

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Využití mikrořas pro recyklaci lanthanoidů  
z průmyslového odpadu**

Bakalářská práce

**Vít Náhlík**

Školitelka: RNDr. Milada Vítová, Ph.D.

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

České Budějovice 2018

**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.

**Anotace:**

Tato studie zkoumá vliv červeného kalu na mikrořasy za účelem recyklace lanthanoidů, které červený kal obsahuje. Vliv červeného kalu je sledován v kultivacích mikrořas s různě nutričně bohatými tekutými médii, které jsou ovlivňovány různými koncentracemi přidaného červeného kalu.

**Klíčová slova:** mikrořasy, *Desmodesmus quadricada*, lanthanoidy, červený kal, bioakumulace, recyklace, toxicita

**Annotation:**

This study examines the effect of Red Mud containing lanthanides on microalgae for recycling purposes. The effect of Red Mud is monitored on cultivations of microalgae with various liquid nutritionally rich media affected by different concentrations of added Red Mud.

**Key words:** microalgae, *Desmodesmus quadricada*, lanthanides, Red Mud, bioaccumulation, recycling, toxicity

Prohlašuji, že jsem práci vypracoval samostatně pouze s použitím literatury uvedené v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu své kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne .....

.....

Vít Náhlík

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval hlavně své školitelce RNDr. Miladě Vítové, Ph.D. a také své konzultantce Mgr. Márii Čížkové, Ph.D. za jejich pomoc při výzkumu, za obrovskou trpělivost, cenné rady a připomínky při psaní bakalářské práce. Poděkování také patří mému garantovi práce prof. Ing. Jiřímu Šantrůčkovi, CSc. za pomoc se psáním mé práce. Rád bych také poděkoval týmu Mgr. Mariana Ruckého, Ph.D. ze Státního zdravotního ústavu v Praze za analýzy vzorků pomocí ICP-MS a týmu RNDr. Tomáše Řezanky, CSc. z MBÚ AVČR v Praze za analýzu lipidů. V neposlední řadě patří poděkování všem spolupracovníkům z Laboratoře buněčných cyklů, spolubydlícím a přátelům za pomoc při výzkumu a veškerou podporu, kterou mi po celou dobu poskytovali.

# Obsah

1 ÚVOD .....	1
2.1 Modelové organismy .....	2
2.1.1 <i>Desmodesmus quadricauda</i> .....	2
2.1.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	3
2.1.3 <i>Parachlorella kessleri</i> .....	3
2.2. Buněčný cyklus řas .....	4
2.2.1 Buněčný cyklus řasy <i>Desmodesmus quadricauda</i> .....	4
2.2.2 Buněčný cyklus řasy <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	5
2.2.3 Buněčný cyklus řasy <i>Parachlorella kessleri</i> .....	7
2.3 Energetické rezervy řas a jejich využití .....	8
2.4 Prvky vzácných zemin (lanthanoidy) .....	10
2.4.1 Obecný úvod .....	10
2.4.2 Výskyt v přírodě .....	11
2.4.3 Využití lanthanoidů .....	12
2.4.4 Působení lanthanoidů na řasy .....	12
2.4.5 Červený kal (Red mud) .....	13
3 CÍLE PRÁCE .....	17
4 METODIKA .....	18
4.1 Odebrání vzorků červeného kalu .....	18
4.2. Kultivace řas .....	19
4.2.1 Kultivace .....	19
4.2.2 Kultivace řas s přídavkem červeného kalu .....	22
4.3 Měření pH a optické density .....	22
4.4 Mikroskopie .....	23
4.4.1 Barvení lipidů pomocí barvy Nile Red .....	23
4.4.2 Počítání buněk v Bürkerově komůrce .....	23

4.5. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP – MS) .....	24
4.5.1 Příprava vzorků pro ICP – MS.....	24
4.5.2 Elementární analýza vzorků (ICP – MS) .....	25
4.6 Analýza lipidů.....	25
4.7. Test lipofilního charakteru červeného kalu .....	25
5 VÝSLEDKY .....	26
5.1 Výběr vhodného modelového organismu pro kultivaci s červeným kalem .....	26
5.2 Kultivace vybraného modelového organismu s červeným kalem při rozdílné bohatosti živin v médiu .....	31
5.2.1 Kultivace řasy <i>D. quadricauda</i> na ½ ŠS médiu bez mikroelementů .....	31
5.2.1 Kultivace řasy <i>D. quadricauda</i> v ¼ ŠS médiu.....	39
5.3 Měření obsahu lanthanoidů v biomase .....	41
6 DISKUZE.....	46
7 ZÁVĚR.....	49
8 SEZNAM LITERATURY .....	50
9 ZDROJ OBRÁZKŮ .....	58

# 1 ÚVOD

Svou práci jsem vypracoval na Mikrobiologickém ústavu, AV ČR v.v.i., v Laboratoři buněčných cyklů v Centru Algattech v Třeboni. V práci jsem se zaměřil na problematiku recyklace lanthanoidů z průmyslových odpadů za pomoci zelených řas. Výzkum recyklace lanthanoidů a jiných kovů má v této laboratoři dlouholeté zastoupení v čele s RNDr. Miladou Vítovou, Ph.D. a jejím týmem.

Lanthanoidy jsou hojně využívány v zemědělské produkci (např. jako rostlinná hnojiva) a také v průmyslu (elektronika, sklářství, moderní technologie). Jejich možný vývoz z oblastí těžby klesá a cena stoupá, a proto se hledají nové alternativní metody pro jejich recyklaci. Průmyslové odpady jsou jedním ze zdrojů jejich recyklace. Jednou z alternativ recyklace je využití mikroorganismů.

Pro naši práci jsme vybrali průmyslový odpad, který je znám pod názvem červený kal (v anglickém jazyce Red Mud). Tento kal vzniká jako odpadní látka při výrobě hliníku Bayerovým zásaditým procesem, je silně toxický a obsahuje velké množství nevyužitých kovů a lanthanoidů. Červený kal je velmi složité skladovat kvůli jeho silné alkalitě a toxicitě. Skladuje se ve velkých odkalištích neboli tzv. Reziduálních skladovacích prostorech (RSA). V říjnu roku 2010 došlo k protržení odkaliště poblíž města Ajka v Maďarsku a zaplavení cca 40 km<sup>2</sup> krajiny včetně dvou řek. Tato nehoda dala podnět k výzkumu rekultivace a recyklace postiženého území.

Cílem mé práce bylo zjistit, jaký modelový mikroorganismus bude vhodný pro kultivaci s přidavkem červeného kalu. Pro tento pokus jsme vybrali 3 zástupce zelených řas z oddělení Chlorophyta, přesněji - *Desmodesmus quadricauda*, *Chlamydomonas reinhardtii* a *Parachlorella kessleri*, protože jsou dobře prozkoumány a využívány jako modelové organismy ve výzkumu a k biotechnologickým účelům.

Po vybrání nejlepšího modelového organismu tj. řasy *Desmodesmus quadricauda* jsem se zaměřil na kultivace s nižším obsahem živin a přidavkem červeného kalu. Sledoval jsem růstové parametry a rozdíly ve vstřebávání živin a kovů z červeného kalu.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Modelové organismy

Jako modelové organismy byly vybrány tři zelené řasy z oddělení Chlorophyta, přesněji - *Desmodesmus quadricauda*, *Chlamydomonas reinhardtii* a *Parachlorella kessleri*, protože jsou hojně využívané jako modelové organismy ve výzkumu buněčných cyklů a k biotechnologickým účelům.

#### 2.1.1 *Desmodesmus quadricauda*

Cenobiální řasa *Desmodesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson kmen Greifswald/15 byla získána ze Sbírký autotrofních mikroorganismů (CCALA – Culture Collection of Autotrophic Organisms) Botanického ústavu AV ČR, Dukelská 135, Třeboň. Ve sbírce je uvedena pod dřívější taxonomickou klasifikací *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson (kmen Greifswald/15), která se používala v četných starších publikacích.

Rod *Desmodesmus* (Chlorophyta, Sphaeropleales, Scenedesmaceae) byl oddělen od rodu *Scenedesmus* (An et al., 1999). Pozdější fylogenetická analýza založená na plastidové genomice dále rozlišuje *Desmodesmus quadricauda* od úzce příbuzného *Desmodesmus communis* (Buncheim et al., 2012).

Buňky *Desmodesmus* se rozmnožují vegetativním dělením z jedné mateřské buňky. Propojeny jsou společnou buněčnou stěnou a tvoří buď čtyř-, nebo osmi-buněčná cenobia, vzácněji dvoubuněčná (viz obrázek č. 1). Okrajové buňky jsou nápadné svými dvěma ostny. Každá buňka obsahuje jádro a jednoduchý chloroplast s pyrenoidem (Fott, 1967).



