / pevné		slitiny (FeNb) - superslitiny; sklo (Nb_2O_5); supravodiče
	Tantal	Ta	73 / 180,948	16,6 / pevné		kondenzátory ; sklo (Ta_2O_5); katalyzátor (TaF_5)
VI.B	Chrom	Cr	24 / 51,996	7,19 / pevné		slitiny (FeCr); záruvzdorné materiály; zpracování kůží; pyrotechnika (CrO_2Cl_2)
	Wolfram	W	74 / 183,84	19,3 / pevné		světelné zdroje (W, $CaWO_4$) ; slitiny; pigmenty; katalyzátory; polovodiče (WF6) ; tvrdokovy (WC)
	Ruthenium	Ru	44 / 101,07	12,2 / pevné		katalyzátory; slitiny; supravodiče
	Osmium	Os	76 / 190,23	22,66 / pevné		slitiny
VIII.B	Kobalt	Co	27 / 59,333	8,9 / pevné		slitiny (superslitiny); keramika a sklo; magnety
	Rhodium	Rh	45 / 102,905	12,42 / pevné		autokatalyzátory

	Iridium	Ir	77 / 192,22	22,65 / pevné		slitiny; keramika
	Palladium	Pd	46 / 106,42	12,02 / pevné		katalyzátory (PdO); autokatalyzátory; slitiny; keramika
	Platina	Pt	78 / 195,08	21,45 / pevné		slitiny; katalyzátory; šperky
II.B.	Rtuť	Hg	80 / 200,59	13,456 / kapalné		zdroje světla ; elektrolýza
III.A	Galium	Ga	31 / 69,723	5,907 / pevné		slitiny; zrcadla; polovodiče ; zdroje světla (LED-GaAs, GaN, GaP, GaSb) ; fotovoltaické články (CIGS)
	Indium	In	49 / 114,818	7,31 / pevné		zrcadla; pájky; fotovoltaické články (CIGS) ; pyrotechnika (In(NO ₃) ₃ P); polovodiče (In₂O₃) ; zdroje světla (fotodiody - InAs, InSb, halogenidové výbojky - InJ) ; slitiny (letecké motory)
IV.A	Germanium	Ge	32 / 72,61	5,323 / pevné		elektrotechnika (polovodiče - SiGe) ; optická vlákna; katalyzátory (výroba PET); elektrické akumulátory ; skla (GeO ₂); zdroje světla (vysokotlaké rtuťové výbojky - MgGeF₆)
V.A	Antimon	Sb	51 / 121,75	6,684 / pevné		zpomalovače hoření pneumatik a plastů (Sb ₂ O ₃ , Na ₃ SbO ₄); elektrické akumulátory (legování Pb) ; pigmenty; slitiny; hasicí směsy; katalyzátory (výroba PET)

2.3.3 Výskyt a těžba kovů

Oproti energetickým surovinám, jako je například ropa a uhlí, se kovy, v principu nespotřebovávají, ale zůstávají ve „věčném“ životním cyklu. Po prvotní extrakci z minerálního depositu v „geosféře“ jsou kovy využity v infrastruktuře a v dalších výrobcích. Například, 80 procent světové těžby platinové skupiny kovů (PGM), prvků vzácných zemin (REEs), india a galia se vytěžilo od roku 1900 v posledních třech dekadách, a to díky zvýšení využívání těchto kovů pro automobily, elektroniku, baterie a další (Hagelüken & Meskers, 2010). Kvůli průmyslu tak vzniká odpad, který však nemusí být vyhozen a nevyužit, ale může být velmi efektivně recyklován. Velkou výhodou je, že na rozdíl od hornin, jsou kovy v průmyslovém odpadu koncentrované. Těžba většiny kovů je velmi ekonomicky náročná a extrémně zatěžuje přírodu (Gunn, 2014).

Velká část kovů je těžena v Číně, která je dominujícím vývozcem antimonu, hořčíku a lanthanoidů. Dalšími důležitými těžebními mocnostmi jsou Rusko (kobalt, wolfram), Turecko (boritany, magnezit) a USA (beryllium, lanthanoidy). Čína si stanovuje velmi náročné politicko-ekonomické podmínky a snížila objem exportu kovů pro ostatní části světa, které začaly řešit krizi pomocí recyklace a vyhledáváním nových nalezišť (Rema a.s., 2015; Mancheri et al., 2019).

2.3.3 Působení vzácných kovů na rostliny a řasy

Pro recyklaci, bioremediaci a bioakumulaci vzácných kovů a jejich působení na metabolismus jsou studovány nejen různé skupiny řas, ale také zástupci rostlin a hub (d'Aquino et al., 2009; Yang et al., 2020). Studie Lyu et al., (2019) poukazuje na použití yttria k bioakumulaci niklu, jakožto ochránce funkcí fotosyntézy u rdestu (*Potamogeton crispus*). Yttrium snižuje oxidaci a potřebnost vody pro fotosyntézu, zároveň navyšuje obsah chlorofylu typu *b*. Díky možnosti fungovat ve fotosyntetických jednotkách zabraňuje yttrium ukládání niklu v listech a stahuje ho do kořenů a stonků, čím přispívá k bioremediaci niklu ze zamořeného jezera.

Pozitivní efekt lanthanoidů na fotosyntézu a růst zelených řas byl prokázán ve vícero případech (Čížková et al., 2019a; Řezanka et al., 2016a; Vítová et al., 2019). Efekt lanthanových solí byl zkoumán i na řase *Parachlorella kessleri* a *Trachydiscus minutus*. Jejich účinek na pigmenty byl proměnlivý: přítomnost Ce^{3+} , Gd^{3+} , La^{3+} a Sc^{3+} způsobila zvýšení koncentrace hlavních pigmentů, jako je lutein, violaxanthin, β -karoten nebo chlorofyly, zatímco Pr^{3+} a Lu^{3+} je snížily (Goecke et al., 2017). Nízká koncentrace Ce^{3+} může pomoci řase

Haematococcus pluvialis ke zlepšení růstu a také vede ke zvýšení produkce astaxanthinu (Li et al., 2008). Obecně byly tyto účinky studovány spíše za účelem stanovení toxických koncentrací a akumulace v biomase, s ohledem na odtok z polí do potoků, při jejich využití v agronomii nebo při jejich těžbě a zpracování v dolech s vzácnými zeminami (Das et al., 2013; Evseeva et al., 2010).

Například použitím méně než 50 μM Gd^{3+} byl dokázáno zablokování flagelární reakce u zelených sladkovodních mikrořas *Spermatozopsis similis* (Hill et al., 2000), nebo bylo pozorováno snížení rychlosti plavání *Chlamydomonas reinhardtii* (Kam et al., 1999). Také u mořské nebičkaté sinice *Synechococcus sp.*, Pitta et al., (1997) použili Tb^{3+} , jako blokátor vápníku, aby prokázali, že vápník je nutný pro motilitu. Další studie zahrnovaly Gd^{3+} , jako inhibitor aktinu v rhizoidní morfogenezi zelené vláknité řasy *Spirogyra sp.* (Yoshida & Shimmen, 2009).

2.4 Červený kal (red mud)

2.4.1 Obecný úvod

Červený kal je vysoce alkalický vedlejší produkt při výrobě hliníku, který se vytváří Bayerovým zásaditým procesem. Z rozdrčeného bauxitu se za pomoci vodného roztoku hydroxidu sodného louží hydroxid hlinitý $\text{Al}(\text{OH})_3$. Zkoncentrovaný (10 – 30 %) odpadní kal je silně alkalický s pH kolem 13. Díky oxidům železa má kal typickou červenou barvu. Podle čistoty bauxitové horniny se při výrobě 1 tuny hliníku vyrobí od 1,9 do 3,6 tun odpadního červeného kalu (Redmud.org, 2015). Ročně se celosvětově tohoto odpadu vytvoří 178 milionů tun (Wang et al., 2019). V anglickém jazyce nazýváme červený kal nebo červené bahno „red mud“.

2.4.2 Skladování a nové způsoby využití červeného kalu

Způsoby skladování a využití odpadního kalu se stále vyvíjejí a mění také díky vědeckému a technickému pokroku. Redukce tohoto odpadu je velmi důležitá, protože celosvětově je ho uloženo již kolem 4 miliard tun (Wang et al., 2019). Před rokem 1980 byl kal čerpán do lagun či rybníků, často vytvořených z vyčerpaných bauxitových dolů, nebo do přehrad s betonovými hrázemi (Evans et al., 2012). Běžnou věcí také bylo vypouštění kalu do řek nebo moří za pomoci potrubí či lodí. Kal byl také vyvážen do hlubokých oceánských příkopů dostatečně daleko od pobřeží. Naštěstí se vypouštění kalu do řek, moří a oceánů plně zastavilo (Power et al., 2011). Kolem roku 2006 se začalo využívat filtračních lisů, které jsou schopny zahustit kal na tzv. filtrační koláč (< 40 % pevných látek). Poté se tento meziprodukt promyje vodou či párou pro snížení alkality. Takto zpracovaný kal je možné jednodušeji přepravovat a skladovat jako bezpečný polosuchý materiál (Sutherland, 2005). Momentálně je využití kalu velmi malé, pouze přibližně 3 miliony tun za rok se použijí jako příměsi pro beton a další konstrukce. Červený kal obsahuje velké množství cenných minerálů, které lze extrahovat, a tím i snížit objemové množství červeného kalu, a navíc navýšit hodnotu odpadu. Bauxitová hornina obsahuje velké množství železa, jeho extrakce je možná pomocí CO a H_2 plynů, nicméně extrakcí lze získat i například titan, galium, ale také lanthanoidy (Archambo & Kawatra, 2021). Ty se ovšem z červeného kalu odstraňují kyselinou sírovou a dusičnou, kvůli této skutečnosti je tento proces náročný pro životní prostředí (Abhilash et al., 2014; Alkan et al., 2017; Borra et al., 2016).

2.4.3 Ekologické nebezpečí

Dne 4. října 2010 došlo k poškození hráze a následnému úniku červeného kalu z odkaliště u města Ajka v Maďarsku. Oblast o rozloze přibližně 40 km² byla zaplavena a zamořena zhruba 700 tis. m³ červeného kalu. V této oblasti došlo k zaplavení vesnice Kolontár a města Devescer, řeka Marcal byla zničena toxicitou kalu a celá událost si vyžádala 10 obětí včetně dětí spolu s velmi vysokými škodami (Telegraph, 2010; Enserink, 2010). Dalším příkladem ekologického nebezpečí je Skotské jezero Kinghorn Loch, kde vědci sledují akumulaci arsenu (As). Arsen pochází z červeného kalu, který zde byl uložen před třiceti lety. Nejvyšší obsah As naměřený v kořenech *Persicaria amphibia* (L.) Gray (87,2 mg kg⁻¹) výrazně překročil rozmezí 3–10 mg kg⁻¹, které bylo navrženo jako potenciální fyto toxická úroveň. Akumulace toxických druhů As rostlinami naznačovala toxikologické riziko pro vyšší organismy, o nichž je známo, že využívají makrofyty jako zdroj potravy (Olszewska et al., 2016). U makrofyt může absorpce As snížit obsah fosforu (P), dusíku (N), draslíku (K), chlorofylu a také bílkovin v tkáních a vzhledem k chemické podobnosti As k P může interferovat s některými biochemickými reakcemi (Mishra et al., 2008).

2.4.4 Složení červeného kalu

Vzorek červeného kalu odebraný v hloubce 1-1,2 m má velmi vlhkou a želatinovou konzistenci. Přibližně 70 - 80 % z celkového objemu červeného kalu v úložišti má obdobné vlastnosti, jako dodané vzorky. Na odkrytých místech se tvoří silně karbonizovaná povrchová skořápka o tloušťce 5-15 cm. Pod touto vrstvou až do hloubky přibližně 0,7 m se vyskytuje suché granulátové červené bahno (Náhlík, 2018).



Obrázek č. 5: Stehlík obecný (*Carduelis carduelis*) hledající potravu mezi „krunýřovitě“ silně karbonizovanou povrchovou skořápkou červeného kalu (Envirotis Holding Inc. Co., 2015).

Kvalita bauxitové horniny a následná extrakce jsou rozhodující pro celkové složení červeného kalu. Červená barva typická pro kal je způsobena nejvíce zastoupeným prvkem – železem, které tvoří 53 % z celkového zastoupení kovových prvků v kalu. Ze seznamu analyzovaných lanthanoidů (tabulka č. 2) bylo zjištěno, že nejhojnější je cer, lanthan a neodým, a ty činí dohromady 68,4 % z celkového množství lanthanoidů. Rovněž byly nalezeny vysoké podíly skandia a yttria, 8,1 a 10,1 %. Podíl ostatních lanthanoidů byl relativně nízký a pohyboval se od 3,2 do 0,2 % viz tabulka č.2. Analýzy dalších prvků (tabulka č. 3) prokázaly jejich přítomnost na velmi vysokých hladinách, přibližně o tři řády vyšších ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) než lanthanoidů ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Čížková et al., 2019).

Tabulka č. 2: Údaje o kvalitě a homogenitě lanthanoidů v červeném bahně z maďarského Almásfüzitő. Přeloženo z Čížková et al., (2019) (Avg – průměr, SD – směrodatná odchylka).

Prvek	Značka	Obsah mg·kg ⁻¹	Avg mg·kg ⁻¹	SD	Avg%
Skandium	Sc	80–110	95	12.2	8.1
Yttrium	Y	95–140	118	18.4	10.1
Lanthan	La	140–260	200	49.0	17.2
Cer	Ce	300–550	425	102.1	36.5
Praseodym	Pr	25–49	37	9.8	3.2
Neodym	Nd	132–210	171	31.8	14.7
Samarium	Sm	26–38	32	4.9	2.7
Europium	Eu	5–8	7	1.2	0.6
Gadolinium	Gd	20–32	26	4.9	2.2
Dysprosium	Dy	20–35	28	6.1	2.4
Erbium	Er	11–18	15	2.9	1.2
Ytterbium	Yb	11–15	13	1.6	1.1
Celkově lanthanoidů			1167		100.0

Tabulka č. 3: Rozsah koncentrací hlavních složek červeného bahna z místa Depo #7 z maďarského Almásfüzitő. Přeloženo z Čížková et al., (2019) (Avg – průměr, SD – směrodatná odchylka).

Prvek	Značka	Obsah g·kg ⁻¹	Avg g·kg ⁻¹	SD	Avg%
Sodík	Na	46.0–49.1	47.6	1.55	17.183
Hliník	Al	29.6–37.7	33.7	4.05	12.165
Křemík	Si	15.6–32.6	24.1	8.5	8.700
Vápník	Ca	20.3–45.2	32.7	6.2	11.804
Titan	Ti	19.5–19.6	19.6	0.05	7.057
Mangan	Mn	1.4–1.5	1.45	0.05	0.523
Železo	Fe	146–147.6	147	0.8	53.066
		mg·kg⁻¹	mg·kg⁻¹		
Lithium	Li	70.2–74.7	72.5	2.25	0.026
Beryllium	Be	4.4–4.7	4.6	0.15	0.002
Bor	B	54.6–65.6	60.1	5.5	0.022
Hořčík	Mg	480.5–667.5	574.0	93.5	0.207
Baryum	Ba	45.3–52.2	48.7	3.45	0.018
Vanad	V	741.6–750.7	746.6	4.8	0.270
Chrom	Cr	352.3–370.9	361.5	9.3	0.130
Kobalt	Co	35.3–33.9	34.6	0.7	0.012
Nikl	Ni	173.7–283.5	228.6	54.9	0.083
Měď	Cu	73.1–76.5	74.53	1.7	0.027
Zinek	Zn	112.5–113.4	112.95	0.45	0.041
Gallium	Ga	22.5–22.9	22.7	0.2	0.008
Arsen	As	98.1–100.8	98.85	1.35	0.036
Rubidium	Rb	1.3–1.3	1.3	0	0.000
Stroncium	Sr	584.0–623.2	603.6	19.6	0.218
Zirkonium	Zr	445.7–457.2	451.45	5.75	0.163
Niob	Nb	55.1–55.6	55.35	0.25	0.020
Molybden	Mo	11.8–12.1	11.95	0.15	0.004
Palladium	Pd	4.9–5.0	4.95	0.05	0.002
Stříbro	Ag	1.1–1.2	1.15	0.05	0.000
Kadmium	Cd	1.2–1.4	1.3	0.1	0.000
Cín	Sn	11.3–11.6	11.45	0.15	0.004
Antimon	Sb	11.6–11.7	11.64	0.05	0.004
Tellur	Te	1.2–1.4	1.3	0.1	0.000
Hafnium	Hf	11.2–11.7	11.45	0.25	0.004
Tantal	Ta	4.5–4.5	4.5	0	0.002
Wolfram	W	2.9–3.0	2.95	0.05	0.001
Celkově prvků			309.7	g·kg⁻¹	

2.4.5 Motivace pro výzkum červeného kalu

Červeného kalu je ročně vyprodukováno zhruba 178 milionů tun. Tento fakt, spojený s vysokým pH kalu, způsobuje nemalou zátěž na životní prostředí. V průmyslu se začíná projevovat nedostatek většiny kovů, a proto se přechází k možnosti recyklace a bioakumulace. Složení červeného kalu v zastoupení železa, titanu, vzácných kovů a dalších se jeví, jako potenciální možnost jeho využití, coby sekundárního zdroje těchto kovů. Již prvotní výzkum (Čížková et al., 2019a) potvrdil, že řasy kultivované s příměsí červeného kalu mohou akumulovat, a tedy i recyklovat vzácné a další kovy. Tato práce má za úkol tyto poznatky rozšířit.

3 CÍLE PRÁCE

- 1) **Kultivace synchronní kultury *La4* mutanta řasy *D. quadricauda* s přidavkem extraktu červeného kalu a stanovení množství naakumulovaných vzácných kovů z biomasy za pomoci ICP-MS.**

Hypotéza:

- a) Rozpuštěním červeného kalu v kyselině a odfiltrováním pevných částic by mělo dojít ke zvýšení bio-dostupnosti vzácných kovů a zlepšení dostupnosti světla pro řasové kultury.
- b) Přidané vzácné kovy z extraktu červeného kalu ovlivní růst mutantního kmenu *La4* řasy *D. quadricauda* a také složení jeho fotosyntetických barviv.
- c) Mutantní kmen *La4 D. quadricauda* bude akumulovat vysoké množství vzácných kovů z extraktu červeného kalu.

- 2) **Kultivace synchronní kultury červené extrémofilní řasy *G. sulphuraria* s přidavkem extraktu červeného kalu a stanovení množství naakumulovaných vzácných kovů z biomasy za pomoci ICP-MS.**

Hypotéza:

- a) Extrémofilní řasa *G. sulphuraria* bude vykazovat, díky své ekologii, lepší růst v kyselém prostředí způsobeném extraktem červeného kalu, než mutantní kmen *La4 D. quadricauda*.
- b) Ovlivnění kultury extraktem červeného kalu může způsobit změny ve složení fotosyntetických barviv.
- c) Akumulace vzácných kovů bude závislá na fázi buněčného cyklu.

- 3) **Porovnání akumulace vzácných kovů z červeného kalu v odlišných trofických režimech řasy *G. sulphuraria* za pomoci ICP-MS.**

Hypotéza:

- a) Mixotrofní režim řasy *G. sulphuraria* bude vykazovat vyšší a rychlejší růst než režim autotrofní.
- b) Akumulace vzácných kovů bude u mixotrofního režimu vyšší než u autotrofního.

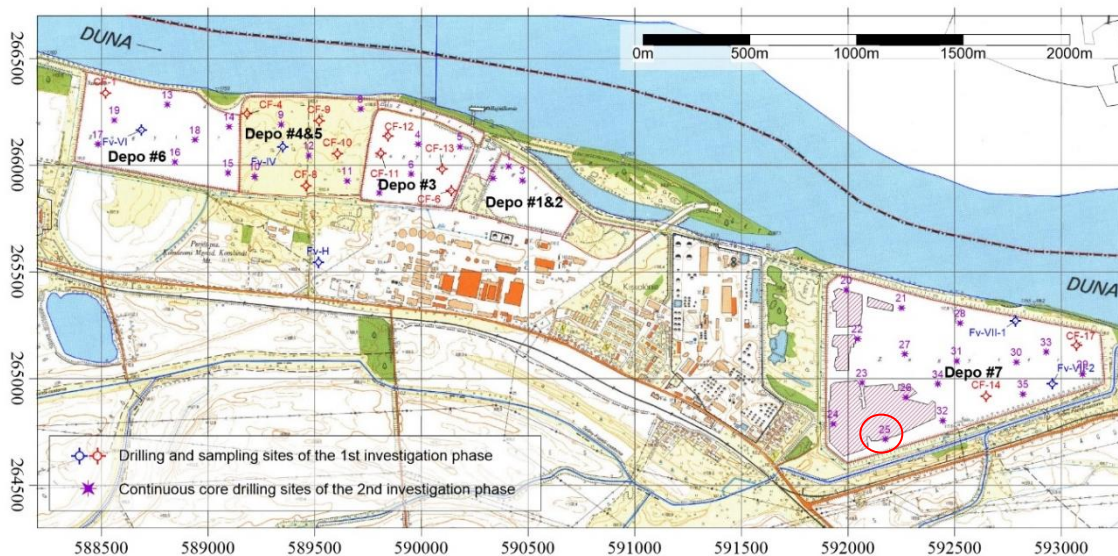
4 METODIKA

4.1 Odebrání vzorků červeného kalu.

Ve spolupráci s Dr. Balász Kovács ze společnosti Envirotis Holding Inc. Co. (Budapešť, Maďarsko) byly vzorky červeného kalu odebrány a zaslány do Laboratoře buněčných cyklů, Mikrobiologického ústavu, AV ČR v.v.i. Centra Algotech v Třeboni.

Vzorky pochází z místa sonického jádrového vrtání s označením #25 z RSA červeného kalu nesoucí název Depo #7 z místa Almásfüzitő. Souřadnice místa odběru (592155; 264730) Hloubka vrtání při odběru vzorku byla v rozmezí 1-1,2 m. (viz mapa níže obrázek č. 6). Podobné vzorky bahna byly již použity v předchozí práci, viz Náhlík, (2018).

Firma Envirotis Holding Inc. Co. (Budapešť, Maďarsko) pracuje na rekultivaci a revitalizaci poškozené oblasti, která bude brzy dokončena (obrázek č. 7).



Obrázek č. 6: Mapa rekultivované oblasti Almásfüzitő s označenými Depy (Envirotis Holding Inc. Co., 2015).



Obrázek č. 7: Rekultivovaná oblast Almásfüzitő. Depo #7 se nachází v popředí, v pozadí Depo #1-6 (Envirotis Holding Inc. Co., březen 2012).

4.2 Příprava kyselého výluhu červeného kalu (RM).

Kal byl rozpuštěn v 10 % HNO_3 v koncentraci $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pro lepší rozpuštění se nechal extrakt třepat 15 min na třepáče a poté stát při pokojové teplotě po dobu 12 hodin. Po odstátí se roztok nechal třepat 3 h na střední rychlost a byl zcentrifugován při 2772 rcf 10 min. Následně byl extrakt přefiltrován skrz $0,45\mu\text{m}$ filtr. Skladování bylo možné v chladné komoře.

4.2.1 Kultivace *La4* mutantu řasy *D. quadricauda*

Pro kultivaci *La4* mutantu *D. quadricauda* bylo použito standardní živné médium $\frac{1}{2}$ ŠS (Šetlík – Simmer) (Zachleder & Šetlík, 1982).

Synchronizace kultur byla provedena režimem světlo/tma v poměru 15 h světla a 9 h tmy. Osvětlení fotobioreaktoru z jedné strany zajistily zářivky (Osram DULUX L, 55W/840) jejichž vlnová délka se pohybovala mezi 400 a 720 nm. Tyto hodnoty odpovídají viditelnému světlu, které je nepostradatelné pro fotosyntetické reakce. Kultivace probíhala při intenzitě světla $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Konstantní teplota pro kultivaci byla $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a kultury byly provzdušňovány směsí vzduchu obsahujícího 2 % (v/v) oxidu uhličitého.

Pro přípravu dostatečně husté synchronní kultury byly použity skleněné válce (objem 300 mL), které obsahovaly $\frac{1}{2}$ ŠS médium s naočkovanou kulturou z agarové plotny. K zachování kultur se využívalo Petriho misek s živným médiem, obsahujícím agar o koncentraci 1,5 %. Směs 1,5 % agaru s živným médiem prošla sterilizací v autoklávu při $121 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 minut. Do misek (vrstva cca 0,5 cm) bylo možno tuto směs přelévat po vychladnutí na zhruba $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Kultury na miskách byly pravidelně přeočkovány každé tři týdny (Náhlík, 2018).

Tabulka č 4: Složení živného média ½ ŠS dle Zachleder a Šetlík, (1982).

Sloučeniny	Výsledná koncentrace v médiu
KNO_3	$2,021 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
K_2HPO_4	$0,140 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
KH_2PO_4	$0,340 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0,988 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,011 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
Fe/NaEDTA	$0,018 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
H_3BO_3	$3,10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1,43 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$1,20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1,24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
$\text{CoSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1,40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
$(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$1,84 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

4.2.2 Kultivace řasy *G. sulphuraria* 002

Jednobuněčná červená řasa *Galdieria sulphuraria* (Galdieri) Merola, 002 byla pěstována v modifikovaném *Galdieria* mediu (viz tab. 5) upraveným na pH 3 pomocí HNO₃. Kultivace probíhala autotrofně, pokud bylo zapotřebí mixotrofního režimu, ke kulturám byl přidán 1 % glycerol jako zdroj uhlíku. Suspenze řas ve fotobioreaktorech byly provzdušňovány plynnou směsí vzduchu a CO₂ (2 % (v/v)) při průtoku 15 L h⁻¹ (Náhlík et al., 2021; Řezanka et al., 2016b).

Suspenze řas byla pěstována ve válcích o objemu 300 mL ve fotobioreaktorech ozařovaných z jedné strany zářivkami (Osram DULUX L, 55W/840) o intenzitě světla 500 μmol.m⁻².s⁻¹ a teplotě 40 °C. Přechovávání kultur na Petriho miskách probíhalo velmi podobně jako u *D. quadricauda*, s rozdílem v koncentraci agaru, která pro kyselé *Galdieria* médium byla navýšena na 3 %. Pro kontrolu bioakumulace kovů byla provedena synchronizace kultury režimem světlo/tma v poměru 16 h světla a 8 h tmy (Náhlík et al., 2021).

Tabulka č 5: Složení modifikovaného Galdieria média, všechny chemikálie pochází z Penta, Chrudim, Česká republika (Řezanka et al., 2016b).

Sloučeniny (makroelementy)	Výsledná koncentrace v g·L⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,31
KH ₂ PO ₄	0,27
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25
C ₁₀ H ₁₂ O ₈ N ₂ NaFe	0,02
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,14
Mikroelementy ředěné 500x ze zásobního roztoku ve výsledné koncentrace v mg·L⁻¹	
H ₃ BO ₃	31
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,25
Mn SO ₄ ·4H ₂ O	22,3
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,88
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,87
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	1,46
V ₂ O ₄ (SO ₄) ₃ ·16H ₂ O	0,014
Na ₂ NO ₄ ·7H ₂ O	0,3
KBr	1,19
KI	0,83
CdCl ₂	0,91
NiSO ₄	0,78
CrO ₃	0,12
Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ ·24H ₂ O	4,74

4.2.3 Kultivace modelových organismů mikrořas s přidavkem extraktu z červeného kalu

Pro posouzení ovlivnění růstu a následné akumulace kovů bylo zapotřebí přidat červený kal ve formě kyselého výluhu (viz. Kap. 4.2) ke kulturám *La4* mutantu řasy *D. quadricauda* nebo ke kultuře řasy *G. sulphuraria*. Kultury byly pěstovány v triplikátu v plochých kyvetách (o objemu 2,5 L) za stejných podmínek, které jsou popsány v kapitolách výše. Rozdílem však bylo, že kultury ovlivněné kyselým výluhem RM byly ředěny médiem s přidavkem výluhu RM a pH bylo upraveno NH_4OH na pH 7,4 pro *La4* mutantu řasy *D. quadricauda* nebo na pH 3 pro řasu *G. sulphuraria*. V kyvetách byly kultury ředěny v poměru 1900 mL média ku 100 mL extraktu, to odpovídá celkové koncentraci kalu v médiu rovné $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Odběry pro jednotlivá měření a analýzy u pokusů se synchronními kulturami probíhaly každé dvě hodiny v průběhu 22 h (pro *La4 D. quadricauda*) a 28 h (pro *G. sulphuraria*), poté byl pokus ukončen, protože v kulturách byl dokončen buněčný cyklus.

Koncentrace $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ extraktu červeného kalu byla použita i při experimentu s různými trofickými režimy, pouze k mixotrofním kulturám byl navíc přidán 1 % glycerol na začátku experimentu a po 48 h.

4.3 Měření optické density a stanovení sušiny

Spektrofotometrické měření (Spekol, Německo) optické density (OD) bylo vykonáváno několikrát denně při vlnové délce 750 nm ve skleněných kyvetách o průměru 0,5 cm. Kontrolní vzorky byly měřeny proti základním médiím (blank). Jako blank pro vzorky ovlivněné červeným kalu bylo použito médium s přidavkem extraktu červeného kalu, blíže popsaného v kapitole 4.2.2 (Čížková et al., 2021).

Sušina byla stanovena z 5 mL suspenze řas zcentrifugované při 2100 rcf po dobu 3 minut ve vysušených a předem zvážených 5 mL zkumavkách. Pelet byl vysušen při $105 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 12 hodin a zvážen na analytických vahách Sartorius TE214S-0CE (Sartorius, Göttingen, Německo). Data v grafech jsou prezentována jako průměr z triplikátu (Branyikova et al., 2011).

4.4 Mikroskopie

Pro kontrolu průběhu buněčných cyklů a růstové kondice obou modelových organismů byl použit fluorescenční mikroskop Olympus BX51 vybavený filtračním blokem U-MWIBA2 (excitace/emise: 460–490/510–550 nm) (Olympus, Tokio, Japonsko) viz podkap. 4.4.1 a 4.4.2.

4.4.1 Barvení buněk pomocí DAPI

Pro rutinní počítání jader byly buňky obarveny $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 40,6-diamidino-2-fenylindol dihydrochloridu (DAPI) v S pufru (0,25 % (w/v) sacharóza, 1 mM EDTA, 0,6 mM spermidin, 0,05 % (v/v) merkaptoethanol, 10 mM Tris.HCl, pH 7,6) podle (Zachleder & Cepák, 1987) a jádra byla vizualizována fluorescenční mikroskopií.

4.4.2 Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Bürkerova komůrka je speciální podložní sklíčko, které se využívá při stanovení počtu červených či bílých krvinek, ale i jiných buněk (Gunetti et al., 2012).

Do komůrky bylo napipetováno 10 μL řasové kultury a poté bylo vložena do mikroskopu. Buňky byly počítány v jednotlivých čtvercích po diagonálách v celkovém počtu 24. Počet buněk v 1 mL byl vypočítán pomocí vzorce: $n * \frac{1}{4} * 10^6$, přičemž n je průměrný počet buněk na 1 čtverec. Výsledky byly poté vyneseny do grafů viz kapitola 5.

4.4.3 Barvení buněk pomocí SYBR Green

Pro vizualizaci jaderného a buněčného dělení konfokální mikroskopií byly buňky obarveny SYBR Green podle (Vitova et al., 2005). Pět mikrolitrů čerstvě rozmraženého buněčného peletu bylo smícháno s 2,5 μl SYBR Green I (ThermoFisher Scientific, Linz, Rakousko), promícháno a udržováno po dobu 5–10 minut ve tmě při pokojové teplotě. Dále byly buňky pozorovány pod konfokálním mikroskopem LSM Zeiss 880 (Carl Zeiss, Jena, Německo) s použitím následujících vlnových délek excitace: chlorofyl-633 nm a SYBR Green I-405 nm. Rozlišení: Zoom 6, objektiv 63 x, pixel size 40 x 40 nm.

4.5. RNA, DNA, Proteinová analýza

Celkové nukleové kyseliny byly extrahovány podle Wank, (1962) s modifikací Lukavský et al., (1973). Vzorky byly odstředěny v 10 mL centrifugačních zkumavkách, které sloužily i ke skladování vzorků. Pelety buněk řas byly skladovány v 1 mL ethanolu při -20 °C. Řasy byly 5x extrahovány 0,2 M kyselinou chloristou v 50 % ethanolu po dobu 50 minut při 20 °C a 3krát směsí ethanol-ether (3:1) při 70 °C po dobu 10 minut. Takto předem extrahované vzorky bylo možné skladovat v ethanolu při -20 °C. Celkové nukleové kyseliny byly extrahovány a hydrolyzovány 0,5 M kyselinou chloristou při 60 °C po dobu 5 hodin. Po hydrolyze byla přidána koncentrovaná kyselina chloristá, aby se dosáhlo konečné koncentrace 1 M kyseliny chloristé ve vzorku. Absorbance celkových nukleových kyselin v supernatantu byla měřena spektrofotometricky při 260 nm (A_{260}).

Světlem aktivovaná reakce difenylaminu s hydrolyzovanou DNA, jak je popsána Decallonne & Weyns, (1976), byla použita s modifikací Zachleder, (1984): Difenylaminové činidlo (4% difenylamin v ledové kyselině octové, w/v) bylo smícháno se vzorky celkových extraktů nukleových kyselin v poměru 1:1 a směsi ve zkumavkách byly osvětleny ze dvou stran zářivkami (Tesla Z, 40 W, Tesla lighting, Praha, ČR). Dopadající záření z každé strany bylo $150 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Po 6 hodinách osvětlení při 40 °C byl změřen rozdíl mezi A_{600} a A_{700} nm. Obsah RNA byl vypočten z rozdílu mezi celkovými nukleovými kyselinami a obsahem DNA.

Sediment zbývající po extrakci nukleové kyseliny byl použit pro stanovení proteinu. Zbytkový sediment byl hydrolyzován 1M NaOH po dobu 1 h při 70 °C. Koncentrace proteinu byla kvantifikována pomocí Folina a Ciocalteuova fenolového činidla (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Německo) podle postupu popsaného Lowry et al., (1951) Stejný postup byl proveden pro sestavení kalibrační křivky nastavené různými koncentracemi hovězího sérového albuminu.

4.6. Měření maximálního kvantového výtěžku (Fotochemie RCII)

Fluorescenční poměr variabilní ku maximální fluorescenci (F_v/F_m) je obecným indikátorem snížení funkce nebo poškození reakčních center (RC) fotosystému II.

Alikvoty o objemu 2 mL byly odebrány z kultury a umístěny do plastových kyvet 10 x 10 mm po dobu 30 minut ve tmě. Data byla měřena pomocí AquaPen-C 100 (Photon Systems Instruments, Drasov, Česká republika) dle Zachleder et al., (2021).

4.7 Stanovení fykobiliproteinů u řasy *G. sulphuraria*

Celkové fykobiliproteiny byly stanoveny dle Bennett & Bogorad, (1973) a Johnson et al., (2014).

Pro extrakci fykobiliproteinů bylo odebráno 10 mL homogenizované kultury, která byla zcentrifugována při 2772 rcf po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Buněčný pelet byl promyt 2-3 krát destilovanou vodou a resuspendován ve 20 mM acetátovém pufru (pH 5,1) obsahujícím 40 mM NaCl a 0,02 M azid sodný. Poté následovalo opakované zmrazení a rozmrazení, dokud se shromážděný supernatant nestal bezbarvý. Odebraný supernatant byl použit pro stanovení fykobiliproteinů vyjádřených v mg mL^{-1} pomocí následující rovnice:

$$\text{PC} = (A_{615} - 0.474 \times A_{652}) / 5.34$$

$$\text{APC} = (A_{652} - 0.208 \times A_{615}) / 5.09$$

$$\text{PE} = [(A_{562} - (2.41 (\text{PC}) - (0.849 \times \text{APC})))] / 9.62$$

$$\text{Celkové fykobiliproteiny} = \text{PC} + \text{APC} + \text{PE}$$

Zde PC-fykocyanin, PE-fykoerythrin a APC-allofykocyanin, A_{615} , A_{652} a A_{562} jsou absorbance při 615 nm, 652 nm a 562 nm. Měřeno v UV-VIS spektrofotometru (Shimadzu 1800-UV, Shimadzu Corp., Japan).

4.8 Stanovení chlorofylu a a karotenoidů u řasy *G. sulphuraria*

Pro změření chlorofylu *a* (Chl *a*) a karotenoidů (*car*) bylo odebráno 10 mL kultury, která byla zcentrifugována při 2772 rcf po dobu 5 minut při pokojové teplotě, promyta a následně byl pelet resuspendován v 10 mL 80 % acetonu a uchováván přes noc v chladničce při 4 °C, aby se mohl vyextrahovat pigment. Po centrifugaci, při 2772 rcf, po dobu 5 minut při pokojové teplotě, byla absorbance čirého supernatantu měřena při 663 nm a 470 nm v UV-VIS spektrofotometru (Shimadzu 1800-UV, Shimadzu Corp., Japonsko). Množství Chl *a* a Car bylo vypočteno pomocí specifického absorpčního koeficientu podle Mackinney, (1941).

4.9 Stanovení pigmentů u *La4* mutanta řasy *D. quadricauda*

Pro stanovení Chl *a*, Chl *b* a karotenoidů (*car*) bylo odebráno 10 mL řasové suspenze, která byla stočena při 2772 rcf po dobu 5 min. Po odsátí byl na pelet přidán 1 mL fosfátového pufru a 10 µg MgCO₃.

Fosfátový pufr: (0,1M KH₂PO₄: 0,1M Na₂HPO₄.12H₂O, 1:9; pH 7,7)

Dalším krokem bylo přidání 500 µL 0.75-1.00 mm skleněných kuliček pro rozbití stěn a drcení po dobu 5 min na vortexu (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA). Poté bylo přidáno 4 mL 100 % Acetonu, vzorek byl promíchán a zcentrifugován při 2772 rcf po dobu 5 min. Supernatant byl přesunut do kalibrovaných zkumavek se špuntem a byly uloženy do tmavého bloku. Ke zbývajícím peletu bylo přidáno 4 mL 80 % acetonu, vzorek byl promíchán a podruhé zcentrifugován při 2772 rcf po dobu 5 min. Nový supernatant byl přesán do kalibrovaných zkumavek se zátkou s již odebraným supernatantem z prvního kola a uložen do tmavého bloku. Kalibrované zkumavky se vzorky byly doplněny 80 % acetonem do 10 mL.

Měření absorbance spekter při 750, 664, 647, 470 a 450 nm bylo provedeno na spektrometru UV-1800 Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan)

Obsah chlorofylu *a* karotenoidů byly vypočteny rovnicemi:

$$C(\text{Chl } a) = 12.25 A_{664} - 2.79 A_{647} \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

$$C(\text{car}) = ((1000 A_{470}) - (1.82 C(\text{Chl } a))) / 198 \text{ (}\mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

Analýza byla provedena dle Wellburn, (1994).