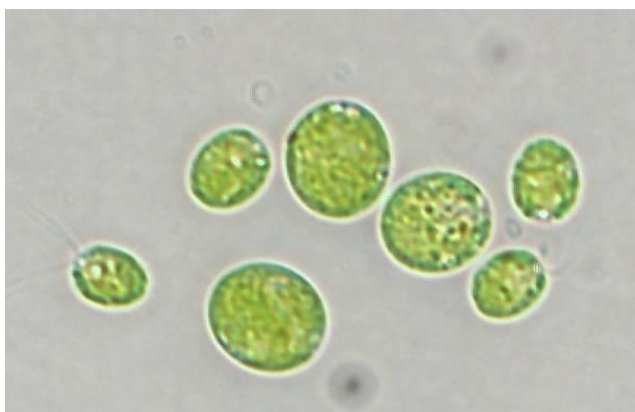
Chloroplastový a mitochondriální genom byl osekvenován na jiném zástupci rodu *Scenedesmus*, u *S. obliquus* (Nedelcu et al., 2000). Tyto řasy rodu *Scenedesmus* a *Desmodesmus* jsou významnou složkou fytoplanktonu stojatých vod, podílející se na výživě živočichů (Fott, 1967).

**Obrázek č. 1:** *Desmodesmus quadricauda* - osmibuněčné cenobium.

## 2.1.2 Chlamydomonas reinhardtii

Řasa *Chlamydomonas reinhardtii* z rodu *Chlamydomonas* (Chlorophyta, Chlamydomonadales, Chlamydomonadaceae) je přibližně 10  $\mu\text{m}$  dlouhá jednobuněčná zelená řasa s několika mitochondriemi a dvěma předními bičíky umožňujícími páření a motilitu (viz obrázek č. 2). Její linie se odchytila od rostlin před více než 1 miliardou let (Merchant et al., 2007). Buňky se vyskytují převážně v haploidním stavu a rozmnožují se vegetativně. Pokud jsou buňky vystaveny deficitu dusíku a světlu modrého spektra, vyvíjejí se vegetativně na gamety, a tím mohou vznikat párovací typy  $\text{mt}^+$ , nebo  $\text{mt}^-$  (Weissig and Back, 1991).

Pro náš výzkum byl použit kmen *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 wild type  $\text{mt}^+$  137c.



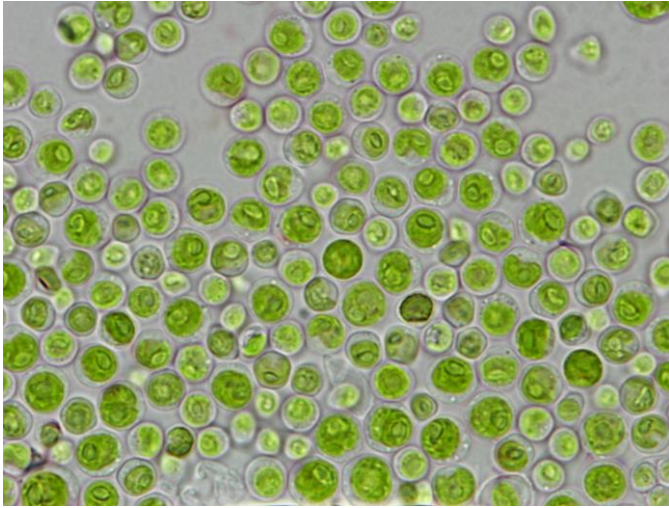
**Obrázek č. 2:** Kultura řasy *Chlamydomonas reinhardtii* (Šenkyplová, 2018).

## 2.1.3 Parachlorella kessleri

Zelená řasa *Parachlorella kessleri* (Krienitz et al., 2004), kmen CCALA 255 byla poskytnuta z CCALA v Třeboni. Ve sbírce je kmen udržován na šikmém agaru při ozařování přibližně 23  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ , 12/12 h (režim světlo/tma) a při teplotě 12 až 15  $^{\circ}\text{C}$ .

Rod *Parachlorella* byl odlišen od rodu *Chlorella* na základě osekvenování 18 S ribozomálních RNA genů (Krienitz et al., 2014).





Rod *Chlorella* patří u nás k nejběžnějším půdním řasám. Její chloroplast s jedním nebo více pyrenoidy má hrncovitý tvar dole ztlustěný, nahoře otevřený. Rozmnožuje se zoosporami, podobně jako rod *Chlamydomonas* (Fott, 1967).

Obrázek č. 3: Kultura řasy *Parachlorella kessleri* (Ivanov, 2017).

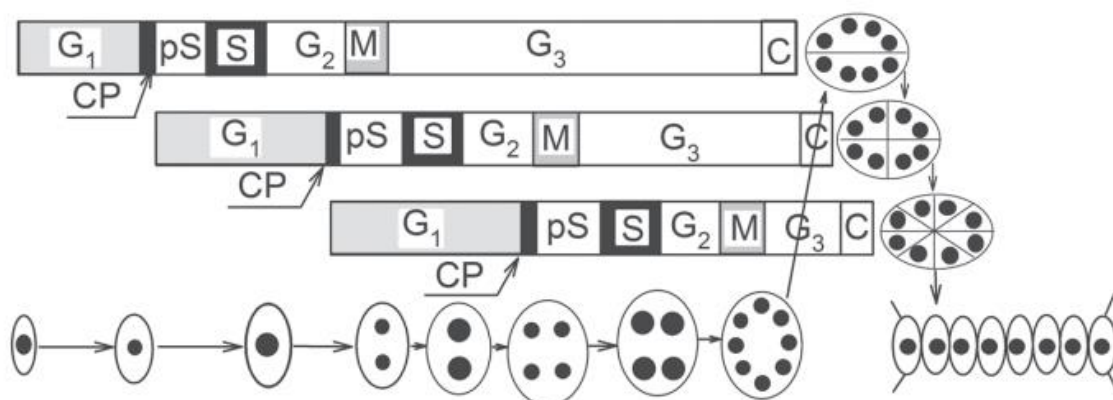
## 2.2. Buněčný cyklus řas

### 2.2.1 Buněčný cyklus řasy *Desmodesmus quadricauda*

Buněčný cyklus *D. quadricauda* je charakteristický svým násobným dělením, při němž se mateřské buňky v jednom buněčném cyklu rozdělí na  $2^n$  buněk ( $n$  je počet dělení). Buňky po dělení sdílejí jednu společnou vrstvu buněčné stěny a zůstávají spojeny v cenobiích po celý buněčný cyklus (Bišová and Zachleder, 2014).

Mnohonásobné dělení u řasy *D. quadricauda* se vyznačuje tím, že během jednoho buněčného cyklu proběhne postupně několik ( $2^n$ ) růstových a reprodukčních fází, které se mohou navzájem překrývat. Pro průběh růstové fáze G1 potřebuje buňka dostatek živin a světla jako zdroje energie a  $\text{CO}_2$  jako zdroje uhlíku. Růstem dosáhne buňka určitého objemu a dostatečných energetických rezerv, které umožní spuštění posloupnosti reprodukčních pochodů (replikace DNA, dělení jader, protoplastů a vytvoření dceřiných buněk), regulačního bodu neboli „commitment pointu“ (dále jako CP) (Šetlík and Zachleder, 1984). Předsyntetická fáze - pS je první z reprodukčních pochodů, která se spustí v buňce po dosažení CP a pokračuje replikací DNA a mitózou (Zachleder et al., 1997). Buňka může stále růst i během této reprodukční fáze a dosáhnout druhého CP, který opět spustí posloupnost reprodukčních pochodů.

Po každé fázi M následuje u řasy *D. quadricauda* fáze G3, při které dojde k pauze mezi mitózou a cytokinezí (Zachleder et al., 1997). Buňky se díky tomu stanou mnohojadernými a cytokineze proběhne až na konci buněčného cyklu, kdy jsou všechny fáze M dokončeny, viz obrázek č. 4 (Zachleder et al., 2002).



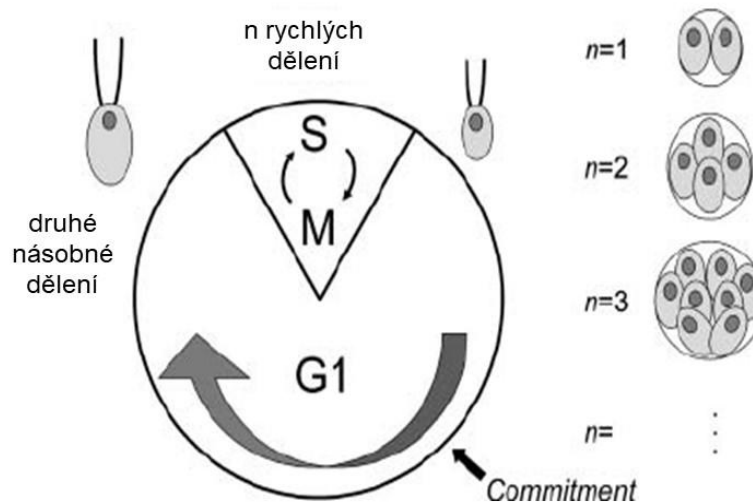
**Obrázek č. 4:** Schéma buněčného cyklu *D. quadricauda* (Zachleder et al., 1997). Blíže rozepsáno v textu nad obrázkem.

Kromě obvyklých fází buněčného cyklu (G1, S, G2, M) lze v buněčném cyklu *D. quadricauda* odlišit předsyntetickou fází (pS) a fází G3. Předsyntetická fáze, jež je součástí pozdní G1 fáze, se spouští dosažením CP a končí začátkem S fáze. Všechny fáze po dosažení CP probíhají i při zastavení růstu (např. ve tmě) a probíhají výhradně využíváním energetických rezerv v buňce (škrob, lipidy, polyfosfáty) (Zachleder et al., 1997).