4.10. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

(ICP – MS)

Tato metoda se označuje v anglickém jazyce „Inductively coupled plasma-mass spectrometry“, jelikož je toto označení v textu velmi dlouhé bude v textu využito běžně používané zkratky ICP-MS.

4.10.1 Příprava vzorků pro ICP – MS

Biomasa obou modelových organismů byla po odebrání třikrát promyta destilovanou vodou, zcentrifugována po dobu 5 min na 2772 rcf a zamražena na - 80 °C. Následně byly vzorky lyofilizovány.

Lyofilizované vzorky řasových kultur (0,1 g) byly rozštěpeny se 3 mL 67 % HNO₃ a 0,5 mL 30 % H₂O₂ v PTFE nádobě v mikrovlnné troubě MLS1200 MEGA při 250 – 600 W po dobu 20 minut. Zbylá kyselina byla odpařena a výsledný roztok byl přenesen do odměrné baňky. Baňka byla následně doplněna 0,67 % HNO₃ (Vítová et al., 2011; Náhlík, 2018).

4.10.2 Elementární analýza vzorků (ICP – MS)

Stanovení obsahu kovů v řasové biomase za využití ICP – MS bylo realizováno na pracovišti Státního zdravotního ústavu (SZÚ) v Praze za použití Elan DRC – e (Perkin Elmer, Canada) vybaveného PTFE rozprašovačem koncentrátu, cyklonickou sprejovou komorou, kvarterovým hořákem a „Academic Response Cell“ (DRC) pro snížení spektrálních interferencí. IS roztok nutný pro kompletní stanovení kovů obsahoval Ge, In a Re (10 µg L⁻¹) ve zředěné (1:100) HNO₃. Destilovaná a demineralizovaná voda byla použita pro přípravu všech analyzovaných vzorků. Vzorky byly přefiltrovány přes 0,45 mL filtr a naředěny 1:10 s vodou. Referenční vzorky (kontroly) byly analyzovány totožně jako ostatní vzorky. Pro exaktnost výsledků a kontrolu přístrojů byly využity při měření standardy. Aby bylo dosaženo stejné koncentrace referenčních vzorků, byly vzorky vždy naředěny jako v Náhlík, 2018 a Čížková et al., 2019.

4.11 Zpracování dat

Všechna data z provedených měření byla zpracována v programu SigmaPlot 10.0. Fotografie z mikroskopů byly upraveny v programu ImageJ 1.8.

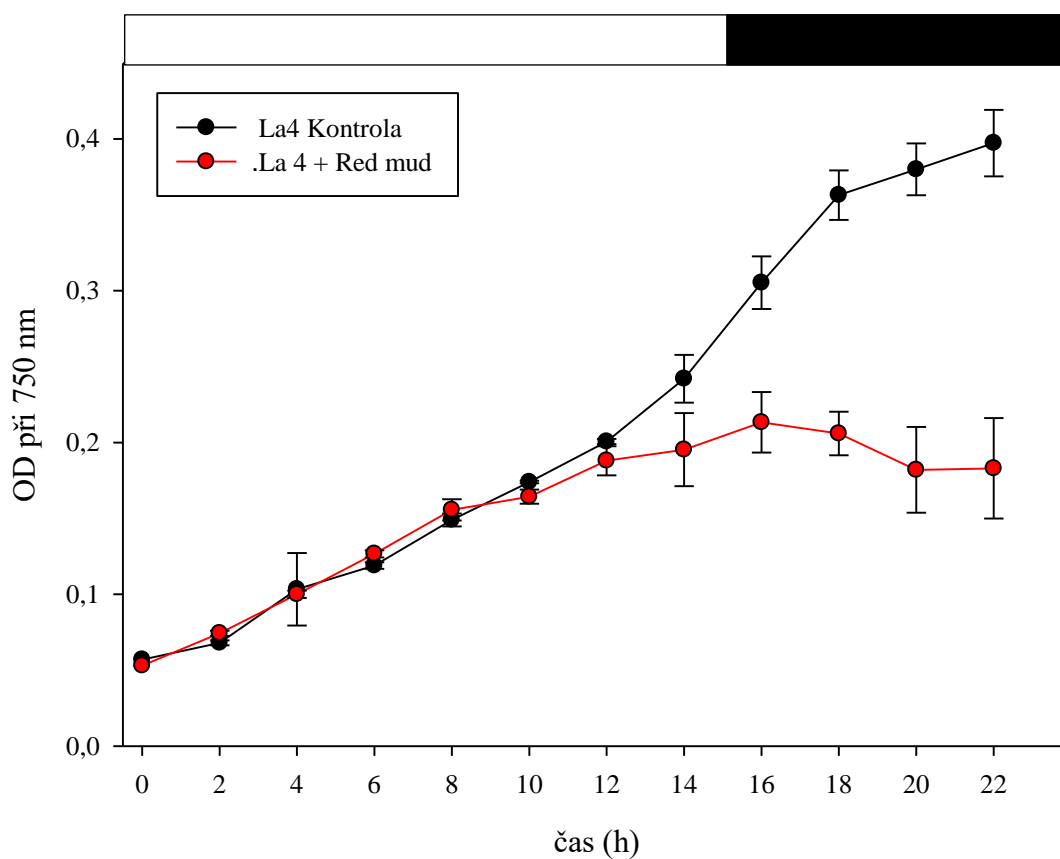
5 VÝSLEDKY

V této práci se zabýváme bioakumulací vzácných kovů z červeného kalu za pomoci vhodných mikrořasových kmenů. Představujeme zde, jak zvládá a ovlivňuje akumulace vzácných kovů mutantní kmen *La4* zelené řasy *D. quadricauda* (kap. 5.1) a červené extrémofilní řasy *G. sulphuraria* (kap 5.2). Také jsme otestovali akumulaci vzácných kovů u řasy *G. sulphuraria* pod různými trofickými režimy (kap 5.3).

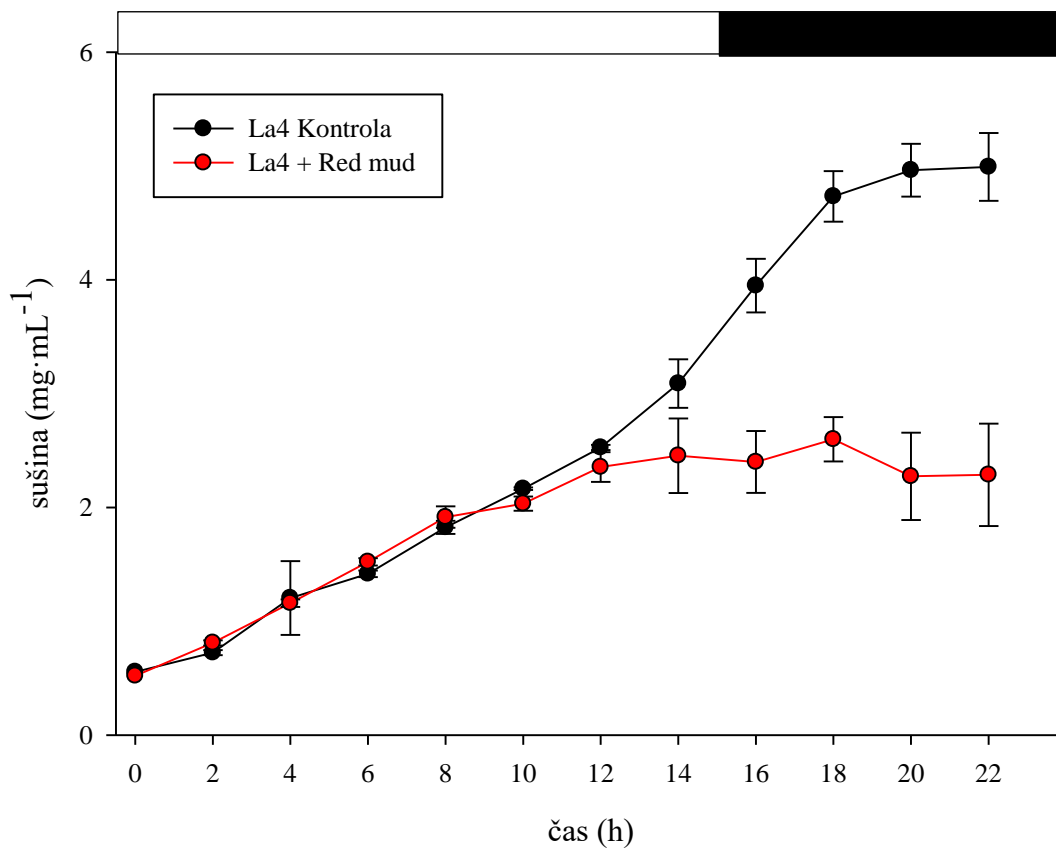
5.1 Kultivace synchronní kultury *La4* mutantu řasy *D. quadricauda* s přidavkem extraktu červeného kalu a stanovení množství naakumulovaných vzácných kovů z biomasy za pomoci ICP-MS.

Hodnoty optické density (OD) byly skoro stejné pro kontrolní i ovlivněné kultury RM na začátku pokusu tj. 0,057 pro K a 0,053 pro RM. Do 12. hodiny cyklu byl pozorován totožný růst pro obě varianty. Kontrolní kultury přibližně zdvojnásobily svou hustotu na konečnou průměrnou hodnotu 0,397, avšak ovlivněné kultury RM dosáhly nejvyšší hodnoty OD v 16. hodině cyklu (0,213) a poté se OD začalo snižovat, až na konečné průměrné OD 0,183 viz graf č. 1.

Velmi podobný trend v růstu bylo možné pozorovat stanovením sušiny, kdy rostly obě varianty velmi podobně až do 12. hodiny cyklu, a poté došlo ke strmému nárůstu sušiny u K až na 4,9 mg·mL⁻¹. U ovlivněných kultur došlo od 14. hodiny k postupnému zastavení navyšování sušiny a konečná hodnota u RM byla 2,3 mg·mL⁻¹ viz graf č. 2.

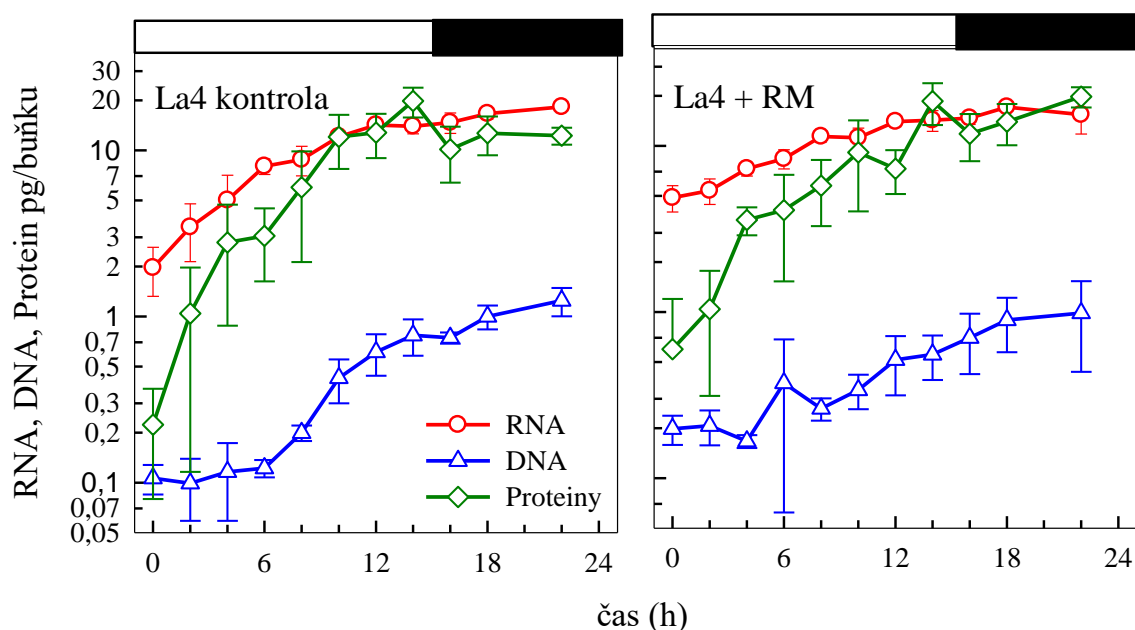


Graf č. 1: Optická densita při 750 nm pro synchronní pokus mutantního kmenu *La4* řasy *D. quadricauda*. Černou barvou je znázorněna kontrolní kultura (K), červenou barvou je znázorněna průměrná hustota ovlivněných kultur extraktem červeného kalu (RM). Obě varianty byly pěstovány v triplikátu. Hodnoty byly zprůměrovány a směrodatné odchylky byly označeny jako chybové úsečky. Temná fáze je označena černým obdélníkem v horní části grafu.



Graf č. 2: Stanovení sušiny v $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ze synchronního pokusu s mutantním kmenem *La4* řasy *D. quadricauda*. Černou barvou je znázorněna kontrolní kultura (K), červenou barvou je znázorněna průměrná hustota ovlivněných kultur extraktem červeného kalu (RM). Obě varianty byly pěstovány v triplicátu. Hodnoty byly zprůměrovány a směrodatné odchylky byly označeny jako chybové úsečky. Temná fáze je označena černým obdélníkem v horní části grafu.

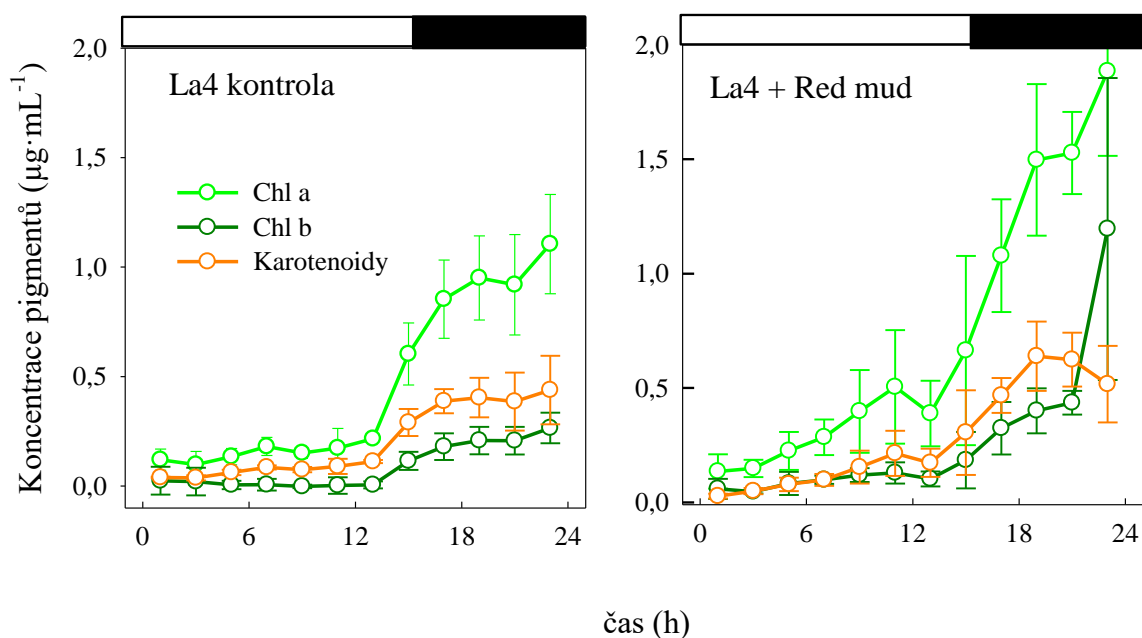
Růst synchronní kultury *La4 D. quadricauda* byl dále sledován analyzováním změn v růstových parametrech a změnách celkového obsahu RNA, DNA a proteinů (kap. 4.5). Celkový obsah RNA se u kontrol strmě navyšoval v první polovině cyklu, ve druhé navyšoval již nepatrně až na celkovou hodnotu 18,15 pg na buňku. U ovlivněných kultur RM nebylo navýšení tak strmé, ale začínalo na vyšší hodnotě 4,8 pg na buňku a konečná hodnota byla 14,27 pg na buňku. Obsah DNA se u kontrolních kultur poprvé navýšil mezi 8. až 14. hodinou a poté mírně mezi 20. a 22. hodinou. Naopak u ovlivněných kultur RM docházelo k pozvolnému navyšování DNA po celou dobu pokusu až na hodnotu 0,94 pg na buňku oproti hodnotě 1,2 pg na buňku u K. Obsah proteinů se skokově navyšoval po celou dobu světelné fáze u obou variant, avšak v temné fázi docházelo k dělení buněk a tím i ke snižování obsahu proteinu viz graf č. 3.



Graf č. 3: Syntéza RNA, DNA a proteinů v pg na buňku vůči času (h) ze synchronního pokusu s mutantním kmenem *La4* řasy *D. quadricauda*. Červeně – RNA, modře – DNA, zeleně - proteiny. Obě varianty byly pěstovány v triplikátu. Hodnoty byly zprůměrovány a směrodatné odchylky byly označeny jako chybové úsečky. Temná fáze je označena černým obdélníkem v horní části grafu.

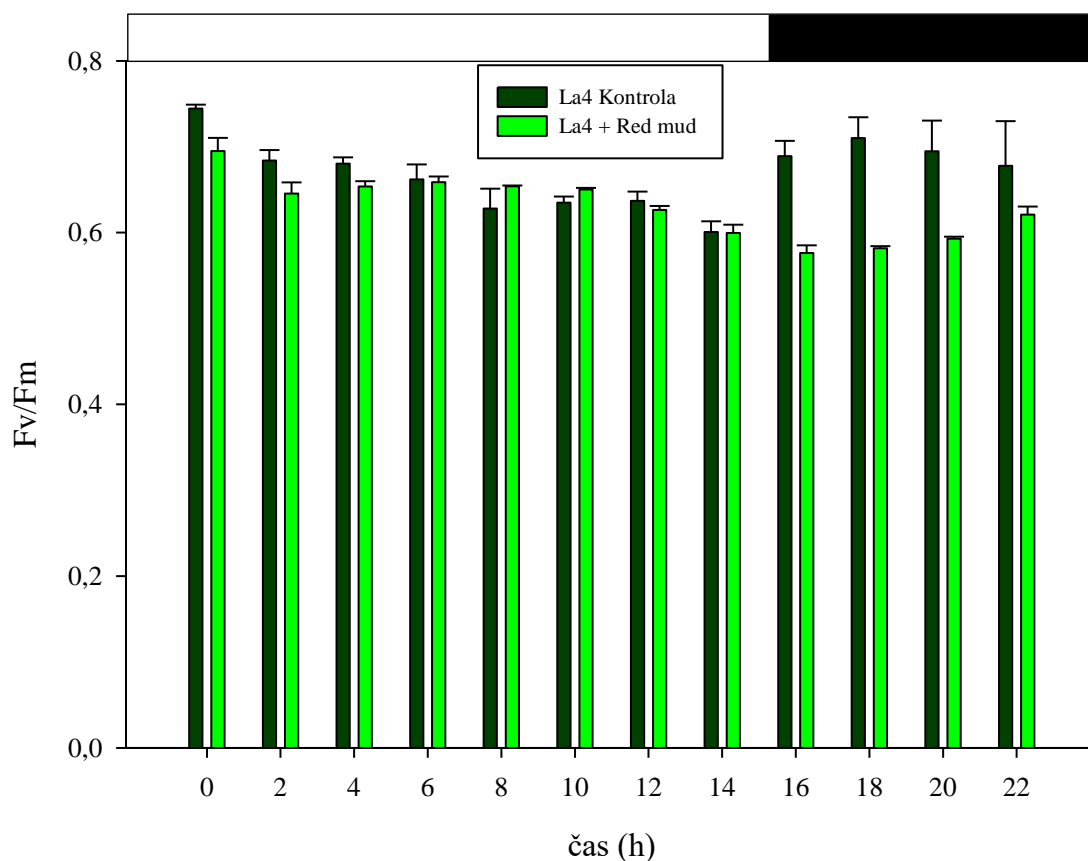
Byl pozorován velký rozdíl v nárůstu obsahu chlorofylu *a* během temné fáze u ovlivněné kultury RM, který dosáhl hodnoty u chl *a* $1,88 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ oproti $1,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ u kontrolních kultur (viz graf č. 4).

U ovlivněných kultur RM jsme také mohli pozorovat vyšší obsah chlorofylu *b* tj. ve 22.h cyklu $1,19 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ve 20. hodině $0,44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Došlo také k navýšení celkového obsahu karotenoidů u RM s nejvyšší hodnotou $0,52 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ v 18. hodině cyklu. V kontrolních kulturách bylo nejvíce karotenoidů naměřeno až ve 22. hodině cyklu o obsahu $0,44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (viz graf č. 4).



Graf č. 4: Obsah fotosyntetických pigmentů v $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ vůči času (h) ze synchronního pokusu s mutantním kmenem *La4* řasy *D. quadricauda*. Světle zeleně chlorofyl *a*, tmavě zeleně chlorofyl *b*, oranžově karotenoidy. Obě varianty byly pěstovány v triplikátu. Hodnoty byly zprůměrovány a směrodatné odchylky byly označeny jako chybové úsečky. Temná fáze je označena černým obdélníkem v horní části grafu.

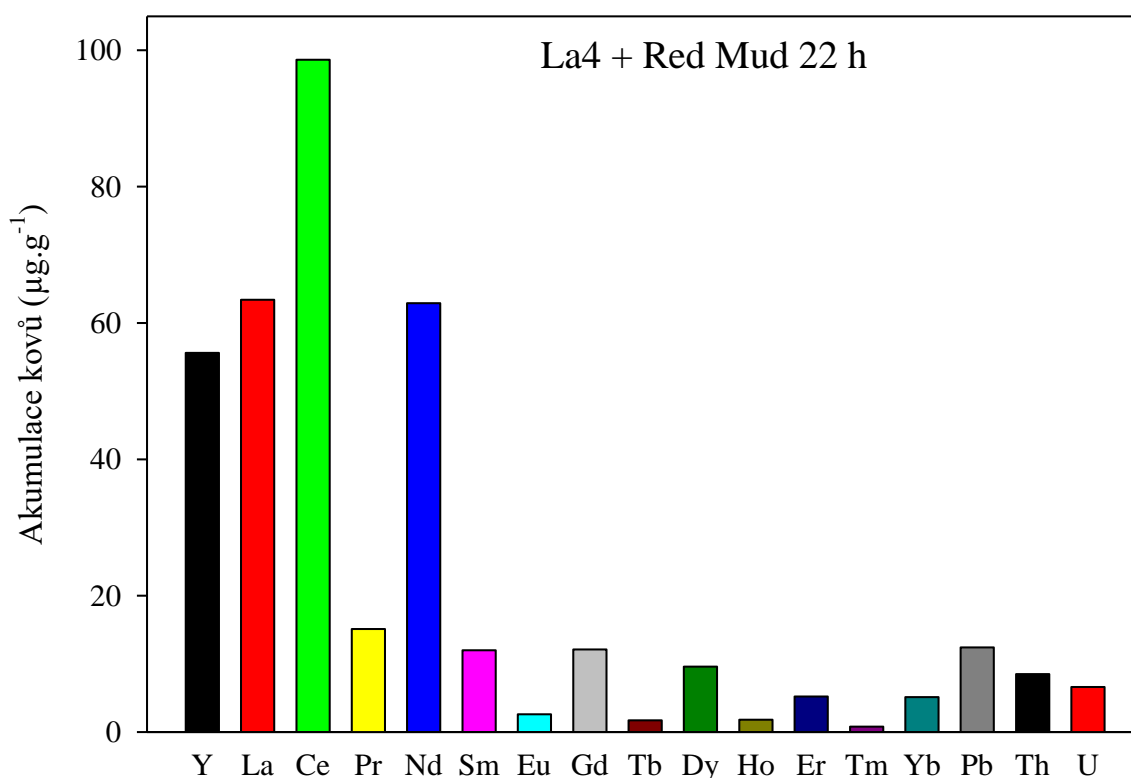
U kontrolních kultur bylo pozorováno postupné navyšování hodnot F_v/F_m až na hodnotu 0,73, která je velmi podobná startovací hodnotě 0,75. U kultur ovlivněných extraktem RM v temné fázi můžeme pozorovat propad až na hodnotu F_v/F_m 0,57 v 16. hodině cyklu. Poměr se ke konci cyklu navyšoval až na 0,63 (Graf č. 5).



Graf č. 5: Fluorescenční poměr variabilní ku maximální fluorescenci (F_v/F_m) v čase (h) pro synchronní kultury *La4 D. quadricauda*. Tmavě zelená – K (kontrola), světle zelená – RM (red mud). Obě varianty byly pěstovány v triplicátu. Hodnoty byly zprůměrovány a směrodatné odchylky byly označeny jako chybové úsečky. Temná fáze je označena černým obdélníkem v horní části grafu.

Pro stanovení obsahu vzácných kovů v řasové biomase kultivované s přidáním extraktem červeného kalu byla provedena analýza ICP-MS. Tato data byla zpracována do grafu č.6.

Majoritními sledovanými prvky v extraktu byly V a Mn ($110,1$; $164,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Celkový obsah námi kontrolovaných vzácných kovů byl $374,1 \mu\text{g}$ na g řasové biomasy. Nejvíce zastoupené byly v tomto obsahu prvky Ce, La, a Nd ($98,6$; $63,4$ a $62,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

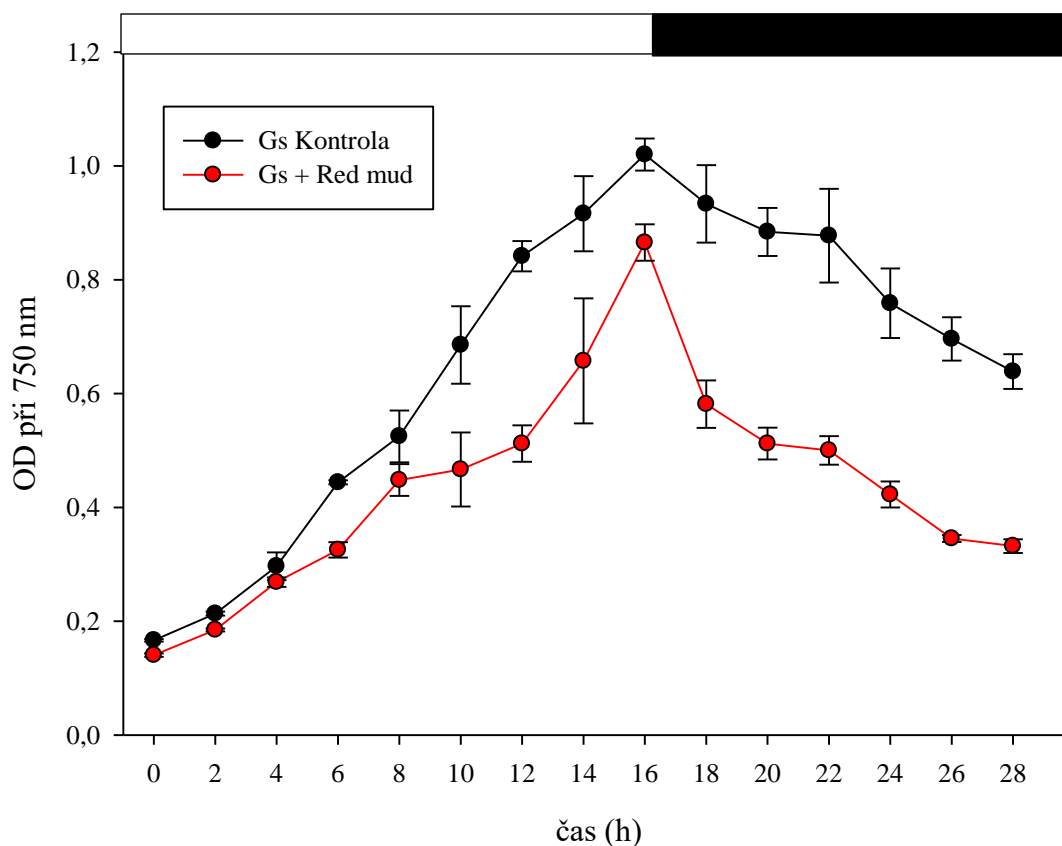


Graf č. 6: Sloupcový graf akumulace kovů v μg na g řasové biomasy *La4 D. quadricauda*. Vzorke byly analyzovány ICP-MS po smíchání triplikátu kultur. Jednotlivé kovy jsou seřazeny popořadě v barevných sloupcích.

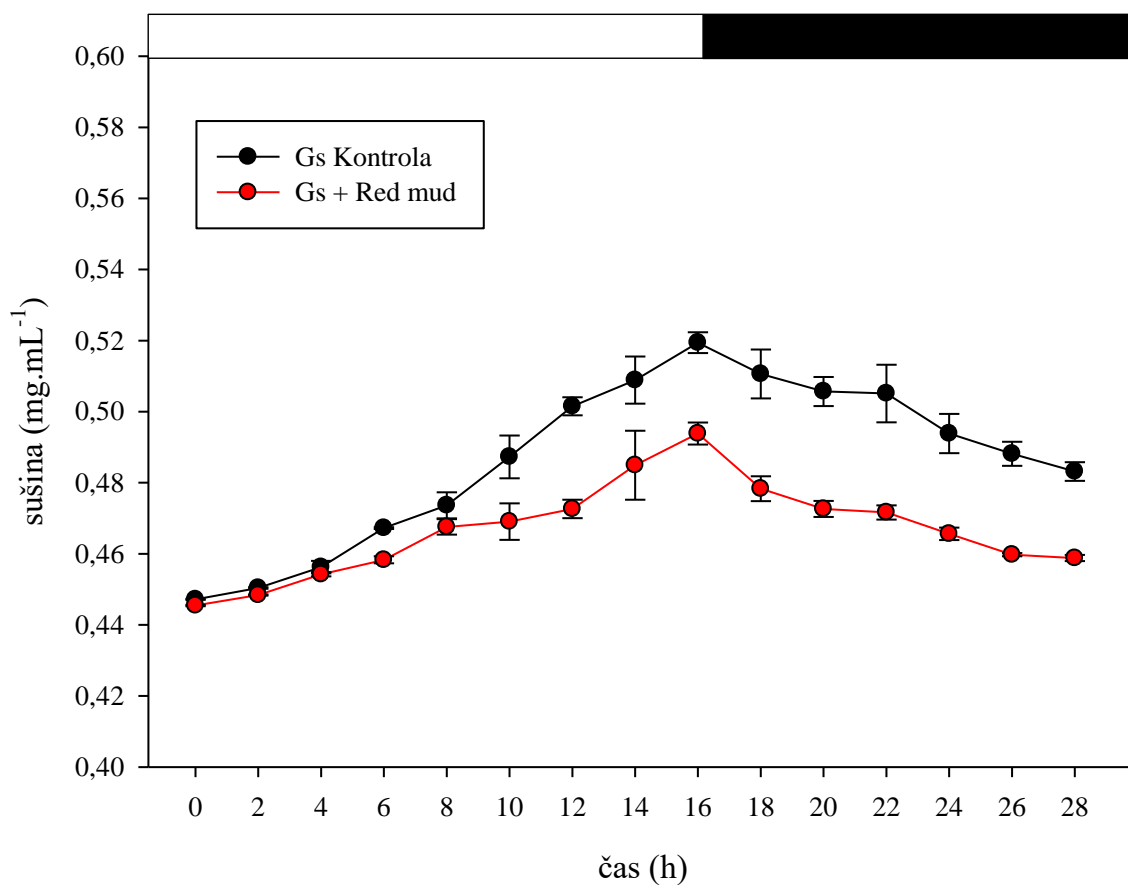
5.2 Kultivace synchronní kultury extrémofilní řasy *G. sulphuraria* s přidavkem extraktu červeného kalu a stanovení množství naakumulovaných vzácných kovů z biomasy za pomoci ICP-MS.

Startovací hodnoty optické density (OD) byly velmi podobné a to 0,161 pro kontrolní kulturu (K) a 0,143 pro ovlivněnou kulturu červeným kalem (RM). U kontrolních kultur dochází ke strmému nárůstu OD až do 16. hodiny cyklu na průměrnou hodnotu 1,06. Ovlivněné kultury RM byly v nárůstu pomalejší s nejvyšším bodem v 16. hodině při OD rovné 0,86. Během temné fáze došlo k snížení OD u K na 0,64 a k většímu propadu u RM na 0,32 viz graf č. 7.

Podobná snižující se tendence během temné fáze byla pozorován i u stanovení sušin. Z nejvyššího objemu sušiny v 16. hodině (0,52 pro K a 0,49 mg·mL⁻¹ pro RM) se hodnota sušiny propadla až na konečný objem 0,48 pro K a 0,46 mg·mL⁻¹ pro RM viz graf č. 8.

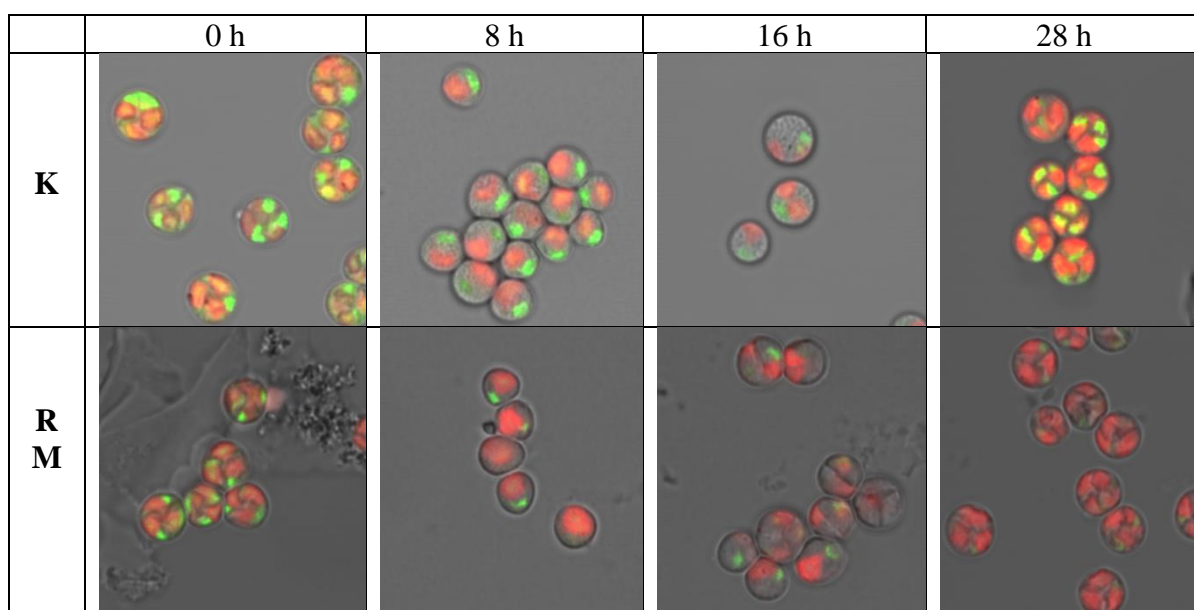


Graf č. 7: Optická densita při 750 nm pro synchronní pokus s *G. sulphuraria* a extraktem červeného kalu. Černou barvou je znázorněná kontrolní kultura (K), červenou barvou je znázorněná průměrná hustota ovlivněných kultur extraktem červeného kalu (RM). Obě varianty byly pěstovány v triplicátu. Hodnoty byly zprůměrovány a směrodatné odchylky byly označeny jako chybové úsečky. Temná fáze je označena černým obdélníkem v horní části grafu.



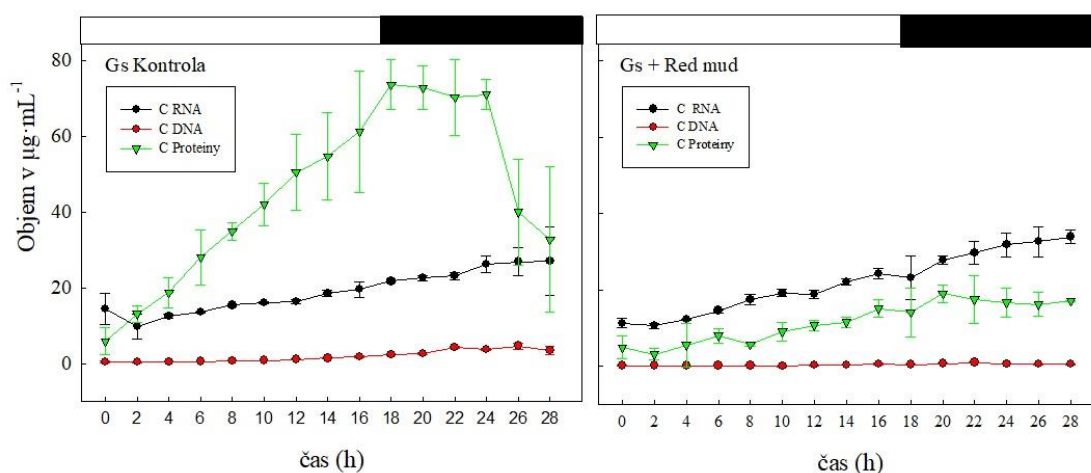
Graf č. 8: Stanovení sušiny v $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pro synchronní pokus s *G. sulphuraria* a extraktem červeného kalu. Černou barvou je znázorněná kontrolní kultura (K), červenou barvou je znázorněná průměrná sušina ovlivněných kultur extraktem červeného kalu (RM). Obě varianty byly pěstovány v triplikátu. Hodnoty byly zprůměrovány a směrodatné odchylky byly označeny jako chybové úsečky. Temná fáze je označena černým obdélníkem v horní části grafu.

Synchronnost buněk byla pozorována konfokálním mikroskopem. Na začátku cyklu řasy *G. sulphuraria* (obr. č. 8) se jednobuněčné dceřiné buňky držely v mateřské stěně u obou variant, avšak během 2. h cyklu mateřskou stěnu opustily. V 8. h cyklu byl pozorován začátek dělení chloroplastů a jader, které do 12. h cyklu bylo dokončeno. V 16. h cyklu docházelo k přípravě druhého dělení chloroplastů a jader. Ve 20. h cyklu bylo pozorováno 2. dělení u K, které bylo dokončeno do 24. h cyklu, avšak ovlivněné kontroly byly rozděleny až ve 28. h cyklu, kdy došlo k ukončení experimentu.