### 2.2.2 Buněčný cyklus řasy *Chlamydomonas reinhardtii*

U řasy *Chlamydomonas* je typické násobné dělení stejně jako u řasy *D. quadricauda*, ale tento buněčný cyklus je charakteristický prodlouženou fází G1, během které mohou buňky několikanásobně ( $2^n$ ) zvětšit svůj objem. Na konci fáze G1 proběhne ( $n$ -krát) rychlé střídání fází S (DNA syntéza) a M (mitóza). Vyprodukuje se  $2^n$  dceřiných buněk z jedné mateřské buňky (Zachleder et al., 2016). Buněčný cyklus řasy *Chlamydomonas* je řízen dvěma kontrolními body. Prvním z kontrolních bodů je tzv. „commitment point“ (Zachleder et al., 2016). Tohoto velikostí řízeného kontrolního bodu (CP) dosáhnou buňky, které zdvojnásobí svůj objem. Buňky, které dosáhnou tohoto kontrolního bodu, dokončí minimálně jednu posloupnost reprodukčních pochodů (replikace DNA, dělení jader a dělení buněk). Tato posloupnost může probíhat i ve tmě. U buněk, kterým byl přerušen růst

před dosažením kontrolního bodu, nejsou spuštěny reprodukční pochody. Po dosažení jednotlivých kontrolních bodů zůstávají buňky na dalších 5-8 hodin ve stavu podobném jako v G1 fázi, což předchází iniciaci první fáze S/M. Střídání fází S a M je velmi rychlé bez rozlišitelných mezifází (např. 3 následné replikace DNA a mitózy za současného dělení protoplastů probíhají v jedné buňce v rozmezí jedné až dvou hodin) a jsou ukončeny buněčným dělením. Růstem dosažená velikost mateřské buňky určuje počet uskutečněných S/M fází a vede ke vzniku 2-32 dceřiných buněk. Díky fyziologickým podmínkám střídání světla (L) a tmy (D) (např. L:D – 12:12 hodin) lze buněčný cyklus populace buněk synchronizovat tak, že k růstu dochází během periody světla a k buněčnému dělení během krátké periody tmy (Harris, 1989).

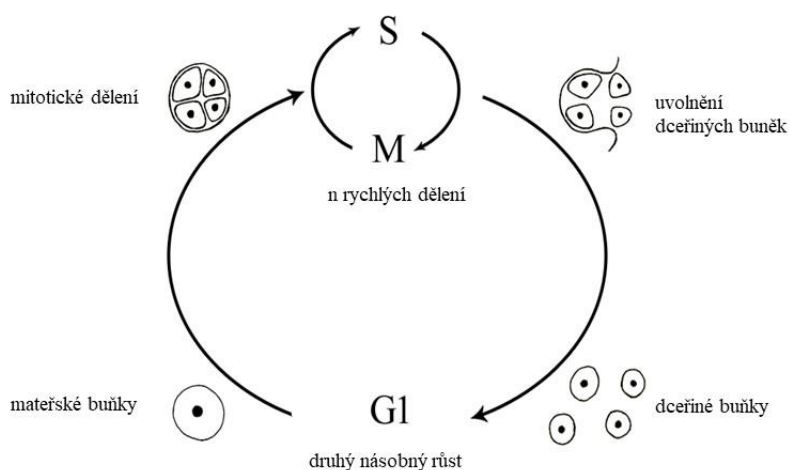


**Obrázek č. 5:** Schéma mnohonásobného dělení v buněčném cyklu znázorňuje fáze cyklu řasy *Chlamydomonas reinhardtii*. Většina cyklu připadá na fázi G1, která je rozdělena do dvou částí vymezených regulačním bodem - CP. Na konci G1 proběhne rychlé střídání cyklů S a M a vznikají  $2^n$  dceřiné buňky jednotné velikosti. Hodnota n souvisí s velikostí mateřských buněk. Postmitotické mateřské buňky s různými hodnotami n jsou zobrazeny vpravo s dceřinými 2, 4, 8 atd. (Bišová et al., 2005).

### 2.2.3 Buněčný cyklus řasy *Parachlorella kessleri*

Řasa *P. kessleri*, stejně jako mnoho jiných jednobuněčných zelených řas, se dělí autosporulací (Yamamoto et al., 2005), tj. během dělení se uvnitř mateřské buňky vytvářejí dceřiné buňky s vlastní buněčnou stěnou (autospory), které se uvolňují po protržení buněčné stěny původní mateřské buňky.

Podle Hase (1962) je buněčný cyklus *Chlorellaceae* rozdělen do několika různých stupňů (viz obr. č. 6). Začíná změnami uvnitř buněk řas. Jak se buňky připravují na vstup do buněčného dělení, rostou ve velikosti a aktivně zvyšují svou buněčnou hmotu a přeměňují se na mateřské buňky. Mateřské buňky pak vstupují do fáze raného dozrávání, během něhož dochází k různým syntetickým procesům při přípravě na mitózu. Mateřské buňky se pak rozdělí vícenásobným dělením na dvě nebo více dceřiných buněk ( $2^n$ ), které zůstávají uvnitř buněčné stěny mateřské buňky. Na konci buněčného cyklu jsou dceřiné buňky uvolněny z uzavřené buněčné stěny. Stádia růstu a časného dozrávání závisí jak na teplotě, tak na intenzitě světla.

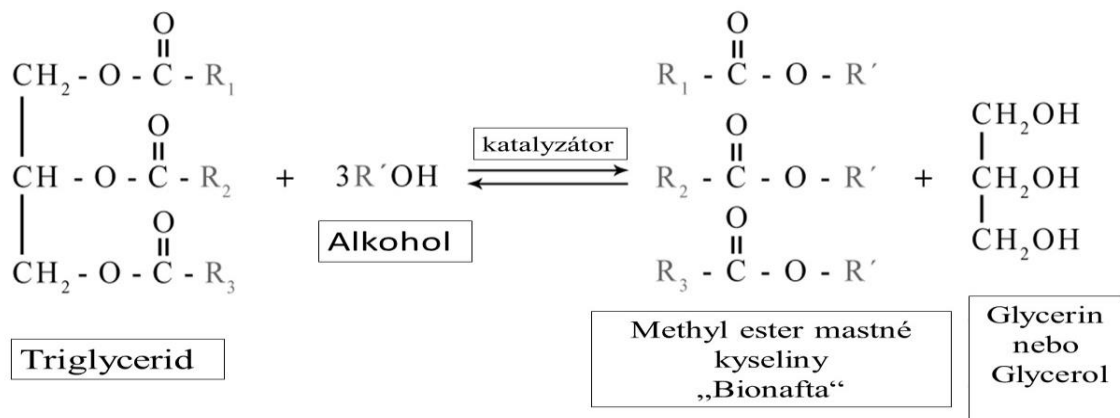


**Obrázek č. 6:** Buněčný cyklus řasy *Parachlorella kessleri* (Náhlík a Ivanov, 2018).

## 2.3 Energetické rezervy řas a jejich využití

Některé druhy mikrořas jsou schopné syntetizovat velké množství lipidů. Vzhledem k této schopnosti jsou, kromě produkce bioethanolu odvozeného z polysacharidů (Cheng a Timilsina, 2011; Nair a Paulose, 2014), považovány za potenciální zdroj biopaliv jako je bionafta, bioplyn a letecká paliva.

Jak je patrné z publikace Fernandes et al. (2013), příjem uhlíku do různých sloučenin s vysokou energetickou hodnotou je ovlivněn faktory prostředí. Mnoho řas, zejména zelených (Chlorophyta), využívá v příznivých podmínkách růstu škrob jako primární zdroj uhlíku a sloučeninu pro skladování energie (Li et al., 2010), nebo lipidy jako sekundární zdroj uhlíku a energie. Obecně mohou řasy syntetizovat mastné kyseliny, které používají buď jako substrát pro esterifikaci polárních lipidů na bázi glycerolu, jako jsou glykolipidy a fosfolipidy, které jsou složkou biologických membrán, nebo je hromadí jako neutrální lipidy, které využívají jako zásobní látky. Tyto neutrální lipidy mohou za určitých kultivačních podmínek dosahovat 20-50 % hmotnosti v sušině z řasové biomasy a nacházejí se převážně ve formě triacylglycerolů (Hu et al., 2008), které jsou obvykle uloženy v cytoplazmatických lipidových tělískách (lipid bodies). Tyto lipidy se skládají převážně z triglyceridů a mohou sloužit jako zdroj pro výrobu obnovitelných paliv jak stávajícími, tak vznikajícími procesy rafinace lipidů (Francisco et al., 2010). Bionafta se obvykle syntetizuje chemickou transesterifikací triglyceridů v rostlinných olejích nebo živočišných tucích s alkoholem (viz obr. 7). V závislosti na jejich složení mohou některé oleje nebo tuky vyžadovat předúpravu, jako je odkyselení, bělení a dehydratace. Přestože methanol nebo ethanol mohou být použity pro transesterifikaci, používá se častěji methanol, protože má nižší cenu. Cena alkoholu je důležitá, protože chemická reakce vyžaduje 3 moly alkoholu na 1 mol triglyceridu. Hlavními konečnými produkty transesterifikace jsou bionafta a glycerin, které jsou obvykle odděleny usazováním, filtrací a dekantací (Cheng a Timilsina, 2011).



**Obrázek č. 7:** Chemická reakce pro výrobu bionafty (Cheng a Timilsina, 2011).

## 2.4 Prvky vzácných zemin (lanthanoidy)

### 2.4.1 Obecný úvod

Jako lanthanoidy označujeme skupinu prvků následujících v periodickém systému po lanthanu (konfigurace  $[\text{Xe}]5d^1 6s^2$ ). Dvojice elektronů  $6s^2$ , doplněna orbitaly  $4f$ , jež jsou postupně obsazované jedním až čtrnácti elektrony, tvoří valenční sféru. Ve třech prvcích (Ce, Gd, Lu) obsahuje valenční sféra ještě po jednom elektronu  $5d$ , viz tabulka č. 1.

**Tabulka č. 1:** Základní vlastnosti lanthanoidů (Jursík, 2002).

Atom/Z	Elektronová konfigurace	Kovový poloměr, pm	Iontový poloměr $M^{3+}$ , pm	Oxidační stav
Ce/58	$[\text{Xe}]4f^1 5d^1 6s^2$	182	107	III, IV
Pr/59	$[\text{Xe}]4f^3 6s^2$	183	106	III, IV
Nd/60	$[\text{Xe}]4f^4 6s^2$	182	104	III
Pm/61	$[\text{Xe}]4f^5 6s^2$	181	106	III
Sm/62	$[\text{Xe}]4f^6 6s^2$	180	110	II, III
Eu/63	$[\text{Xe}]4f^7 6s^2$	204	98	II, III
Gd/64	$[\text{Xe}]4f^7 5d^1 6s^2$	180	97	III
Tb/65	$[\text{Xe}]4f^9 6s^2$	178	93	III, IV
Dy/66	$[\text{Xe}]4f^{10} 6s^2$	177	91	III
Ho/67	$[\text{Xe}]4f^{11} 6s^2$	177	89	III
Er/68	$[\text{Xe}]4f^{12} 6s^2$	176	89	III
Tm/69	$[\text{Xe}]4f^{13} 6s^2$	175	87	III
Yb/70	$[\text{Xe}]4f^{14} 6s^2$	194	86	II, III
Lu/71	$[\text{Xe}]4f^{14} 5d^1 6s^2$	117	85	III

Vzhledem k tomu, že elektrony zaplňují vnitřní orbitaly, jsou si lanthanoidy po chemické stránce nápadně podobné (Jursík, 2002).

Nejčastější oxidační stav je pro lanthanoidy +III (viz tab. č. 1), ale u některých (Ce, Pr, Tb) je i +IV, nebo i +II (Sm, Eu, Yb) (Jursík, 2002).

V českém jazyce se lanthanoidy označují souhrnně jako prvky vzácných zemin, v anglickém jazyce se používá název „rare earth elements“ (zkratka REEs).

## 2.4.2 Výskyt v přírodě

V přírodě se lanthanoidy vyskytují především v podobě „směsných sloučenin“, kde se nachází velká většina prvků vzácných zemin. Nejčastějším zástupcem těchto směsných sloučenin je monazit (obr. č. 8). Monazit je fosfát ceru ( $\text{CePO}_4$ ) obsahující příměs dalších prvků. Díky tomu můžeme odlišit čtyři různé druhy monazitu (viz tab. č. 2).

**Tabulka č. 2:** Druhy monazitu a jejich chemické složení (Mindat.org).

Druh monazitu	Chemické složení sloučeniny
monazit – (Ce)	(Ce, La, Nd, Th) $\text{PO}_4$
monazit – (La)	(La, Ce, Nd) $\text{PO}_4$
monazit – (Nd)	(Nd, La, Ce) $\text{PO}_4$
monazit – (Sm)	(Sm, Gd, Ce, Th) $\text{PO}_4$

**Obrázek č. 8:** Monazit (Wikipedia).

Naleziště monazitu se nacházejí např. v USA, Brazílii, Austrálii, Jižní Africe a Číně (USGS, 2014). Hlavním vývozcem tohoto „průmyslového zlata“ byla Čína (až 97 % vývozu REEs), avšak ta si začala diktovat politicko-ekonomické podmínky a export omezila až o 34 %, přičemž je nadále využívá jen ve svém průmyslu.





Tyto suroviny se hojně používají v elektronice nebo pro výrobu hnojiv. Nejvíce závislé na REEs je Japonsko, USA, ale i některé státy Evropy. Kvůli tomu se REEs stávají nedostatkovými a hledají se možné varianty recyklace těchto materiálů (Schwabe et al., 2012; Tse Pui-Kwan, 2011).

### 2.4.3 Využití lanthanoidů

Lanthanoidy nacházejí využití v mnoha odvětvích průmyslu. Mají strategický význam ve špičkové elektrotechnice, nanotechnologiích, ale i ve vojenské technice a laserech. Používají se v metalurgii pro zvýšení tvárnosti a kujnosti oceli a litiny. Významné uplatnění mají ve sklářském průmyslu, kde příměs lanthanoidů mění index lomu vyrobeného skla. Lanthanoidy podporují fyziologické funkce rostlin a řas – zvyšují obsah chlorofylu, čímž zvyšují rychlost fotosyntézy. Dále ovlivňují absorpci živin a stabilizaci cytoskeletu v buňkách. Pozitivní účinky mají lanthanoidy pouze v nižších koncentracích, ve vyšších koncentracích jsou naopak toxické (Fashui et al., 2003; Goecke et al., 2015).

### 2.4.4 Působení lanthanoidů na řasy

Přítomnost lanthanoidů (Pr, Nd a Sm) byla nejprve zaznamenána v inkrustované červené řase *Phymatolithon calcareum* ve městě Roscoff ve Francii (Servigne and Tcharkirian, 1939). V poslední době bylo zjištěno, že bez ohledu na velikost (mikro nebo makro řasy), strukturální uspořádání (jednobuněčné, vláknité, krustózní nebo lupenité), druh řasy (např. Chlorophyta, Rhodophyta a Charophyta, a také Cyanobacteria) nebo zeměpisný původ, řasy obsahují různorodé spektrum lanthanoidů (Hou and Yan, 1998; Fu et al., 2000; Kano et al., 2001; Mashitah et al., 2012). Z těchto analýz je známo, že koncentrace lanthanoidů v mořských řasách mohou být 10 - 20krát vyšší než u suchozemských rostlin (Hou and Yan 1998) a 10 - 20krát vyšší než v mořské vodě (Kano et al., 2001). Celkové množství lanthanoidů v laboratorních podmínkách může snadno dosáhnout 1 – 1,3  $\mu\text{g}$  na gram řasové biomasy, oproti tomu v přírodních podmínkách se celkové množství lanthanoidů pohybuje pouze v rozmezí  $10^{-3}$  –  $10^{-1}$   $\mu\text{g}$  na gram řasové biomasy (Ogata and Terakado, 2006). Klimatické podmínky, působení podzemních vod a vulkanická činnost zvyšuje koncentraci kovů v prostředí (Vásquez and Guerra, 1996). Existují také významné antropogenní zdroje lanthanoidů, především fosforečná minerální

hnojiva, průmyslové odpadní vody a důlní těžba (Goecke et al., 2015). Řasy mohou sloužit jako bioindikátory, díky tomu, že tyto kovy dokáží hromadit ve svých buňkách. Obecně, jak je popsáno ve Valcheva – Traykova et al. (2014), mohou biologické aktivity lanthanoidů souviset s podobností jejich iontových poloměrů a koordinačních čísel s některými základními prvky (např. Ca, Mn, Mg, Fe a Zn). Chemické interakce lanthanoidů s biologicky aktivními molekulami mohou mít za následek změnu enzymatických aktivit, substituci iontů esenciálních kovů nebo polymeraci makromolekul. Jejich chelatace s vazebnými místy iontů proteinů a iontových kanálů může měnit specifickou permeabilitu buněčných membrán, což vede k nedostatku nebo k přebytku iontů v intracelulárních a extracelulárních dutinách (Goecke et al., 2015). Překvapivě, přestože jsou lanthanoidy v čínském zemědělství používány jako hnojiva po desetiletí, jejich účinky na rostliny, zejména řasy, nejsou dostatečně prostudovány.

## **2.4.5 Červený kal (Red mud)**

### **2.4.5.1 Obecný úvod**

Červený kal je silně zásaditý odpadní produkt vznikající při výrobě hliníku Bayerovým zásaditým procesem. Pomocí vodného roztoku hydroxidu sodného se z rozdrčeného bauxitu louhuje hydroxid hlinitý  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , a poté vzniká silně zásaditý kal s koncentrací v rozmezí 10-30 % a pH kolem 13. Kal má typickou červenou barvu díky oxidům železa. Každoročně se vyprodukuje zhruba 77 milionů tun červeného kalu, což způsobuje vážný problém s jeho likvidací (Ayers et al., 2001).

V anglickém jazyce používáme pro červený kal nebo červené bahno název „Red mud“.