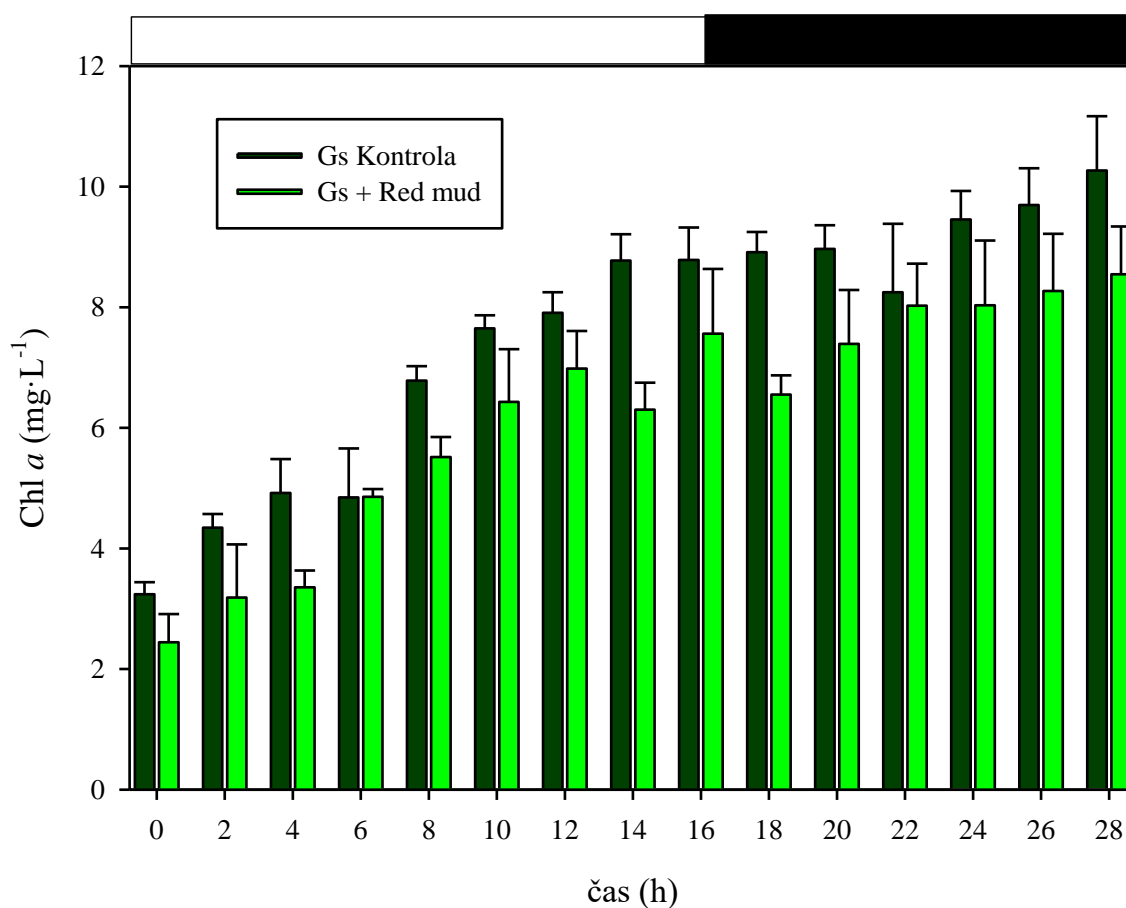
Obrázek č. 8: Fluorescenční fotografie synchronních kultur řasy *G. sulphuraria* během cyklu. Horní řada zobrazuje kontrolní kultury – K. Spodní řada zobrazuje ovlivněné kultury extraktem červeného kalu – RM. U ovlivněných kultur je patrný přídavek extraktu červeného kalu v okolí buněk. Jádra (zelená) byla obarvena SYBR Green I, chloroplasty (červeně) – autofluorescence chlorofylu.

Růst synchronní kultury *G. sulphuraria* byl dále posouzen podle změn v růstových parametrech a celkového obsahu RNA, DNA a proteinů (dle kap. 4.5) Celkový obsah RNA se u kontrol postupně zvyšoval v po celou dobu cyklu až na celkový obsah $27,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. U ovlivněných kultur RM bylo navyšování stupňovité ve 12. a 18. hodině cyklu s konečným obsahem $33,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Obsah DNA se u kontrolních kultur se postupně navýšil až na celkový obsah $4,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Nejvyšší obsah u ovlivněných kultur RM byl pozorován ve 22. hodině cyklu ($0,95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a poté se snižoval až ke konečnému obsahu DNA $0,51 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Obsah proteinů se u kontrolních kultur strmě navyšoval po celou dobu světelné fáze a poté do 24. hodiny stagnoval ($73,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), následně došlo k velkému propadu ($32,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), za který nejspíše mohlo prodloužení temné fáze. Hodnoty u kultur ovlivněných kyselým extraktem dosahovaly nejvýše $19 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, což je velice nízká hodnota a značí, že tato analýza není prokazatelná pro tuto variantu s řasou *G. sulphuraria* viz graf č. 9.



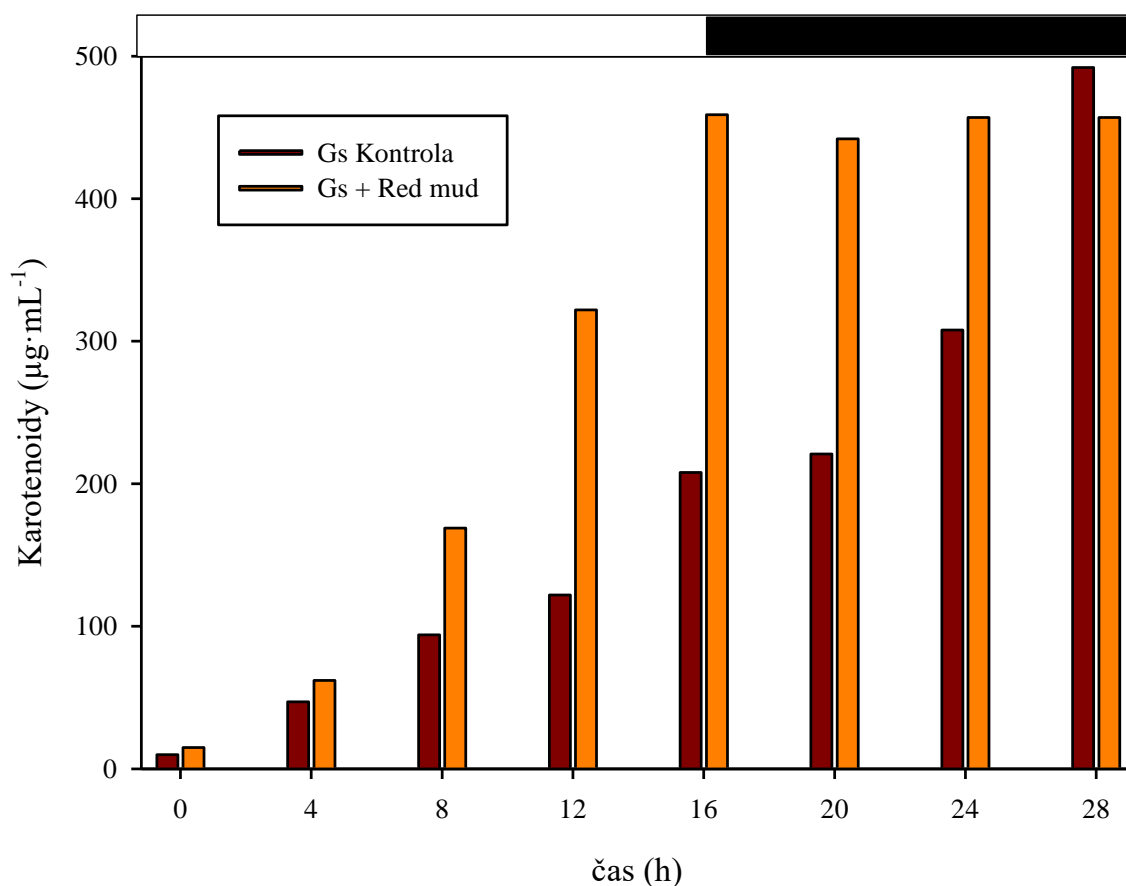
Graf č. 9: Syntéza RNA, DNA a proteinů v $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ vůči času (h) ze synchronního pokusu s červenou řasou *G. sulphuraria* a extraktem červeného kalu. Černě – RNA, červeně – DNA, zeleně – proteiny. Obě varianty byly pěstovány v triplikátu. Hodnoty byly zprůměrovány a směrodatné odchylky byly označeny jako chybové úsečky. Temná fáze je označena černým obdélníkem v horní části grafu.

Obsah chlorofylu *a* se u kontrolních kultur vlnovitě navyšoval s menší stagnací mezi 18. až 22. hodinou, kdy se chl *a* v kontrolách začal navyšovat až do ukončení pokusu na finální průměrný obsah chl *a* u K roven 10,2 mg·L⁻¹. Nárůst chl *a* u ovlivněných kultur RM byl celkově nižší než u K a na grafu č. X jsou viditelné dva propady obsahu ve 14. a 18. hodině cyklu. Celkový finální průměrný obsah chl *a* byl u RM roven 8,5 mg·L⁻¹ (viz graf č. 10)



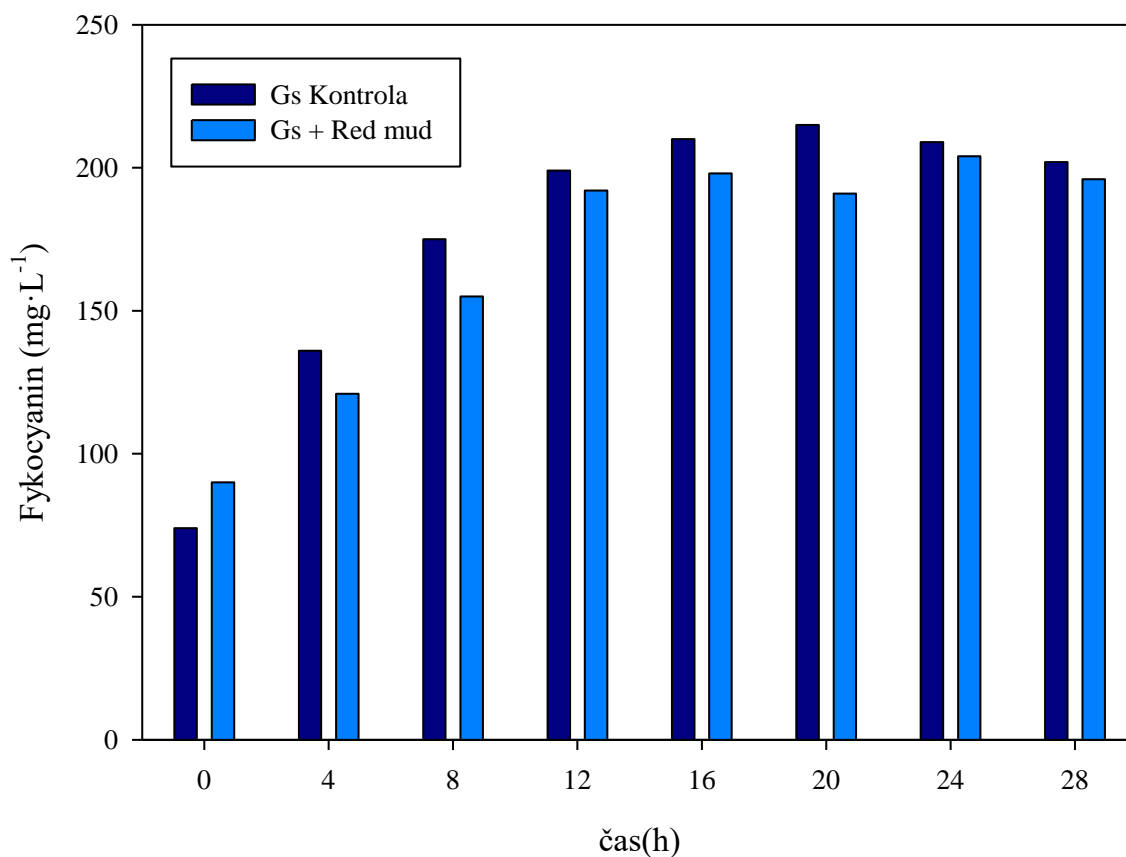
Graf č. 10: Celkový obsah chlorofylu *a* v synchronních řasových kulturách *G. sulphuraria* v mg·L⁻¹ vůči časové ose. Světle zeleně chlorofyl *a* u kontrolních kultur, tmavě zeleně chlorofyl *a* u ovlivněných kultur extraktem červeného kalu. Obě varianty byly pěstovány v triplikátu. Hodnoty byly zprůměrovány a směrodatné odchylky byly označeny jako chybové úsečky. Temná fáze je označena černým obdélníkem v horní části grafu.

Ovlivněné kultury RM měly více než dvojnásobně vyšší obsah karotenoidů až do 22. h cyklu, kdy se jejich obsah začal rychle navyšovat i u kontrolních kultur. Obsah karotenoidů u RM kultur stagnoval od 16. hodiny cyklu s průměrným finálním obsahem $456 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Kontrolní kultury navýšily svůj obsah z $307 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (24. h) na finální obsah ve 28. h rovný $491 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ viz graf. č. 11.



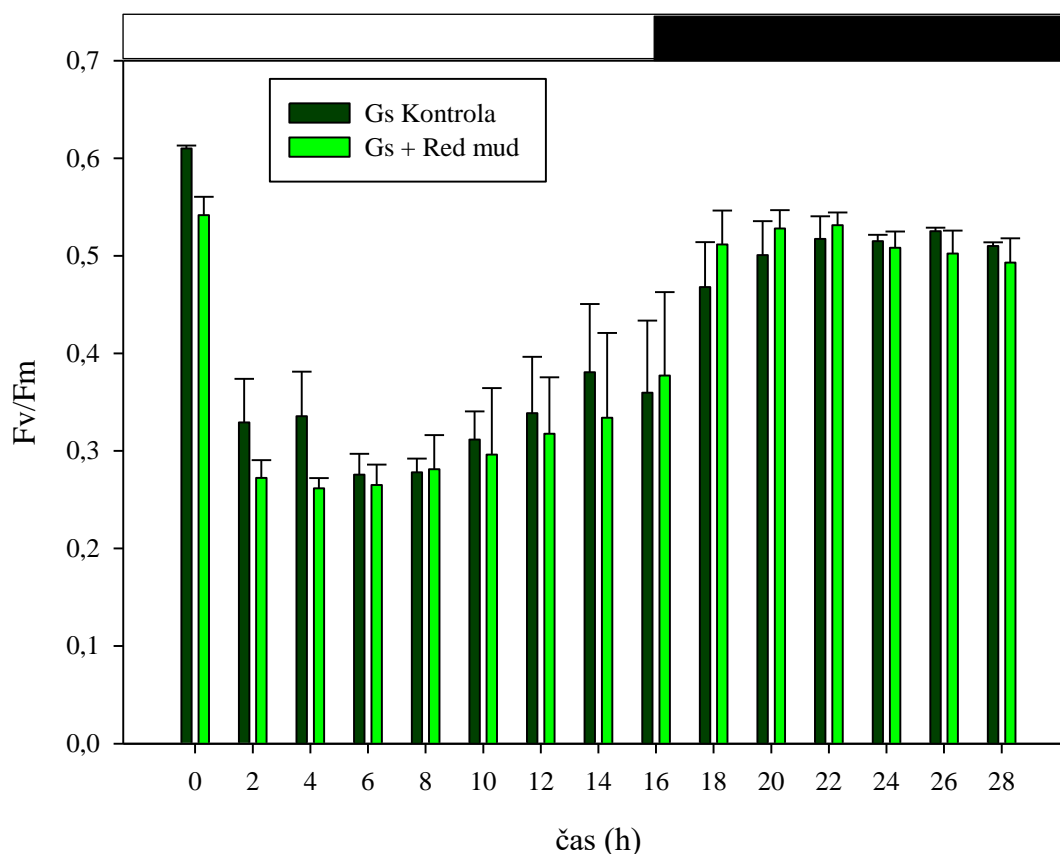
Graf č. 11: Celkový obsah karotenoidů v synchronních kulturách *G. sulphuraria* v $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ vůči časové ose. Vínová barva značí kontrolní kultury, oranžově jsou značeny ovlivněné kultury extraktem červeného kalu. Temná fáze je označena černým obdélníkem v horní části grafu.

Obsah fykocyaninu se u řasy *G. sulphuraria* úměrně navyšoval u obou variant, i když ovlivněné kultury byly pomalejší v syntéze během světelné fáze. V temné fázi cyklu již nedošlo k výraznějšímu navýšení a nejvyššího obsahu u K bylo dosaženo ve 20. h cyklu ($215 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). U RM bylo nejvyššího obsahu dosaženo ve 24. h cyklu ($204 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) viz graf č.12.



Graf č. 12: Celkový obsah fykocyaninu v synchronních kulturách *G. sulphuraria* v $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ vůči časové ose. Tmavě modrá – kontrolní kultury, světle modrá – ovlivněné kultury extraktem červeného kalu. Temná fáze je označena černým obdélníkem v horní části grafu.

U kontrolních kultur byla pozorována vyšší aktivita ve světelné fázi, nicméně v temné fázi ji RM kultury převýšily a ke konci pokusu dorovnaly. Nejnižší hodnoty Fv/Fm byly zaznamenány v 6. h cyklu a to 0,27 pro K a 0,26 pro RM. Nejvyšší hodnoty Fv/Fm pro obě varianty nepřesáhly počáteční hodnoty, 0,61 pro K a 0,53 pro RM viz graf č. 13.

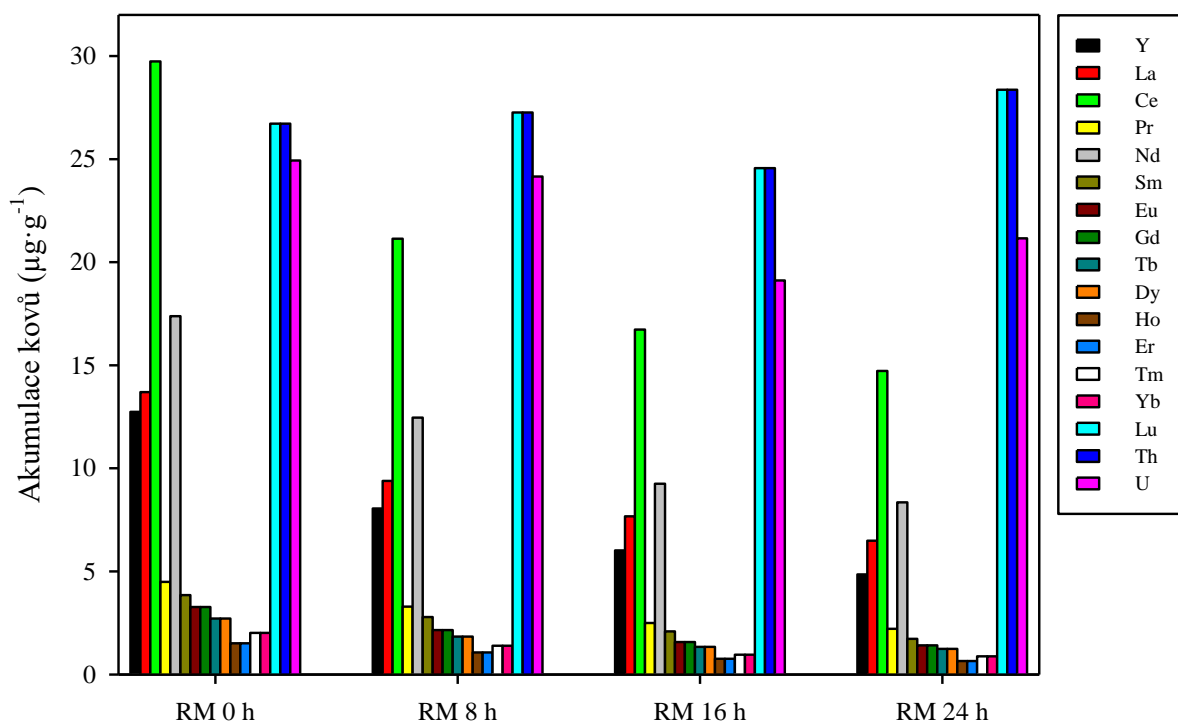


Graf č. 13: Fluorescenční poměr variabilní ku maximální fluorescenci (Fv/Fm) v čase (h) pro synchronní kultury řasy *G. sulphuraria*. Tmavě zelená – K, světle zelená – RM. Obě varianty byly pěstovány a měřeny v triplikátu. Hodnoty byly zprůměrovány a směrodatné odchylky byly označeny jako chybové úsečky. Temná fáze je označena černým obdélníkem v horní části grafu.

Z předchozího experimentu s *La4 D. quadricauda* bylo navrženo sledovat akumulaci vzácných kovů v průběhu cyklu. Pro pokus s červenou řasou *G. sulphuraria* byly tedy navrženy pro studium akumulace kovů odběry po 8 hodinách cyklu. Přijátá data byla zpracována do grafu č. 14.

Nejvíce akumulovanými pro řasu prospěšnými kovy byly Ce a Nd. Nejvyšší hodnoty akumulace Ce a Nd byly zaznamenány na začátku cyklu a to 29,7 a 17,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DM.

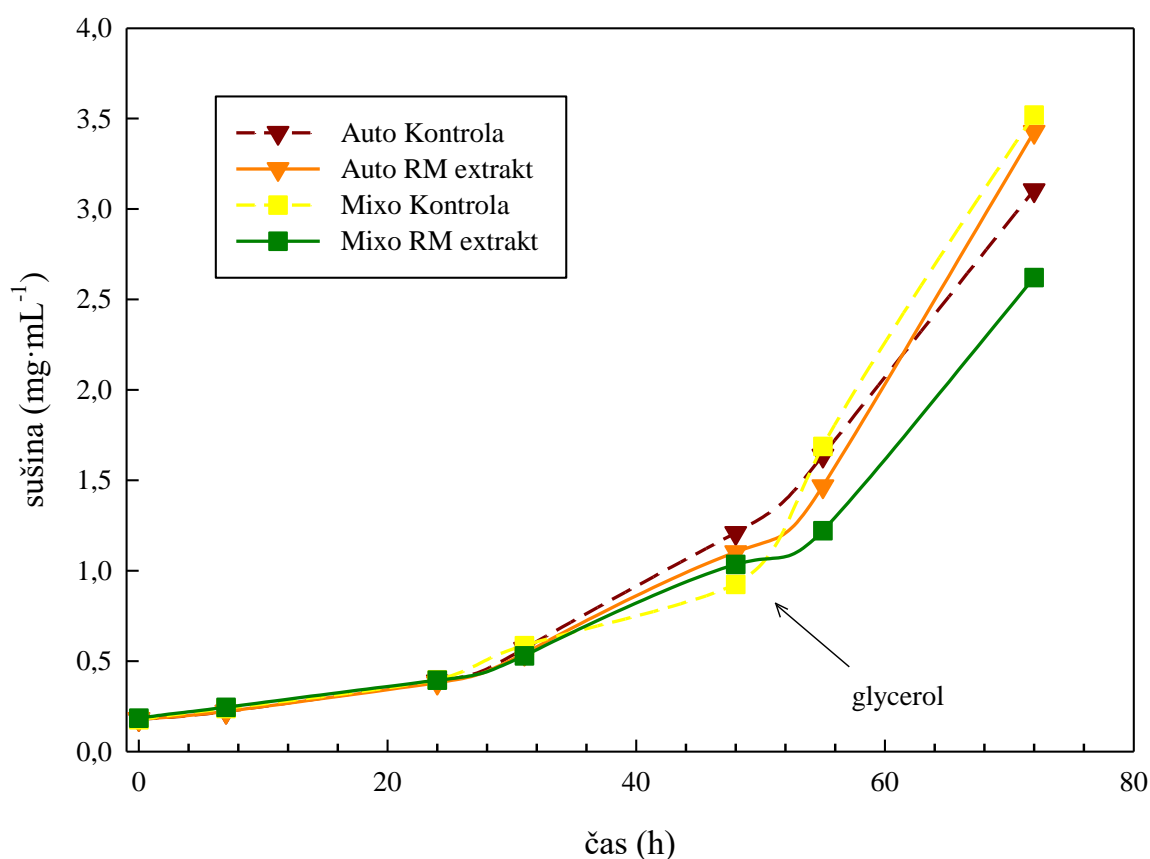
Zajímavým jevem byla u řasy *G. sulphuraria* vysoká akumulace Lu, Th a U. Nejvyšší hodnoty Lu, Th a U byly zaznamenány ve 24. hodině cyklu a to 28,3; 28,4 a 21,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DM.



Graf č. 14: Sloupcový graf akumulace kovů v μg na g řasové biomasy *G. sulphuraria*. Vzorby byly odebírány smícháním triplikátu kultur každých 8 h v průběhu experimentu. Jednotlivé kovy jsou seřazeny popořadě v různých barvách podle legendy.

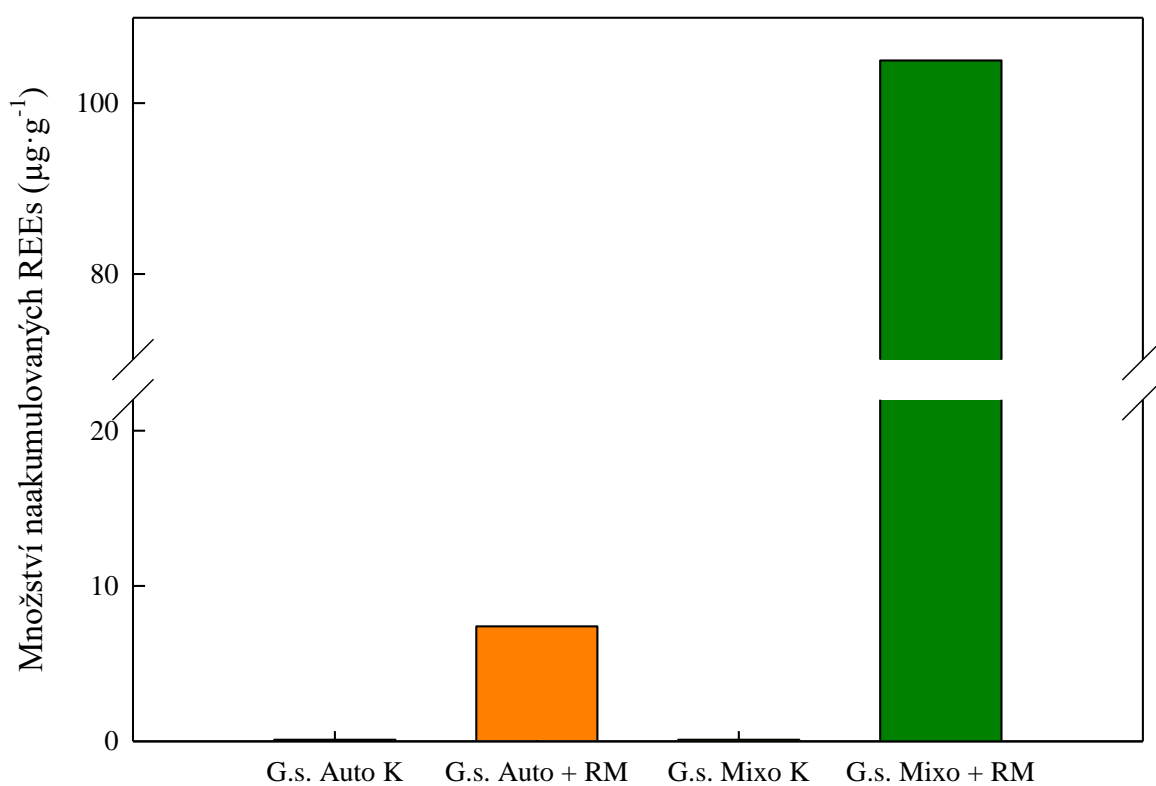
5.3 Kultivace nesynchronní kultury řasy *G. sulphuraria* v různých trofických režimech s extraktem červeného kalu.

Kultury byly nasazeny na hodnotu sušiny $0,18 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a po dobu 48 h rostly identicky. Posledních 24 h rostla nejlépe mixotrofní kontrola s výslednou sušinou $3,52 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, autotrofní kontrola dosáhla výsledné sušiny $3,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Autotrofní kultura ovlivněná extraktem červeného kalu (RM) rostla lépe ($3,42 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) než ovlivněná mixotrofní kultura s výslednou hodnotou sušiny $2,62 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ viz graf č. 15.



Graf č. 15: Stanovení sušiny v $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ z nesynchronních auto- a mixotrofních kultur řasy *G. sulphuraria*. Vínová – autotrofní K, oranžová – autotrofní s RM, žlutá – mixotrofní K, zelená – mixotrofní s RM. Obě varianty byly pěstovány v triplikátu. Po 48 h byl přidán 1 % glycerol k mixotrofním kulturám.

Při analýze dat z ICP-MS byl kladen, na základě předchozích poznatků, vyšší důraz na akumulaci lanthanoidů (REEs). Celkové množství naakumulovaných REEs v auto- i mixotrofních kontrolách bylo nižší než 0,1 μg na g řasové biomasy (DM). Autotrofní kultura ovlivněná extraktem RM naakumulovala nejvíce yttria a ceru, a to v obsahu 5,4 a 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DM. Naopak mixotrofní kultura i přes nejnižší růst naakumulovala 94,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DM yttria a 9,8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DM europia. V grafu č. 16 není započítán obsah naakumulovaného Th a U, který byl pro autotrofní kulturu 8,0 a 1,4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DM a pro mixotrofní kulturu 10,1 a 2,4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DM.



Graf č. 16: Sloupcový graf akumulace REEs v μg na g z auto- a mixotrofní řasové biomasy *G. sulphuraria*. Auto K – autotrofní kontrola, Auto + RM – autotrofní kultura ovlivněná extraktem červeného kalu, Mixo K – mixotrofní kontrola, Mixo + RM – mixotrofní kultura ovlivněná extraktem červeného kalu.

6 DISKUZE

Globální úložiště červeného kalu okupují rozsáhlá území, což vede, kvůli toxicitě a zásaditému pH kalu, k poškozování životního prostředí (Zinoveev et al., 2021). Tento odpad se přitom jeví jako téměř nevyčerpatelný zdroj kovů, např. železa, nebo mikroprvků, které jsou v případě řas potřebné pro jejich růst (Laguna et al., 2011). V neposlední řadě by mohl sloužit jako cenný zdroj lanthanoidů a jiných kritických kovů. Zejména v případě lanthanoidů (cca $170 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ kalu) se zdá být vhodnější hovořit o opětovné těžbě než o recyklaci (Čížková et al., 2019a).

Mnoho studií se zabývalo biologickým loužením různých rud a průmyslových odpadů (Brisson et al., 2016; Dev et al., 2020; Faramarzi et al., 2020), pouze několik z nich však zahrnuje bioloužení červeného kalu, zejména pro extrakci REEs (Qu et al., 2019a; Qu & Lian, 2013). Zkoumány byly plísňové kmeny jako *Penicillium tricolor* (Qu, et al., 2019a) a *Aspergillus niger* (Pedram et al., 2020; Qu et al., 2019b) a mikrořasy (Čížková et al., 2019a) jako *Desmodesmus quadricauda*, *Chlamydomonas reinhardtii* a *Parachlorella kessleri*. Hlavními nevýhodami použití hub a mikrořas oproti bakteriím je tvorba velkého množství biomasy a spór, které prodražují proces a způsobují sekundární znečištění (Qu et al. 2019b). Náročná je také separace částic RM z biomasy hub (Qu et al., 2015).

Předchozí studie prokázaly, že surový rozpuštěný kal v řasových kulturách způsobuje limitaci světla již při koncentraci $0,05 \text{ g}$ kalu na litr média (Náhlík, 2018), a proto byl připraven kyselý extrakt červeného kalu. Analýza ICP-MS ukázala, že nejvhodnější pro rozpouštění kalu byla 10% HNO_3 . Takto koncentrovaná kyselina nejvíce louhuje námi požadované vzácné kovy a tím i navyšuje jejich bio-dostupnost. Díky přefiltrování byl extrakt RM bezbarvý a nezpůsobil tak limitaci světla. Kultivace řas probíhala s přidavkem extraktu o koncentraci $0,25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, což je pětikrát více než uvádí Náhlík, (2018). Kyselý výluh snižoval pH po přidání do médií (1/2 ŠS a Galdieria) na hodnotu kolem 1,8. Pro zvýšení pH byl použit amoniak, jenž způsobil lehké zakalení kultur, které však neovlivnilo dopadající intenzitu světla.

Vhodným modelovým organismem pro základní i aplikovaný výzkum se jeví některé jednobuněčné zelené řasy, protože jsou velmi dobře prozkoumány v oblasti regulace buněčného cyklu, fyziologie, molekulární biologie či fotosyntézy a biotechnologických aplikací (Schroda et al., 2015; Umen, 2018; Milada Vitova et al., 2015; Zachleder et al., 2016). Řasa *Desmodesmus quadricauda* byla vybrána, jako nejlepší akumulátor REEs v Čížková et al., (2019a). Na základě těchto zkušeností byl pro první experiment použit

La4 mutant řasy *D. quadricauda*. Tento mutant vznikl indukovanou mutagenezí a následnou selekcí na vysokých dávkách lanthanoidů. Mohl by být dále užitečný v projektech pro recyklaci vzácných kovů in situ ze znečištěných odpadních vod, průmyslových odpadů, nebo jako bioremediační prostředek pro vychytávání anorganického a organického znečištění z vod (Das et al., 2013; Kim et al., 2007; Palmieri et al., 2000; Salama et al., 2019).

Kontrolní kultura mutantního kmene *La4 D. quadricauda* přibližně zpětinásobila svůj růst během svého buněčného cyklu (Graf č. 2), což vypovídá o vyšší růstové rychlosti než u divokého typu *D. quadricauda* (2,7x), který byl pěstován za stejných podmínek v práci Čížková et al., (2019a). Ovlivněná kultura RM ztrojnásobila svůj objem, ale její OD i sušina začali klesat během temné fáze cyklu (Graf č. 1 a 2). U řas mohou být významné části denní fotosyntetické produktivity ztraceny v noci, kdy probíhá dýchání (Edmundson & Huesemann, 2015). Noční úbytek biomasy zůstává zanedbávaným aspektem optimalizace produktivity řas při kultivaci (Hu et al., 1998).

Velký důraz byl také kladen na analýzy fotosyntetických pigmentů, protože jejich syntézu a funkci mohou některé vzácné kovy ovlivnit. Byl pozorován velký nárůst všech fotosyntetických pigmentů u ovlivněných kultur RM (Graf č. 4). Navýšení celkového množství chlorofylu v biomase *D. quadricauda* za přítomnosti solí REEs byl popsán Řezankou et al., (2016a). Relativní konstantní poměr chlorofylu a/b lze podstatně změnit podmínkami prostředí (Gevaert & Rees, 2015), jako je intenzita světla, spektrální složení (kvalita) světla (Melis, 1991) nebo přítomnost těžkých kovů (Maina & Wang, 2015; Rocchetta et al., 2012).

Vliv RM na účinnost fotosyntézy byl posuzován stanovením poměru Fv/Fm. Zatímco u kontrolních kultur bylo pozorováno postupné zrelaxování RC, stres způsobený extraktem RM zapříčinil postupné poškození RC, jak je patrné z dosažení nejnižší hodnoty Fv/Fm 0,57 v 16. hodině cyklu, kdy začala temná fáze cyklu (Graf č. 5). Podobnou inhibici popsal Ouyang et al., (2012) u *C. vulgaris*, která podobně reagovala na vysoké koncentrace Cr a Cd. K částečnému zrelaxování RC u *C. vulgaris* došlo až po 96 h. V reakci na zvýšení koncentrace chrómu byly pozorovány významné změny maximální fotochemické účinnosti poměru PSII (Fv/Fm) i u řasy *Ulva lactuca* (Ůnal et al., 2010).

Analýza ICP-MS potvrdila vysoké hodnoty naakumulovaných vzácných kovů v biomase. Kyselý extrakt červeného kalu navýšil bio-dostupnost prvků více než vodný roztok surového červeného kalu, který byl použit v Čížková et al., (2019a). Mutantní kmen *La4* řasy

D. quadricauda s vyšší schopností akumulace REEs ve spojení s kyselým extraktem RM naakumuloval 3krát více Ce a 4x více La a Nd, než uvádí Čížková et al., (2019a) (Graf č. 6).

Jako další modelový organismus pro kultivaci s kyselým extraktem červeného kalu byla vybrána extrémofilní červená řasa *G. sulphuraria*. Tuto řasu se podařilo zesynchronizovat teprve nedávno (Jong et al., 2021; Náhlík et al., 2021). U kontrolních kultur bylo dělení na 4 dceřiné buňky dokončeno během 24 hodin v celé populaci podobně jako v práci Náhlík et al., (2021). U ovlivněných kultur RM byl cyklus dělení pomalejší a buněčný cyklus byl dokončen po 28 hodinách. U ovlivněných kultur bylo také pozorováno dělení na 8 dceřiných buněk ($\leq 1\%$ v populaci), jak bylo popsáno v práci Jong et al., (2021). Nárůst sušiny byl velmi podobný, jako zmiňuje Čížková et al., (2021).

Analýzou nukleových kyselin podle Wank, (1962) s modifikací od Lukavský et al., (1973) bylo možné stanovit obsah nukleových kyselin u K i RM podobně jako v Náhlík et al., (2021) (Graf č. 9). Proteinová analýza podle postupu popsaného Lowry et al., (1951) u ovlivněných kultur RM nebyla funkční. Možným důvodem je nízké pH *Galdieria* média (Řezanka et al., 2016b), nebo interference některého z kovů obsažených v červeném kalu. Nicméně stanovení proteinů nebylo možné ani dle Bradford, (1976) nebo BCA metodou dle He, (2011), tudíž metodika pro stanovení proteinů řasy *G. sulphuraria* s přidavkem extraktu červeného kalu není zatím vypracována.

Stejný důraz na analýzy fotosyntetických pigmentů jako u *La4 D. quadricauda* byl kladen i u extrémofilní červené řasy *G. sulphuraria*, i přesto, že červené řasy mají jiné složení pigmentů. Obsah chlorofylu *a* byl u ovlivněných kultur RM nižší než u kontrolních kultur, ale obsah karotenoidů byl mnohem vyšší u RM, než u K (Graf č. 10 a 11). Takové mnohonásobné navýšení obsahu karotenoidů, ale i chlorofylu *a* je popsáno také v Čížková et al. (2021), ale v případě naší práce nedošlo k navýšení chlorofylu *a*, který je u ovlivněných kultur RM zde nižší než u K. Obsah fykocyaninu (Graf č. 12) je nižší u ovlivněných kultur, ale jeho nízký obsah můžeme pozorovat i u K, tudíž není možné tuto metodiku použít pro biotechnologické získávání této látky (Wan et al., 2016). Obsah fykocyaninu je možné navýšit např. změnou trofického režimu za přidání cukrů (Sloth et al., 2006; Wan et al., 2016).