### **2.4.5.2 Reziduální skladovací prostory (RSA)**

Metody skladování kalu se během let podstatně změnily. V počátcích bylo běžné čerpat kal v koncentraci kolem 20 % pevných látek do lagun nebo rybníků, které byly někdy vytvořeny v bývalých bauxitových dolech nebo vyčerpaných lomech. V ostatních případech byly vybudovány přehrady s betonovými hrázemi (Evans et al., 2012). Také bylo běžné, že se hlušina vypouštěla do řek, ústí řek nebo do moře pomocí potrubí nebo člunů. V jiných případech byl kal vyvezen do moře a zlikvidován v hlubokých oceánských příkopech mnoho kilometrů od pobřeží. Veškeré vypouštění do řek nebo moří bylo již zastaveno

(Power et al., 2011). Momentálně je nejvíce využívanou metodou filtrace, při níž se vytváří tzv. filtrační koláč (typicky < 30 % pevných látek). Tento koláč lze promýt vodou nebo párou, aby se snížila zásaditost před přepravou a skladováním ve formě polosuchého materiálu. Zbytky upravené do této formy jsou ideální pro opětovné použití, protože mají nižší alkalitu, jejich přeprava je levnější a je snadnější s nimi manipulovat a zpracovávat je (Sutherland, 2005).

#### **2.4.5.3 Ekologické nebezpečí**

Vypouštění červeného kalu je vzhledem k jeho alkalitě nebezpečné pro životní prostředí. V říjnu roku 2010 došlo k protržení hráze odkaliště poblíž města Ajka v Maďarsku a následnému zaplavení několika sídel červeným kalem, včetně vodních toků. Zaplavená oblast se odhaduje na 40 km<sup>2</sup>, kdy z odkaliště uniklo cca 700 tis. m<sup>3</sup> červeného kalu. Silně postiženy byly vesnice Kolontár a město Devescer, katastrofa si vyžádala 10 obětí včetně dětí, mnoho materiálních a ekologických škod (Telegraph, 2010). Kal se dostal do řeky Marcal, která byla kontaminována a tím se stala neslučitelnou se životem. Následně se kal dostal i do Dunaje, kde už díky včasným opatřením nenadělal větší škody (BBC, 2010).

#### **2.4.5.4 Složení červeného kalu**

Vzorek pro výzkum byl odebrán v hloubce 1-1,2 m od povrchu červeného bahna. V této hloubce je červené bahno velmi mokré a připomíná želé. Tyto vlastnosti jsou podobné pro přibližně 70-80 % celého objemu RM. Na povrchové vrstvě je kal silně karbonizovaný na odkrytých místech (konzistence podobná krunýřům). Pod vrstvou půdní konzistence o tloušťce 5-15 cm se nachází suché granulované červené bahno až do hloubky 0,5-0,7 m.

Nejvíce zastoupené složky po extrakci hliníku v červeném kalu jsou nezreagované oxidy kovů. Podíl těchto oxidů závisí na kvalitě bauxitové rudy a podmínkách extrakce. Složení červeného kalu a zastoupení jednotlivých prvků je blíže popsáno v tabulkách č. 3 až 5. (World Aluminium, 2015).

**Tabulka č. 3:** Typické hodnoty pro složení Red Mud (Redmud.org, 2015).

Chemikálie	Procentní složení
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	30-60 %
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10-20 %
SiO <sub>2</sub>	3-50 %
Na <sub>2</sub> O	2-10 %
CaO	2-8 %
TiO <sub>2</sub>	Stopově-25 %

**Tabulka č. 4:** Údaje o kvalitě a homogenitě Red Mud z oblasti *Almásfüzít* (World Aluminium, 2015).

Prvek	Chemické označení	Běžná koncentrace [mg/kg]	Homogenita (jako podíl standartní odchylky na průměrnou hodnotu [%])
Cer	Ce	300-550	28,8
Dysprosium	Dy	20-35	31,3
Erbium	Er	11-18	32,3
Europium	Eu	5-8	32,1
Gadolinium	Gd	20-32	31,4
Gallium	Ga	50-65	26,5
Hafnium	Hf	20-29	29,5
Lanthan	La	140-260	28,6
Niob	Nb	78-120	27,6
Praseodym	Pr	25-49	28,2
Rubidium	Rb	10-85	115,5
Samarium	Sm	26-38	29,7
Skandium	Sc	80-110	17,9
Tantal	Ta	<5	n.a.
Ytterbium	Yb	11-15	31,9
Yttrium	Y	95-140	30,0

**Tabulka č. 5:** Koncentrační rozsah hlavních složek Red Mud (World Aluminium, 2015).

Nerozpustný obsah (ve vodném roztoku)	(%)	9.7	18.4
Fe	[g/kg]	215	275
Ca	[g/kg]	30	65
Mg	[g/kg]	3,5	7
Al	[g/kg]	60	85
Na	[g/kg]	38	60
Ti	[g/kg]	16	24
P	[mg/kg]	19	33
V	[mg/kg]	8	12
Zr	[mg/kg]	0,3	0,7
Mo	[mg/kg]	0,07	0,3

#### 2.4.5.5 Zdůvodnění výběru červeného kalu pro výzkum

Červeného kalu se ročně vyprodukuje zhruba 77 milionů tun, což velmi zatěžuje naše životní prostředí a jeho silná alkalita způsobuje problém s uchováváním. Červený kal obsahuje velké množství vzácných kovů, železa, manganu, titanu a dalších, které jsou velmi potřebné v průmyslu a některé začínají být nedostatkovými. Řasy pěstované s příměsí červeného kalu, mohou tyto kovy akumulovat a díky tomu recyklovat nebo být použity jako hnojivo v zemědělství.

### **3 CÍLE PRÁCE**

- Výběr vhodného modelového organismu pro kultivaci s červeným kalem.
- Kultivace vybraného modelového organismu s červeným kalem, při rozdílné bohatosti živin v médiu.
- Ověření schopnosti modelového organismu akumulovat lanthanoidy z červeného kalu pomocí stanovení množství lanthanoidů v biomase.

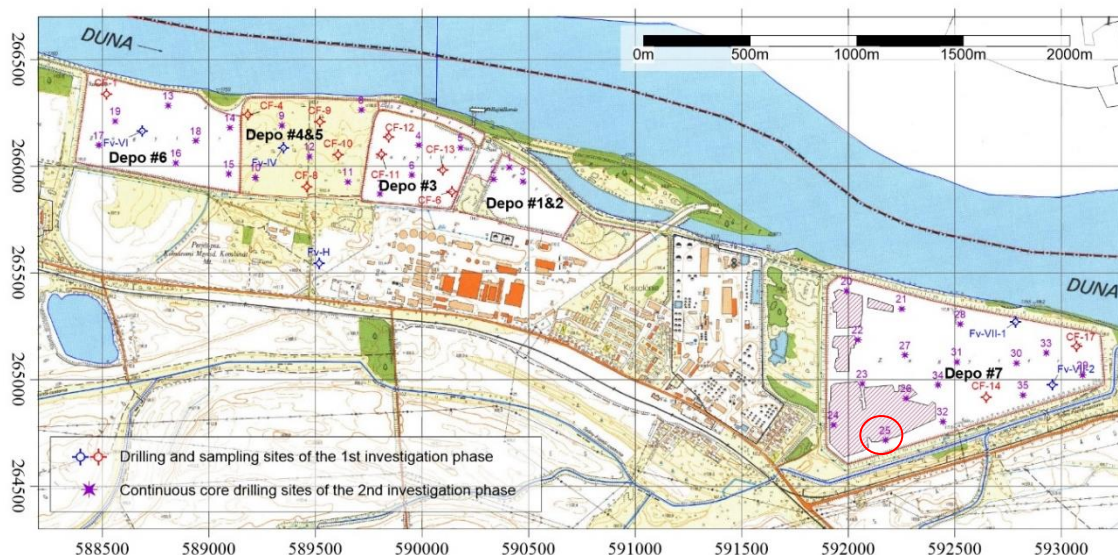
## 4 METODIKA

### 4.1 Odebrání vzorků červeného kalu.

Vzorky byly odebrány pro centrum Algatech (Třeboň, ČR) firmou World Aluminium (Londýn, UK), která má na starost rekultivaci území zasažených červeným kalem.

Červený bahenní vzorek, který nám byl poskytnut, byl získán z úložiště červeného kalu s názvem Depo #7 z místa Almásfüzitő. Souřadnice místa odběru (592155; 264730) jsou blízko místa sonické jádrové vrtání #25 (viz mapa níže – obrázek č. 9).

Vzorek byl odebrán v hloubce 1-1,2 m od povrchu červeného bahna.



**Obrázek č. 9:** Mapa oblastí Almásfüzitő s vyznačenými Depo (World Aluminium, 2015).



**Obrázek č. 10:** Odběr vzorků červeného kalu pro centrum Algatech (World Aluminium, 2015).

## 4.2. Kultivace řas

### 4.2.1 Kultivace

Pro kultivaci každého z našich modelových organismů bylo použito odlišné médium, dle potřeb jednotlivých druhů řas. Pro kultivaci *D. quadricauda* bylo použito živné médium  $\frac{1}{2}$  ŠS (Šetlík – Simmer) a jeho modifikace ( $\frac{1}{4}$  ŠS a  $\frac{1}{2}$  ŠS bez mikroelementů) (Zachleder and Šetlík, 1982). Pro kultivaci *Chlamydomonas reinhardtii* bylo použito HS médium (Sueoka, 1960) a kultury *Parachlorella kessleri* byly kultivovány ve chlorellovém médiu (Brányiková et al., 2011). Složení jednotlivých médií bude popsáno níže v tab. 6 - 9.

Kultury byly kultivovány při konstantní teplotě 30 °C v tekutých živných médiích a byly provzdušňovány stálým přívodem vzduchu obsahujícího 2 % oxidu uhličitého. Do skleněných válečků (fotobioreaktorů, vnitřní průměr 36 mm, výška 500 mm) obsahujících tekuté médium byly naočkovány předem rozrostlé kolonie našich modelových organismů z agarových ploten. Fotobioreaktor byl osvětlován z jedné strany zářivkami (Osram DULUX L, 55W/840) o vlnové délce, která se pohybovala mezi 400 – 720 nm,



což odpovídá hodnotám viditelného světla nezbytného pro fotosyntetické reakce. Intenzita světla byla udržována na  $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Pro získání potřebné hustoty kultur (měřené spektrofotometricky jako optická densita při 750 nm) se inkubační doba pohybovala v rozmezí 2-3 dnů na trvalém světle.

Při kultivaci na Petriho miskách byl do živného média přidán agar. Výsledná koncentrace agaru v roztoku činila 1,5 %. Výsledná směs se sterilizovala v autoklávu při 121 °C po dobu 30 minut a po částečném vychladnutí přibližně na 50 °C rozlévala do misek ve vrstvě silné 0,5 cm.

**Tabulka č 6:** Složení média ½ ŠS.

Sloučeniny	Výsledná koncentrace v médiu
$\text{KNO}_3$	2,021 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,140 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,340 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,988 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,011 g/l
Fe/NaEDTA	0,018 g/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	3,10 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,43 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,20 mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,24 mg/l
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,40 mg/l
$(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,84 mg/l

Pro kultivaci s ¼ ŠS médiem bylo médium ½ ŠS naředěno v poměru 1:1 s destilovanou vodou.

**Tabulka č. 7:** Složení ½ ŠS média bez mikroelementů.

Sloučeniny	Výsledná koncentrace v médiu
KNO <sub>3</sub>	2,021 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,140 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,340 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,988 g/l
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,011 g/l
Fe/NaEDTA	0,018 g/l

**Tabulka č. 8:** Složení HS média.

Číslo roztoku	Složení	Koncentrace v roztoku	Dávkování roztoku na 1 litr média
1	NH <sub>4</sub> Cl CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	50 g/l 2 g/l	10 ml
2	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O EDTA komplex	20 g/l 1,84 g/l	10 ml
3	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,5 g/l	0,5 ml
4	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	3,086 g/l 1,180 g/l 1,404 g/l 1,244 g/l 1,430 g/l 1,840 g/l	1 ml
5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	36 g / 500 ml 67 g / 500ml	10 ml

**Tabulka č. 9:** Složení média Chlorella.

Sloučenina	Výsledná koncentrace v médiu
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}$	1,100 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,237 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,204 g/l
$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_8\text{N}_2\text{NaFe}$	0,040 g/l
$\text{CaCl}_2$	0,088 g/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,083 g/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,95 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3,3 mg/l
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,17 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,7 mg/l
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,6 mg/l
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	0,014 mg/l

#### 4.2.2 Kultivace řas s přidavkem červeného kalu

Pro zjištění vlivu červeného kalu na jednotlivé modelové organismy bylo zapotřebí přidat určité množství kalu přímo do růstových médií.

Byl připraven zásobní roztok rozmícháním červeného kalu s destilovanou vodou na hmotnostní koncentraci 10 %. Následně byl tento roztok přidán v určitých koncentracích k našim kulturám. Podrobný výčet těchto koncentrací viz tab. č. 10.

**Tabulka č. 10:** Výčet koncentrací červeného kalu pro přidání k médiím.

Ředění z 10 % roztoku	Výsledná koncentrace	Objem přidáný do válečku s 240 ml média
100x	0,1 %	2,4 ml
200x	0,05 %	1,2 ml
333x	0,03 %	0,72 ml

### 4.3 Měření pH a optické density

Měření pH probíhalo vždy při odebrání vzorků kultur za pomoci pH metru od společnosti Thermo Scientific™ model Orion™ Versa Star Pro™ pH Benchtop meter. Naměřená data byla zapsána a následně zpracována do grafů uvedených v kapitole 5.

Měření optické density (OD) bylo prováděno několikrát denně spolu s měřením pH. Stanovení optické density bylo provedeno spektrofotometricky (Specol, Německo) při světelné délce 750 nm ve skleněné kyvetě o průměru 0,5 cm. Naměřená data byla zapsána a zpracována do grafů uvedených v kapitole 5.

## **4.4 Mikroskopie**

Pro sledování kondice řas a průběhu buněčného cyklu byla prováděna kontrola vzorků za pomoci fluorescenčního mikroskopu Olympus BX51.

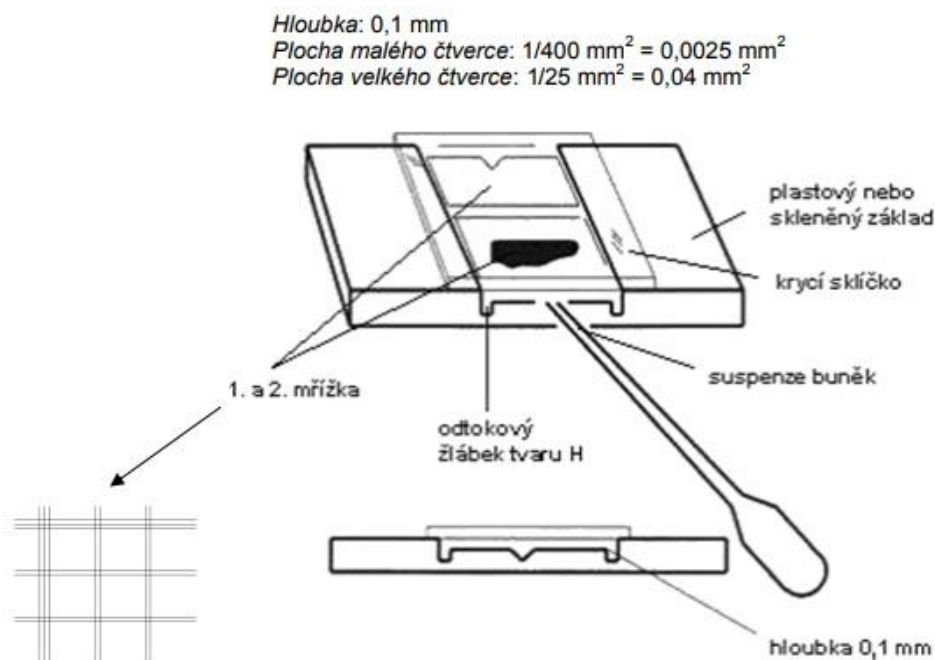
### **4.4.1 Barvení lipidů pomocí barvy Nile Red**

Pro kontrolu lipidových kapének jsme použili metodu fluorescenčního barvení za použití fluorescenční barvy Nile Red (9-dimethylamino-5H-benz{a}phenoxazine-5-on). Vzorek byl připraven z 10  $\mu$ l řasové kultury a 0,5  $\mu$ l barvy Nile Red a následně pozorován ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX51 pomocí bloku filtrů U-MNUA (excitace 360-370 nm, emise 420-460 nm).

### **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 (viz obr. č. 11) (is.muni.cz, 2015).

Do komůrky bylo nanášeno 10  $\mu$ l vzorku a vloženo do mikroskopu. Buňky byly počítány v jednotlivých čtvercích po diagonálách v celkovém počtu 24. Počet buněk v 1 ml byl vypočítán pomocí vzorce:  $n \cdot \frac{1}{4} \cdot 10^6$ , přičemž n je průměrný počet buněk na 1 čtverec. Výsledky byly poté vyneseny do grafů viz kapitola 5.



**Obrázek č. 11:** Zobrazení Bürkerovy komůrky s detailem počítací mřížky (okraje jsou tvořeny třemi čarami, aby byl zřetelný konec mřížky) (is.muni.cz, 2015).

## 4.5. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

### (ICP – MS)

Zkratka ICP – MS pochází z anglického názvu Inductively coupled plasma-mass spektrometry, jelikož je tato metoda známa pod touto zkratkou, budu ji využívat dále v textu.

#### 4.5.1 Příprava vzorků pro ICP – MS

Řasová kultura byla stočena v centrifuze (ROTINA 380R, HETTICH) 5 min na 4750 otáček/min, zmrazena na  $-80^\circ\text{C}$  a lyofilizována.

Vzorky řasové biomasy (0,1 g) byly štěpeny se 3 ml 67 %  $\text{HNO}_3$  a 0,5 ml 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  v PTFE nádobě v mikrovlnné troubě MLS1200 MEGA při 250 – 600 W po dobu 20 minut. Po odpaření přebytku kyseliny byl výsledný roztok převeden do odměrné baňky, která byla doplněna 0,67 %  $\text{HNO}_3$  (Vítová et al., 2011).

#### **4.5.2 Elementární analýza vzorků (ICP – MS)**

Měření pomocí ICP – MS bylo provedeno 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 pro celkové stanovení kovů obsahoval Ge, In a Re (10 µg/ L) ve zředěné (1:100) HNO<sub>3</sub>. Pro přípravu všech vzorků byla použita destilovaná a demineralizovaná voda. Vzorky byly přefiltrovány přes 0,45 ml filtr a zředěny 1:10 s vodou. Naměřené hodnoty byly vyjádřeny v miligramech na kilogram destilované vody. Referenční vzorky (kontroly) prošly všemi kroky stejně jako ostatní vzorky. Pro přesnost výsledků a kontrolu přístrojů byly použity při měření standardy. Aby se dosáhlo odpovídající koncentrace referenčních vzorků, byly vzorky vždy zředěny.