Celkový propad v poměru Fv/Fm, následovaný jeho zpětným navýšením až na hodnoty $\geq 0,5$, ukazuje na částečné zrelaxování RC II (Graf č. 13). Při nízkém pH a zdrojem dusíku z amoniaku a dusičnanů, byly podobné hodnoty Fv/Fm mezi 0,5 – 0,6

naměřeny u *G. maxima* (Iovinella et al., 2020). Podle Ley & Butler, (1977) a Butler, (1978) je světlo absorbované fykobilisomy sbíráno téměř výhradně do malých jednotek RC II, zatímco 95 % světla absorbuje chlorofyl *a* je distribuováno do velkých jednotek RC I. Světlo vlnových délek absorbovatelných chlorofylem *a*, tedy umožňuje pouze nepatrnou produkci kyslíku. V řase *Ulva sp.*, jak naznačuje Franklin et al., (1992), je rychlý pokles Fv/Fm způsobený zvýšením Fo, které je citlivé na chloramfenikol, a může reflektovat poškození RC II.

Závislost akumulace vzácných kovů na fázích buněčného cyklu se nepotvrdila. Zajímavý byl trend snižování akumulace kovů v časovém rozmezí cyklu (Graf č. 14). Také řasa *G. sulphuraria* překvapivě naakumulovala až o třetinu méně kovů než *La4 D. quadricauda*. Zajímavým jevem byla u řasy *G. sulphuraria* vysoká akumulace Lu, Th a U, tyto prvky dosahovaly ve výsledku vyšších hodnot než nejvíce akumulované lanthanoidy, tj. Ce a La. Obsah naakumulovaných vzácných kovů v sušině je podobný jako u řasy *D. quadricauda* v Čížková et al., (2019a). Dostupnost skupin vázajících kovy v řasách vždy závisí na pH média. Tyto skupiny mohou udržovat záporně nabitý povrch za kyselých podmínek. Nicméně extrémně nízké pH (< 2) biosorpci kovů mikrořasami snižuje. Vysoké koncentrace H⁺ iontů snižují biosorpci kovů tím, že jim brání ve vazbě na ligandy na buněčném povrchu (Volesky, 2007; Zeraatkar et al., 2016).

Protože předešlé výsledky neprokázaly závislost akumulace vzácných kovů na buněčném cyklu, nebylo zapotřebí udržovat pro další pokus synchronní kulturu. Řasu *G. sulphuraria* je možné kultivovat za mixotrofního režimu s přidáním glycerolu (Náhlík et al., 2021). Proto bylo vyzkoušeno ovlivnění mixotrofní kultury extraktem červeného kalu. I přesto, že ovlivněná autotrofní kultura rostla lépe než ovlivněná mixotrofní kultura, tak mixotrofní kultura naakumulovala desetkrát více vzácných kovů (Graf č. 16). Nejvíce bylo akumulované yttrium. Mixotrofní kulturou řasy *G. sulphuraria* byla úspěšně popsána akumulace cesia (Fukuda et al., 2018) nebo Nd, Dy a La (Minoda et al., 2015). Akumulace lanthanoidů z luminoforových odpadů FL a CFL za využití mixotrofní kultury řasy *G. phlegrea* byly mnohonásobně vyšší než jejich akumulace z červeného kalu u *G. sulphuraria* (Čížková et al., 2021).

7 ZÁVĚR

Kyselý extrakt červeného kalu zvýšil bio-dostupnost vzácných kovů, navíc nelimitoval světelné podmínky, protože je bezbarvý. Přidané vzácné kovy z extraktu červeného kalu negativně ovlivnily růst a navýšily obsah fotosyntetických pigmentů u ovlivněných kultur *La4 D. quadricauda*. Analýza ICP-MS potvrdila vysoké hodnoty naakumulovaných vzácných kovů v biomase mutantního kmenu *La4 D. quadricauda* z extraktu červeného kalu. Po vyhodnocení analyzovaných dat z pokusu je patrné, že byla řasa *G. sulphuraria* ve zvýšeném stresu z přidání extraktu červeného kalu a nevykazovala tak lepší růst než mutantní kmen *La4 D. quadricauda*. Řasa *G. sulphuraria* ovlivněná extraktem červeného kalu navýšila obsah karotenoidů, avšak snížila obsah chlorofylu *a*. Závislost akumulace kritických kovů na fázi buněčného cyklu u řasy *G. sulphuraria* se nepotvrdila, navíc byla akumulace kovů až o třetinu nižší, než u *La4 D. quadricauda*. Mixotrofní kultura řasy *G. sulphuraria* s extraktem z červeného kalu rostla nejpomaleji, avšak akumulovala vyšší obsah kritických kovů než její autotrofní varianta.

Tyto poznatky o akumulaci vzácných kovů mikrořasami a jejich vliv na buněčný růst a tvorbu fotosyntetických pigmentů pomůžou v dalším výzkumu regulace buněčného cyklu řas externími faktory a bioakumulace kovů z průmyslových odpadů.

8 SEZNAM LITERATURY

Abhilash, Sinha, S., Sinha, M. K., & Pandey, B. D. (2014). Extraction of lanthanum and cerium from Indian red mud. *International Journal of Mineral Processing*, 127, 70-73. doi:10.1016/j.minpro.2013.12.009

Albertano, P., Ciniglia, C., Pinto, G., & Pollio, A. (2000). The taxonomic position of *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* and *Galdieria*: an update. *Hydrobiologia*, 433(1), 137-143.

Alkan, G., Xakalache, B., Yagmurlu, B., Kaussen, F., & Friedrich, B. (2017). Conditioning of red mud for subsequent titanium and scandium recovery—a conceptual design study. *World of metallurgy—ERZMETALL*, 70(2), 5-12.

An, S., Friedl, T., & Hegewald, E. (1999). Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. *Plant biology*, 1(4), 418-428.

Archambo, M., & Kawatra, S. K. (2021). Red Mud: Fundamentals and New Avenues for Utilization. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*, 42(7), 427-450. doi:10.1080/08827508.2020.1781109

Barcyte, D., Nedbalová, L., Culka, A., Kosek, F., & Jehlička, J. (2018). Burning coal spoil heaps as a new habitat for the extremophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Fottea*, 18(1), 19 - 29. doi:10.5507/fot.2017.015

Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue-Green-Alga. *Journal of Cell Biology*, 58(2), 419-435. doi:DOI 10.1083/jcb.58.2.419

Bišová, K., & Zachleder, V. (2014). Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple fission. *Journal of Experimental Botany*, 65(10), 2585-2602. doi:10.1093/jxb/ert466

Bökel, C. (2008). EMS Screens. In *Drosophila* (pp. 119-138): Springer.

Borra, C. R., Blanpain, B., Pontikes, Y., Binnemans, K., & Van Gerven, T. (2016). Recovery of Rare Earths and Other Valuable Metals From Bauxite Residue (Red Mud): A Review. *Journal of Sustainable Metallurgy*, 2(4), 365-386. doi:10.1007/s40831-016-0068-2

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Branyiková, I., Maršalková, B., Doucha, J., Branyik, T., Bíšová, K., Zachleder, V., et al. (2011). Microalgae-Novel Highly Efficient Starch Producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 766-776. doi:10.1002/bit.23016
- Brisson, V. L., Zhuang, W. Q., & Alvarez-Cohen, L. (2016). Bioleaching of rare earth elements from monazite sand. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(2), 339-348.
- Buchheim, M. A., Sutherland, D. M., Schleicher, T., Förster, F., & Wolf, M. (2012). Phylogeny of *Oedogoniales*, *Chaetophorales* and *Chaetopeltidales* (*Chlorophyceae*): inferences from sequence-structure analysis of ITS2. *Annals of Botany*, 109(1), 109-116.
- Butler, W. L. (1978). Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annual review of plant physiology*, 29(1), 345-378.
- Ciniglia, C., Yang, E. C., Pollio, A., Pinto, G., Iovinella, M., Vitale, L., et al. (2014). *Cyanidiophyceae* in Iceland: plastid rbcL gene elucidates origin and dispersal of extremophilic *Galdieria sulphuraria* and *G. maxima* (*Galdieriaceae*, *Rhodophyta*). *Phycologia*, 53(6), 542-551. doi:10.2216/14-032.1
- Ciniglia, C., Yoon, H. S., Pollio, A., Pinto, G., & Bhattacharya, D. (2004). Hidden biodiversity of the extremophilic *Cyanidiales* red algae. *Molecular Ecology*, 13(7), 1827-1838.
- Cozzolino, S., Caputo, P., De Castro, O., Moretti, A., & Pinto, G. (2000). Molecular variation in *Galdieria sulphuraria* (Galdieri) Merola and its bearing on taxonomy. *Hydrobiologia*, 433(1-3), 145-151. doi:Doi 10.1023/A:1004035224715
- Čížková, M., Mezricky, D., Rucki, M., Toth, T. M., Náhlík, V., Lanta, V., et al. (2019). Bio-mining of Lanthanides from Red Mud by Green Microalgae. *Molecules*, 24(7). doi:ARTN 135610.3390/molecules24071356 A
- Čížková, M., Mezricky, P., Mezricky, D., Rucki, M., Zachleder, V., & Vítová, M. (2021). Bioaccumulation of rare earth elements from waste luminophores in the red algae, *Galdieria phlegrea*. *Waste and Biomass Valorization*, 12(6), 3137-3146.

- Čížková, M., Vítová, M., & Zachleder, V. (2019). The red microalga *Galdieria* as a promising organism for applications in biotechnology. *Microalgae-From physiology to application*. **B**
- d'Aquino, L., Morgana, M., Carboni, M. A., Staiano, M., Antisari, M. V., Re, M., et al. (2009). Effect of some rare earth elements on the growth and lanthanide accumulation in different *Trichoderma* strains. *Soil Biology & Biochemistry*, 41(12), 2406-2413. doi:10.1016/j.soilbio.2009.08.012
- Das, N., & Das, D. (2013). Recovery of rare earth metals through biosorption: An overview. *Journal of rare earths*, 31(10), 933-943.
- Decallonne, J., & Weyns, J. (1976). A shortened procedure of the diphenylamine reaction for the measurement of deoxyribonucleic acid by using light activation. *Analytical biochemistry*, 74(2), 448-456.
- Del Mondo, A., Iovinella, M., Petriccione, M., Nunziata, A., Davis, S. J., Cioppa, D., et al. (2019). A spotlight on Rad52 in *Cyanidiophytina* (*Rhodophyta*): a relic in algal heritage. *Plants*, 8(2), 46.
- Dev, S., Sachan, A., Dehghani, F., Ghosh, T., Briggs, B. R., & Aggarwal, S. (2020). Mechanisms of biological recovery of rare-earth elements from industrial and electronic wastes: A review. *Chemical Engineering Journal*, 397, 124596.
- Edmundson, S. J., & Huesemann, M. H. (2015). The dark side of algae cultivation: characterizing night biomass loss in three photosynthetic algae, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis salina* and *Picochlorum* sp. *Algal research*, 12, 470-476.
- Enserink, M. (2010). ENVIRONMENT After Red Mud Flood, Scientists Try to Halt Wave of Fear and Rumors. *Science*, 330(6003), 432-433. doi:DOI 10.1126/science.330.6003.432
- Evans, K., Nordheim, E., & Tsesmelis, K. (2012). Bauxite residue management. In *Light metals 2012* (pp. 63-66): Springer.
- Evseeva, T., Geras'Kin, S., Majstrenko, T., Brown, J., & Belykh, E. (2010). Comparative estimation of ²³²Th and stable Ce (III) toxicity and detoxification pathways in freshwater alga *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*, 81(10), 1320-1327.

- Faramarzi, M. A., Mogharabi-Manzari, M., & Brandl, H. (2020). Bioleaching of metals from wastes and low-grade sources by HCN-forming microorganisms. *Hydrometallurgy*, 191, 105228.
- Ferris, M., Sheehan, K., Kuhl, M., Cooksey, K., Wigglesworth-Cooksey, B., Harvey, R., et al. (2005). Algal species and light microenvironment in a low-pH, geothermal microbial mat community. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 7164-7171.
- Fott, B. (1967). *Sinice a řasy*. 517 p. Academia, Praha.
- Franklin, L. A., Levavasseur, G., Osmond, C. B., Henley, W. J., & Ramus, J. (1992). Two components of onset and recovery during photoinhibition of *Ulva rotundata*. *Planta*, 186(3), 399-408.
- Fuentes, M. R., Sánchez, J. G., Sevilla, J. F., Fernández, F. A., Pérez, J. S., & Grima, E. M. (1999). Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. In *Progress in Industrial Microbiology* (Vol. 35, pp. 271-288): Elsevier.
- Fujiwara, T., Hirooka, S., Ohbayashi, R., Onuma, R., & Miyagishima, S.-y. (2020). Relationship between cell cycle and diel transcriptomic changes in metabolism in a unicellular red alga. *Plant Physiology*, 183(4), 1484-1501.
- Fukuda, S.-y., Yamamoto, R., Iwamoto, K., & Minoda, A. (2018). Cellular accumulation of cesium in the unicellular red alga *Galdieria sulphuraria* under mixotrophic conditions. *Journal of Applied Phycology*, 30(6), 3057-3061.
- Gevaert, F., & Rees, T. (2015). Total chlorophyll and nitrogen storage in the green alga *Ulva pseudolinza*. *CAHIERS DE BIOLOGIE MARINE*, 56(4), 313-318.
- Goecke, F., Vítová, M., Lukavský, J., Nedbalová, L., Řezanka, T., & Zachleder, V. (2017). Effects of rare earth elements on growth rate, lipids, fatty acids and pigments in microalgae. *Phycological Research*, 65(3), 226-234. doi:10.1111/pre.12180
- Gross, W., & Schnarrenberger, C. (1995). Heterotrophic Growth of 2 Strains of the Acidothermophilic Red Alga *Galdieria-Sulphuraria*. *Plant and Cell Physiology*, 36(4), 633-638. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:A1995RD56200012

- Gross, W., Oesterhelt, C., Tischendorf, G., & Lederer, F. (2002). Characterization of a non-thermophilic strain of the red algal genus *Galdieria* isolated from Soos (Czech Republic). *European Journal of Phycology*, 37(3), 477-482. doi:10.1017/S0967026202003773
- Gunetti, M., Castiglia, S., Rustichelli, D., Mareschi, K., Sanavio, F., Muraro, M., et al. (2012). Validation of analytical methods in GMP: the disposable Fast Read 102® device, an alternative practical approach for cell counting. *Journal of translational medicine*, 10(1), 1-12.
- Gunn, G. (2014). *Critical metals handbook* (pp. 1 online resource).
- Hagelüken, C., & Meskers, C. E. (2010). Complex life cycles of precious and special metals. *Linkages of sustainability*, 4.
- He, F. (2011). BCA (bicinchoninic acid) protein assay. *Bio-protocol*, 101, e44.
- Hill, K., Hemmler, R., Kovermann, P., Calenberg, M., Kreimer, G., & Wagner, R. (2000). A Ca²⁺-and voltage-modulated flagellar ion channel is a component of the mechanoshock response in the unicellular green alga *Spermatozopsis similis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1466(1-2), 187-204.
- Hlavová, M., Vítová, M., & Bišová, K. (2016). Synchronization of green algae by light and dark regimes for cell cycle and cell division studies. In *Plant Cell Division* (pp. 3-16): Springer.
- Hu, Q., Kurano, N., Kawachi, M., Iwasaki, I., & Miyachi, S. (1998). Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(6), 655-662.
- Ichinose, T. M., & Iwane, A. H. (2021). Long-term live cell cycle imaging of single *Cyanidioschyzon merolae* cells. *Protoplasma*, 258(3), 651-660.
- Imoto, Y., Fujiwara, T., Yoshida, Y., Kuroiwa, H., Maruyama, S., & Kuroiwa, T. (2010). Division of cell nuclei, mitochondria, plastids, and microbodies mediated by mitotic spindle poles in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Protoplasma*, 241(1-4), 63-74.

- Iovinella, M., Carbone, D. A., Cioppa, D., Davis, S. J., Innangi, M., Esposito, S., et al. (2020). Prevalent pH controls the capacity of *Galdieria maxima* to use ammonia and nitrate as a nitrogen source. *Plants*, 9(2), 232.
- Johnson, E. M., Kumar, K., & Das, D. (2014). Physicochemical parameters optimization, and purification of phycobiliproteins from the isolated *Nostoc sp.* *Bioresource Technology*, 166, 541-547. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.097
- Jong, L. W., Fujiwara, T., Hirooka, S., & Miyagishima, S. Y. (2021). Cell size for commitment to cell division and number of successive cell divisions in *cyanidialean* red algae. *Protoplasma*, 258(5), 1103-1118. doi:10.1007/s00709-021-01628-y
- Kam, V., Moseyko, N., Nemson, E., & Feldman, L. J. (1999). Gravitaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Characterization using video microscopy and computer analysis. *International Journal of Plant Sciences*, 160(6), 1093-1098. doi:Doi 10.1086/314205
- Kim, D. Y., Bovet, L., Maeshima, M., Martinoia, E., & Lee, Y. (2007). The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *The Plant Journal*, 50(2), 207-218.
- Kopecký, J., Lukavská, A., Verboviková, E., & Pfündel, E. (2004). Changes in the photosynthetic pigment patterns during the synchronous life cycle of *Porphyridium purpureum*. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 121-132.
- Laguna, C., González, F., García-Balboa, C., Ballester, A., Blázquez, M., & Muñoz, J. (2011). Bioreduction of iron compounds as a possible clean environmental alternative for metal recovery. *Minerals Engineering*, 24(1), 10-18.
- Ley, A. C., & Butler, W. L. (1977). Energy transfer from photosystem II to photosystem I in *Porphyridium cruentum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 462(2), 290-294.
- Li, Z., Cai, M., Huang, S., Shi, R., Lu, X., Qi, A., et al. (2008). Effects of cerium on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Mar Sci (China)*, 32, 37-41.
- Lorenzen, H. (1957). Synchrone Zellteilungen von *Chlorella* bei verschiedenen Licht-Dunkel-Wechseln. *Flora oder Allgemeine Botanische Zeitung*, 144(4), 473-496.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
- Lukavský, J., Tetík, K., & Vendlová, J. (1973). Extraction of nucleic acids from the alga *Scenedesmus quadricauda*. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 416-426.
- Lyu, K., Wang, X., Wang, L., & Wang, G. (2019). Rare-earth element yttrium enhances the tolerance of curly-leaf pondweed (*Potamogeton crispus*) to acute nickel toxicity. *Environmental Pollution*, 248, 114-120.
- Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of biological chemistry*, 140(2), 315-322.
- Maina, J. N., & Wang, Q. (2015). Seasonal response of chlorophyll a/b ratio to stress in a typical desert species: *Haloxylon ammodendron*. *Arid Land Research and Management*, 29(3), 321-334.
- Mancheri, N. A., Sprecher, B., Bailey, G., Ge, J. P., & Tukker, A. (2019). Effect of Chinese policies on rare earth supply chain resilience. *Resources Conservation and Recycling*, 142, 101-112. doi:10.1016/j.resconrec.2018.11.017
- Melis, A. (1991). Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1058(2), 87-106.
- Merola, A., Castaldo, R., Luca, P. D., Gambardella, R., Musacchio, A., & Taddei, R. (1981). Revision of *Cyanidium caldarium*. Three species of acidophilic algae. *Plant Biosystem*, 115 (4-5), 189-195.
- Minoda, A., Sawada, H., Suzuki, S., Miyashita, S.-i., Inagaki, K., Yamamoto, T., et al. (2015). Recovery of rare earth elements from the sulfothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria* using aqueous acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1513-1519.
- Mishra, V. K., Upadhyay, A. R., Pathak, V., & Tripathi, B. D. (2008). Phytoremediation of mercury and arsenic from tropical opencast coalmine effluent through naturally occurring aquatic macrophytes. *Water Air and Soil Pollution*, 192(1-4), 303-314. doi:10.1007/s11270-008-9657-4

Miyagishima, S.-y., Fujiwara, T., Sumiya, N., Hirooka, S., Nakano, A., Kabeya, Y., et al. (2014). Translation-independent circadian control of the cell cycle in a unicellular photosynthetic eukaryote. *Nature communications*, 5(1), 1-11.