#### **4.6 Analýza lipidů**

Tato analýza byla provedena na MBÚ AVČR v Praze týmem RNDr. Tomáše Řezanky, CSc.

Pro analýzu lipidů byly zmražené vzorky lyofilizovány a zváženy. Analýza metylesteru mastných kyselin (FAMES) byla provedena na systému plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS) na sestavě přístrojů Varian 450-GC (Varian BV, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), Varian 240-MS iontový detektor s elektronovým nárazovým ionizátorem (EI) a autosamplerem CombiPal (Mitchell Drive Walnut Creek, CA, USA). Mastné kyseliny byly identifikovány podle jejich hmotnostních spekter a pomocí směsi chemických standardů získaných od společnosti Sigma-Aldrich (Goecke et al. 2017).

#### **4.7. Test lipofilního charakteru červeného kalu**

Pro zodpovězení otázky, zda je červený kal lipofilní, byl udělán test s řepkovým olejem, který je nejbližší podobný lipidům vytvářeným řasami. Do Erlenmeyerových baněk s 50 ml ½ ŠS média bez mikroelementů bylo přidáno 250 µl červeného kalu tak, aby koncentrace kalu odpovídala 0,05 %. Poté byl přidán do jednotlivých baněk řepkový olej o objemech 40 µl, 30 µl, 20 µl, 10 µl a 5 µl. Baňky byly třepány na třepačce na 150 rpm při 30°C 24 hodin.

## 5 VÝSLEDKY

Cílem pokusů byl výběr a následné využití vhodného modelového mikroorganismu pro kultivace s červeným kalem, obsahujícím velké množství lanthanoidů, za účelem jejich recyklace. Nejprve bylo potřeba vybrat modelový organismus, který by dobře rostl i v přítomnosti toxického červeného kalu. Proto proběhl pokus se třemi výše popsány modelovými organismy, ke kterým byly přidány tři různé koncentrace červeného kalu. Pro dostatečnou průkaznost byl tento pokus proveden ve třech opakováních. Dále proběhla série pokusů s vybraným modelovým organismem, kdy koncentrace červeného kalu byly stejné, ale experimentovalo se s obsahem živin v médiu. Tato série měla dokázat, že modelový organismus je schopen akumulovat živiny z červeného kalu. Vzorke z obou pokusů byly poslány do Státního zdravotního ústavu v Praze na analýzu obsahu lanthanoidů v řasách pomocí metody ICP-MS.

### 5.1 Výběr vhodného modelového organismu pro kultivaci

#### s červeným kalem

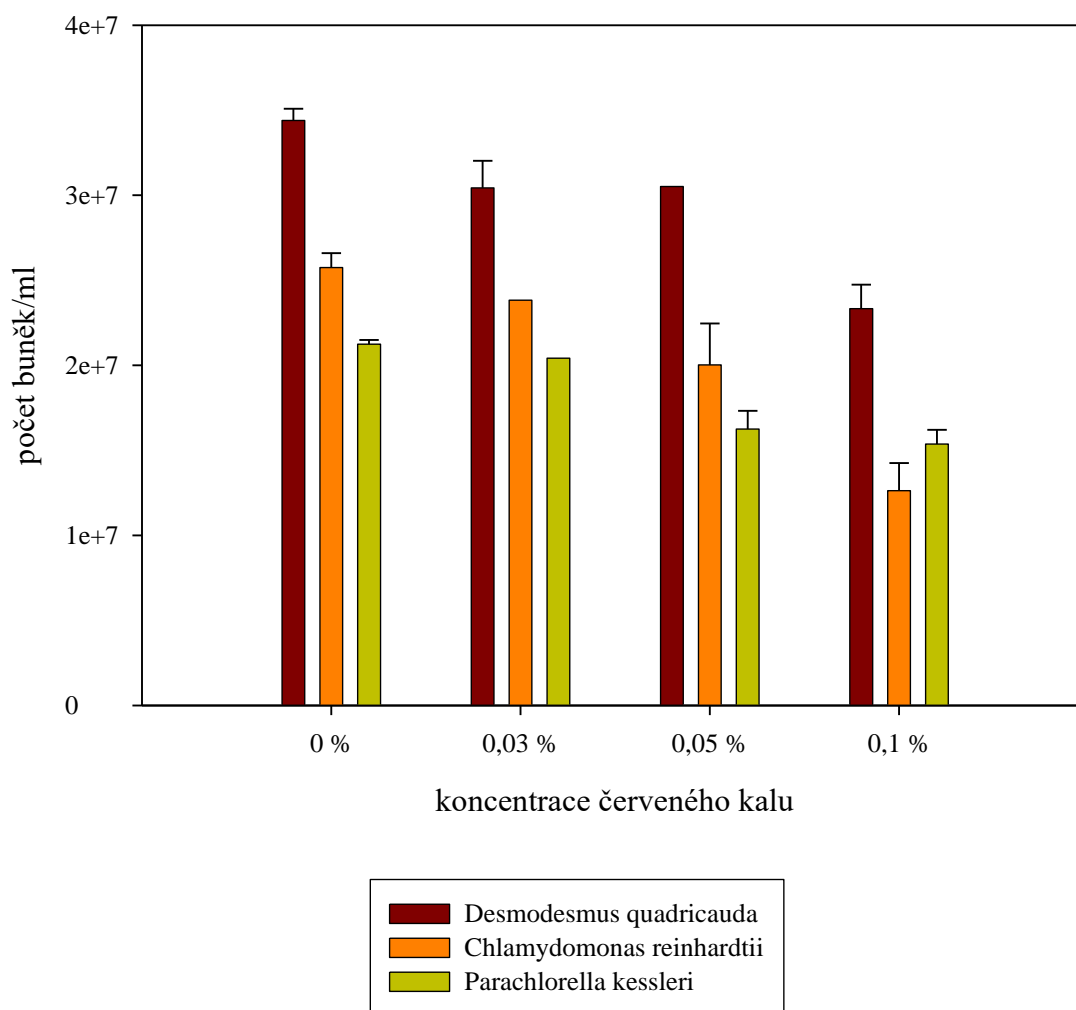
Nejprve byl proveden výběr koncentrací červeného kalu. Bylo zjištěno, že koncentrace nad 0,1 % zabraňují efektivnímu růstu řas, kvůli velké limitaci světlem. Drobné částice kalu rozptýlené v médiu zabraňovaly přístupu světla k buňkám. Na základě tohoto zjištění byly použity koncentrace 0,1 %, 0,05 % a 0,03 %. V každé sérii pokusů byla kultivována kontrola s označením K, ke které nebyl přidán žádný kal.

Každý z modelových organismů byl kultivován v tekutém médiu vhodném pro daný organismus. Tato média jsou blíže popsána v kapitole 4.2.1. Růst řas s červeným kalem byl testován ve válečkách s médii, do kterých byly na začátku přidány vodné suspenze kalu o koncentracích 0,1 %, 0,05 %, 0,03 % a 0 %. Koncentrace 0 % sloužila jako kontrola (viz obr. č. 12). Odběry vzorků probíhaly v 8 hod ráno a ve 13 hod odpoledne po dobu 48 hodin cyklu. Vždy proběhlo počítání buněk za pomoci mikroskopie. Pro kontrolu správného růstu bylo měřeno pH.

Naměřená data z počítání buněk za pomoci mikroskopie, měření pH byla zpracována v programu SigmaPlot 8.0.

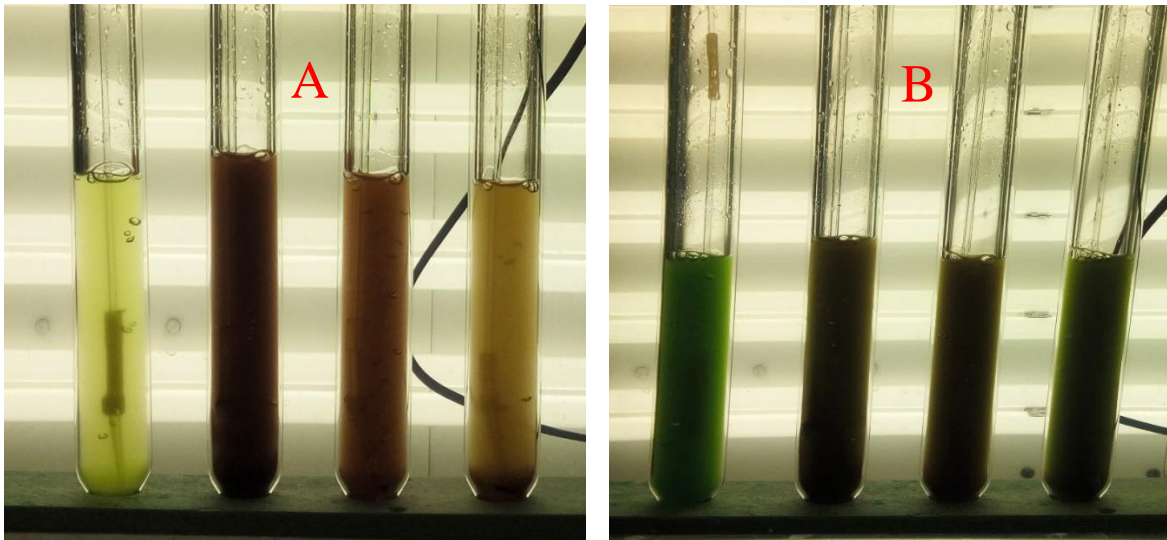
Na základě pokusu se ukázalo, že řasa *Desmodesmus quadricauda* roste lépe než zbylé dva organismy a to i s nejvyšší koncentrací kalu (0,1 %). Zajímavý byl velký propad růstu buněk řasy *Chlamydomonas reinhardtii* u nejvyšší koncentrace (0,1 %) (viz graf č. 1)

### Vliv červeného kalu na růst modelových organismů



**Graf č. 1:** Sloupcový graf porovnávající počet buněk v 1 ml kultury při různé koncentraci červeného kalu pro jednotlivé modelové organismy. Data byla získána z průměru tří replikátů stejných kultur kultivovaných po dobu 48 hod cyklu. Kontrola je zde označena jako 0 %. Nejlépe rostla kultura řasy *D. quadricauda* a to při všech koncentracích červeného kalu.