Nagappan, S., & Verma, S. K. (2018). Co-production of biodiesel and alpha-linolenic acid (omega-3 fatty acid) from microalgae, *Desmodesmus sp.* MCC34. *Energy Sources Part a - Recovery Utilization and Environmental Effects*, 40(24), 2933-2940. doi:10.1080/15567036.2018.1514434

Náhlík V. (2018). Využití mikrořas pro recyklaci lanthanoidů z průmyslového odpadu. [Use of microalgae for recycling of lanthanides from industrial waste. Bc. Thesis. In Czech]. – 59 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Náhlík, V., Zachleder, V., Čížková, M., Bišová, K., Singh, A., Mezricky, D., et al. (2021). Growth under Different Trophic Regimes and Synchronization of the Red Microalga *Galdieria sulphuraria*. *Biomolecules*, 11(7), 939.

Olszewska, J. P., Meharg, A. A., Heal, K. V., Carey, M., Gunn, I. D., Searle, K. R., et al. (2016). Assessing the legacy of red mud pollution in a shallow freshwater lake: arsenic accumulation and speciation in macrophytes. *Environmental Science & Technology*, 50(17), 9044-9052.

Ouyang, H., Kong, X., He, W., Qin, N., He, Q., Wang, Y., et al. (2012). Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. *Chinese Science Bulletin*, 57(25), 3363-3370.

Palmieri, M. C., Garcia Jr, O., & Melnikov, P. (2000). Neodymium biosorption from acidic solutions in batch system. *Process Biochemistry*, 36(5), 441-444.

Pardee, A. B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(4), 1286-1290.

Pedram, H., Hosseini, M. R., & Bahrami, A. (2020). Utilization of *A. niger* strains isolated from pistachio husk and grape skin in the bioleaching of valuable elements from red mud. *Hydrometallurgy*, 198, 105495.

- Pinto, G., Albertano, P., Ciniglia, C., Cozzolino, S., Pollio, A., Yoon, H. S., et al. (2003). Comparative approaches to the taxonomy of the genus *Galdieria* Merola (Cyanidiales, Rhodophyta). *Cryptogamie Algologie*, 24(1), 13-32. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000182636500002
- Pitta, T. P., Sherwood, E. E., Kobel, A. M., & Berg, H. C. (1997). Calcium is required for swimming by the nonflagellated cyanobacterium *Synechococcus* strain WH8113. *Journal of Bacteriology*, 179(8), 2524-2528. doi:DOI 10.1128/jb.179.8.2524-2528.1997
- Power, G., Gräfe, M., & Klauber, C. (2011). Bauxite residue issues: I. Current management, disposal and storage practices. *Hydrometallurgy*, 108(1-2), 33-45.
- Qu, Y., & Lian, B. (2013). Bioleaching of rare earth and radioactive elements from red mud using *Penicillium tricolor* RM-10. *Bioresource Technology*, 136, 16-23.
- Qu, Y., Li, H., Tian, W., Wang, X., Wang, X., Jia, X., et al. (2015). Leaching of valuable metals from red mud via batch and continuous processes by using fungi. *Minerals Engineering*, 81, 1-4.
- Qu, Y., Li, H., Wang, X., Tian, W., Shi, B., Yao, M., et al. (2019). Selective parameters and bioleaching kinetics for leaching vanadium from red mud using *Aspergillus niger* and *Penicillium tricolor*. *Minerals*, 9(11), 697. **A**
- Qu, Y., Li, H., Wang, X., Tian, W., Shi, B., Yao, M., et al. (2019). Bioleaching of Major, Rare Earth, and Radioactive Elements from Red Mud by using Indigenous Chemoheterotrophic Bacterium *Acetobacter sp.* *Minerals*, 9(2), 67. **B**
- Reed, S. I. (1980). The selection of *S. cerevisiae* mutants defective in the start event of cell division. *Genetics*, 95(3), 561-577.
- Rocchetta, I., Mazzuca, M., Conforti, V., Balzaretto, V., & de Molina, M. d. C. R. (2012). Chromium induced stress conditions in heterotrophic and auxotrophic strains of *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 84, 147-154.
- Řezanka, T., Kaineder, K., Mezricky, D., Řezanka, M., Bíšová, K., Zachleder, V., et al. (2016). The effect of lanthanides on photosynthesis, growth, and chlorophyll profile of the green alga

Desmodesmus quadricauda. Photosynthesis Research, 130(1-3), 335-346.
doi:10.1007/s11120-016-0263-9 **A**

Řezanka, T., Vítová, M., Nedbalová, L., Lukavský, J. (2016). Nutrient solution for the cultivation of photosynthetic microorganisms, process for its preparation and use (in Czech). Patent cz 306000, **B6 B**

Salama, E.-S., Roh, H.-S., Dev, S., Khan, M. A., Abou-Shanab, R. A., Chang, S. W., et al. (2019). Algae as a green technology for heavy metals removal from various wastewater. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35(5), 1-19.

Sentsova, O. Y. (1994). The study of Cyanidiophyceae in Russia. In Evolutionary Pathways and Enigmatic Algae: *Cyanidium caldarium* (Rhodophyta) and Related Cells (pp. 167-174): Springer.

Scherhag, P., & Ackermann, J. U. (2021). Removal of sugars in wastewater from food production through heterotrophic growth of *Galdieria sulphuraria*. Engineering in Life Sciences, 21(3-4), 233-241.

Schroda, M., Hemme, D., & Mühlhaus, T. (2015). The *Chlamydomonas* heat stress response. The Plant Journal, 82(3), 466-480.

Simon-Bercovitch, B., Bar-Zvi, D., & Arad, S. (1999). Cell-wall formation during the cell cycle of *Porphyridium sp.*(*Rhodophyta*). Journal of Phycology, 35(1), 78-83.

Skorupa, D. J., Reeb, V., Castenholz, R., Bhattacharya, D., & McDermott, T. R. (2013). *Cyanidiales* diversity in Yellowstone national park. Letters in applied microbiology, 57(5), 459-466.

Sloth, J. K., Wiebe, M. G., & Eriksen, N. T. (2006). Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. Enzyme and Microbial Technology, 38(1-2), 168-175.

Sutherland, K. S. (2005). Solid/liquid separation equipment: WILEY-VCH.

Šetlík, I., Berková, E., Doucha, J., Kubín, Š., Vendlová, J., & Zachleder, V. (1972). The coupling of synthetic and reproduction processes in *Scenedesmus quadricauda*. Arch Hydrobiol Algal Stud, 7, 172-213.

Šetlík, I., Zachleder, V., Nurse, P., & Streiblová, E. (1984). The microbial cell cycle.

Tamiya, H. (1966). Synchronous cultures of algae. *Annual review of plant physiology*, 17(1), 1-27.

Toplin, J., Norris, T., Lehr, C., McDermott, T., & Castenholz, R. (2008). Biogeographic and phylogenetic diversity of thermoacidophilic cyanidiales in Yellowstone National Park, Japan, and New Zealand. *Applied and environmental microbiology*, 74(9), 2822-2833.

Umen, J. G. (2018). Sizing up the cell cycle: Systems and quantitative approaches in *Chlamydomonas*. *Current opinion in plant biology*, 46, 96-103.

Ůnal, D., Işik, N. O., & Sukatar, A. (2010). Effects of Chromium VI stress on green alga *Ulva lactuca* (L.). *Turkish Journal of Biology*, 34(2), 119-124.

Vítová, M., Bišová, K., Hlavová, M., Zachleder, V., Rucki, M., & Čížková, M. (2011). Glutathione peroxidase activity in the selenium-treated alga *Scenedesmus quadricauda*. *Aquatic Toxicology*, 102(1-2), 87-94.

Vítová, M., Bišová, K., Kawano, S., & Zachleder, V. (2015). Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnology advances*, 33(6), 1204-1218.

Vítová, M., Čížková, M., & Zachleder, V. (2019). Lanthanides and algae. In *Lanthanides* (pp. 87-111): Intech Open Limited.

Vítová, M., Goecke, F., Sigler, K., & Řezanka, T. (2016). Lipidomic analysis of the extremophilic red alga *Galdieria sulphuraria* in response to changes in pH. *Algal research*, 13, 218-226.

Vítová, M., Hendrychova, J., Cepák, V., & Zachleder, V. (2005). Visualization of DNA-containing structures in various species of *Chlorophyta*, *Rhodophyta* and *Cyanophyta* using SYBR Green I dye. *Folia Microbiologica*, 50(4), 333-340. doi:Doi 10.1007/Bf02931414

Volesky, B. (2007). Biosorption and me. *Water research*, 41(18), 4017-4029.

- Wan, M., Wang, Z., Zhang, Z., Wang, J., Li, S., Yu, A., et al. (2016). A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Bioresource Technology*, 218, 272-278.
- Wang, L., Sun, N., Tang, H. H., & Sun, W. (2019). A Review on Comprehensive Utilization of Red Mud and Prospect Analysis. *Minerals*, 9(6). doi:ARTN 36210.3390/min9060362
- Wanka, F. (1962). Die Bestimmung der Nucleinsäuren in *Chlorella*-Kulturen. *Planta*, 58(6), 594-609.
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophyll-a and Chlorophyll-B, as Well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313. doi: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2
- Xie, Y. P., Ho, S. H., Chen, C. N. N., Chen, C. Y., Ng, I. S., Jing, K. J., et al. (2013). Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus sp* for lutein production: Effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation. *Bioresource Technology*, 144, 435-444. doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.064
- Yang, Y., Zhang, L. Q., Huang, X., Zhou, Y. Y., Quan, Q. M., Li, Y. X., et al. (2020). Response of photosynthesis to different concentrations of heavy metals in *Davidia involucrata*. *Plos One*, 15(3). doi: ARTN e022856310.1371/journal.pone.0228563
- Yoon, H. S., Ciniglia, C., Wu, M., Comeron, J. M., Pinto, G., Pollio, A., et al. (2006). Establishment of endolithic populations of extremophilic *Cyanidiales* (*Rhodophyta*). *BMC Evolutionary Biology*, 6(1), 1-12.
- Yoshida, K., & Shimmen, T. (2009). Involvement of actin filaments in rhizoid morphogenesis of *Spirogyra*. *Physiologia Plantarum*, 135(1), 98-107. doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01172.x
- Zachleder, V. (1984). Optimization of nucleic acids assay in green and blue-green algae: extraction procedures and the light-activated diphenylamine reaction for DNA. *Arch. Hydrobiol*, 67, 313-328.

Zachleder, V., & Cepák, V. (1987). Visualization of DNA containing structures by fluorochrome DAPI in those algal cells which are not freely permeable to the dye. Arch. Hydrobiol./Algolog. Stud, 47, 157-168.

Zachleder, V., & Šetlík, I. (1982). Effect of irradiance on the course of RNA synthesis in the cell cycle of *Scenedesmus quadricauda*. Biologia Plantarum, 24(5), 341.

Zachleder, V., Bíšová, K., & Vítová, M. (2016). The Cell Cycle of Microalgae. Physiology of Microalgae, 6, 3-46. doi:10.1007/978-3-319-24945-2_1

Zachleder, V., Bíšová, K., Vítová, M., Kubín, Š., & Hendrychová, J. (2002). Variety of cell cycle patterns in the alga *Scenedesmus quadricauda* (*Chlorophyta*) as revealed by application of illumination regimes and inhibitors. European Journal of Phycology, 37(3), 361-371.

Zachleder, V., Kseliková, V., Ivanov, I. N., Bialevich, V., Vítová, M., Ota, S., et al. (2021). Supra-Optimal Temperature: An Efficient Approach for Overaccumulation of Starch in the Green Alga *Parachlorella kessleri*. Cells, 10(7). doi: ARTN 180610.3390/cells10071806

Zachleder, V., Schläfli, O., & Boschetti, A. (1997). GROWTH-CONTROLLED OSCILLATION IN ACTIVITY OF HISTONE H1 KINASE DURING THE CELL CYCLE OF CHLAMYDOMONAS REINHARDTII (*CHLOROPHYTA*) 1. Journal of Phycology, 33(4), 673-681.

Zeraatkar, A. K., Ahmadzadeh, H., Talebi, A. F., Moheimani, N. R., & McHenry, M. P. (2016). Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. Journal of environmental management, 181, 817-831.

Zinoveev, D., Pasechnik, L., Fedotov, M., Dyubanov, V., Grudinsky, P., & Alpatov, A. (2021). Extraction of Valuable Elements from Red Mud with a Focus on Using Liquid Media—A Review. Recycling, 6(2), 38.

Internetové zdroje:

REDMUD.ORG. *Red Mud Project/Characteristics* [online]. [cit. 2021-10-20].

Dostupné z: <http://redmud.org/red-mud/characteristics/>

REMA SYSTÉM, a.s. ANALÝZA POTENCIÁLU KRITICKÝCH SUROVIN
část 1 - kritické suroviny, Projekt: TB030MPO005 Výrobky odebrané v rámci zpětného
odběru v ČR jako zdroj kritických surovin, červen 2015, Praha [online] [cit. 2021-12-01].

Dostupné z: https://www.rema.cloud/wp-content/uploads/documents/ANAL_final.pdf

TELEGRAPH. *Hungary threatened by 'ecological catastrophe' as toxic sludge escapes
factory* [online]. [cit. 2018-10-20].

Dostupné z:

[http://www.telegraph.co.uk/news/worldnews/europe/hungary/8043969/Hungary-
threatened-by-ecological-catastrophe-as-toxic-sludge-escapes-factory.html](http://www.telegraph.co.uk/news/worldnews/europe/hungary/8043969/Hungary-threatened-by-ecological-catastrophe-as-toxic-sludge-escapes-factory.html)

9 ZDROJ OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek č. 1: *Desmodesmus quadricauda*, čtyř- a osmibuněčné coenobium Náhlík, V. (2021).

Obrázek č. 2: Asynchronní kultura řasy *G. sulphuraria* Náhlík, V. (2021).

Obrázek č. 3: Zjednodušené zobrazení buněčného cyklu řasy *D. quadricauda*.

Zachleder, V., Schläfli, O., & Boschetti, A. (1997). GROWTH-CONTROLLED OSCILLATION IN ACTIVITY OF HISTONE H1 KINASE DURING THE CELL CYCLE OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* (*CHLOROPHYTA*) 1. *Journal of Phycology*, 33(4), 673-681.

Obrázek č. 4: Fluorescenční mikrofotografie synchronní kultury *Galdieria sulphuraria*.

Náhlík, V., Zachleder, V., Čížková, M., Bišová, K., Singh, A., Mezricky, D., et al. (2021). Growth under Different Trophic Regimes and Synchronization of the Red Microalga *Galdieria sulphuraria*. *Biomolecules*, 11(7), 939.

Obrázek č. 5: Stehlík obecný (*Carduelis carduelis*) hledající potravu mezi „krunýřovitě“ silně karbonizovanou povrchovou skořápkou červeného kalu, Dr. Balász Kovács, Envirotis Holding Inc. Co., (2015).

Obrázek č. 6: Mapa rekultivované oblasti Almásfüzitő s označenými Depy, Dr. Balász Kovács, Envirotis Holding Inc. Co., (2015).

Obrázek č. 7: Rekultivovaná oblast Almásfüzitő. Depo #7 se nachází v popředí, v pozadí Depo #1-6, Dr. Balász Kovács, Envirotis Holding Inc. Co., (březen 2012).

Obrázek č. 8: Fluorescenční fotografie synchronních kultur řasy *G. sulphuraria* během cyklu. Horní řada zobrazuje kontrolní kultury – K. Spodní řada zobrazuje ovlivněné kultury extraktem červeného kalu – RM. U ovlivněných kultur je patrný přírůstek extraktu červeného kalu v okolí buněk. Jádra (zelená) byla obarvena SYBR Green I, chloroplasty (červeně) – autofluorescence chlorofylu. Náhlík, V. (2021).

Tabulka č. 1: Základní vlastnosti a využití vybraných vzácných kovů. Tabulka byla převzata z Rema Systém, a.s.; 2015.

REMA SYSTÉM, a.s. ANALÝZA POTENCIÁLU KRITICKÝCH SUROVIN

část 1 - kritické suroviny, Projekt: TB030MPO005 Výrobky odebrané v rámci zpětného odběru v ČR jako zdroj kritických surovin, červen 2015, Praha [online] [cit. 2021-12-01].

Dostupné z: https://www.rema.cloud/wp-content/uploads/documents/ANAL_final.pdf

Tabulka č. 2: Údaje o kvalitě a homogenitě lanthanoidů v červeném bahně z maďarského Almásfüzitő. Přeloženo z Čížková et al., 2019 (Avg – průměr, SD – směrodatná odchylka).

Čížková, M., Mezricky, D., Rucki, M., Tóth, T. M., Náhlík, V., Lanta, V., ... & Vítová, M. (2019). Bio-mining of lanthanides from red mud by green microalgae. *Molecules*, 24(7), 1356.

Tabulka č. 3: Rozsah koncentrací hlavních složek červeného bahna z místa Depo #7 z maďarského Almásfüzitő. Přeloženo z Čížková et al., 2019 (Avg – průměr, SD – směrodatná odchylka).

Čížková, M., Mezricky, D., Rucki, M., Tóth, T. M., Náhlík, V., Lanta, V., ... & Vítová, M. (2019). Bio-mining of lanthanides from red mud by green microalgae. *Molecules*, 24(7), 1356.

Tabulka č. 4: Složení živného média ½ ŠS.

Zachleder, V., Šetlík, I. (1982) Effect of irradiance on the course of RNA synthesis in the cell cycle of *Scenedesmus quadricauda*. *Biol Plantarum*, 24(5): 341-353.

Tabulka č. 5: Složení modifikovaného *Galdieria* média.

Řezanka, T., Vítová, M., Nedbalová, L., Lukavský, J.: Nutrient solution for the cultivation of photosynthetic microorganisms, process for its preparation and use (in Czech).

Patent cz 306000, B6 (2016) A

10 SEZNAM ZKRATEK

CP	„commitment point“ neboli regulační bod
DAPI	2-(4-Amidinophenyl)-1 <i>H</i> -indole-6-carboxamidine
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EMS	Ethylmethansulfonát
Fv/Fm	Fluorescenční poměr variabilní ku maximální fluorescenci
G1	1. přípravná fáze buněčného cyklu
G2	2. přípravná fáze buněčného cyklu
G3	3. přípravná fáze buněčného cyklu
ICP-MS	„Inductively coupled plasma-mass spectrometry“
K	kontrolní kultura
L/D	režim světlo/tma (light/dark)
La4	označení mutantního kmene řasy <i>D. quadricauda</i>
M	mitotická fáze buněčného cyklu
OD	optická densita
PGM	kovy platinové skupiny
pS	předsyntetická fáze buněčného cyklu
RC I	Reakční centrum fotosystému I
RC II	Reakční centrum fotosystému II
rcf	„relative centrifugal force“ neboli relativní centrifugační síla
REEs	„rare-earth elements“ neboli Prvky vzácných zemin či lanthanoidy
RM	„red mud“ – červený kal
RNA	Ribonukleová kyselina

S	syntetická fáze buněčného cyklu
SYBR GREEN I	N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine
SZÚ	Státní zdravotní ústav
v/v	objemová procenta