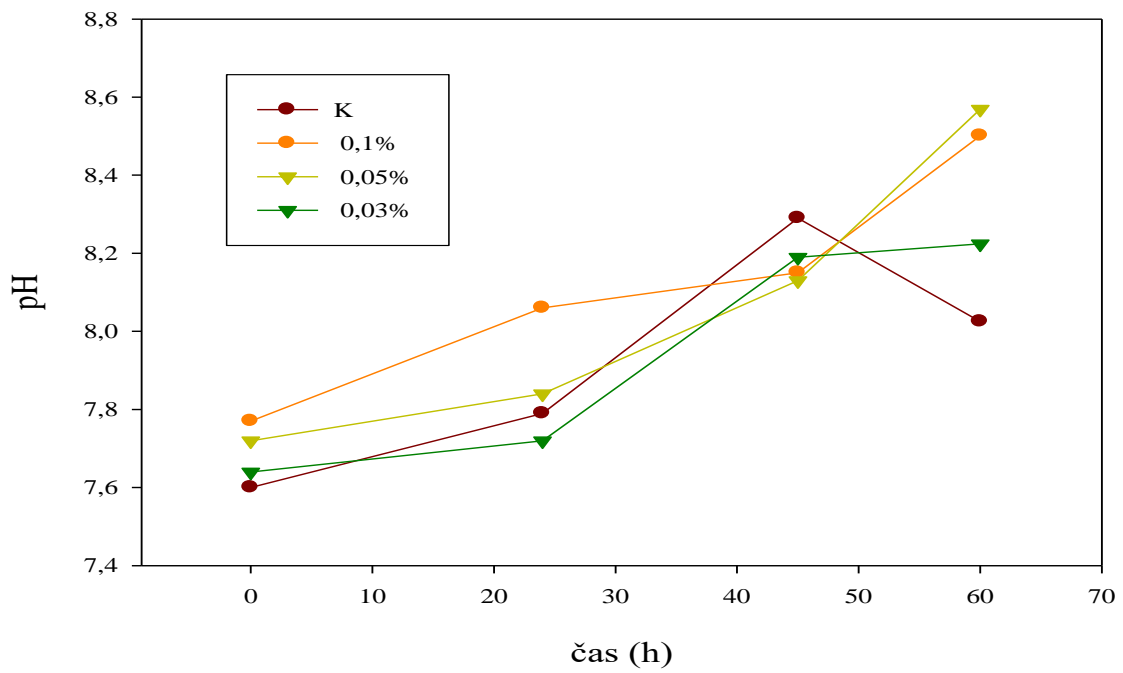




**Obrázek č. 12:** Kultivace řas ve fotobioreaktorech s přidavkem červeného kalu. Na obrázku A vidíme začátek experimentu. Na obrázku B vidíme řasy po 36 hodinách kultivace. Válečky jsou v obou příkladech seřazeny podle koncentrace kalu následovně: 0 % (K), 0,1 %, 0,05 % a 0,03 %.

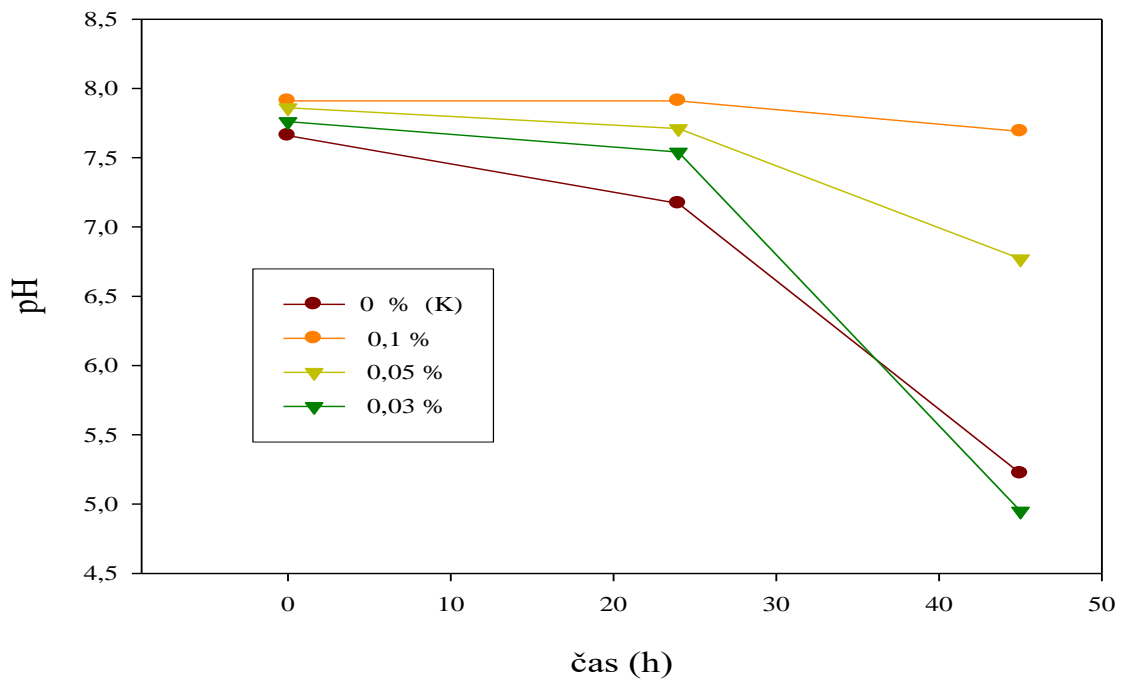
Grafy č. 2-5 zobrazují výsledky měření pH u jednotlivých modelových organismů a také porovnání jejich kontrolních kultur. U řas *D. quadricauda* a *P. kessleri* (graf č. 2 a 4) se pH v průběhu cyklu zvyšovalo. Na rozdíl u řasy *C. reinhardtii* kde se pH v průběhu cyklu snižovalo.

### Desmodesmus quadricauda



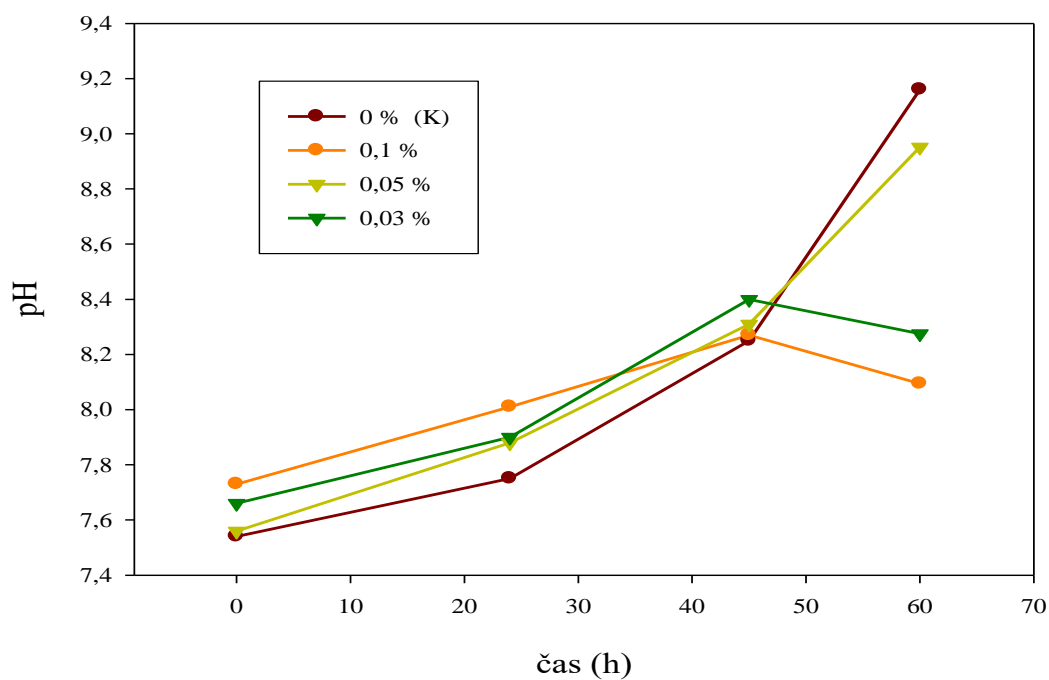
Graf č. 2: Kontrolní měření pH pro řasu *Desmodesmus quadricauda*.

### Chlamydomonas reinhardtii



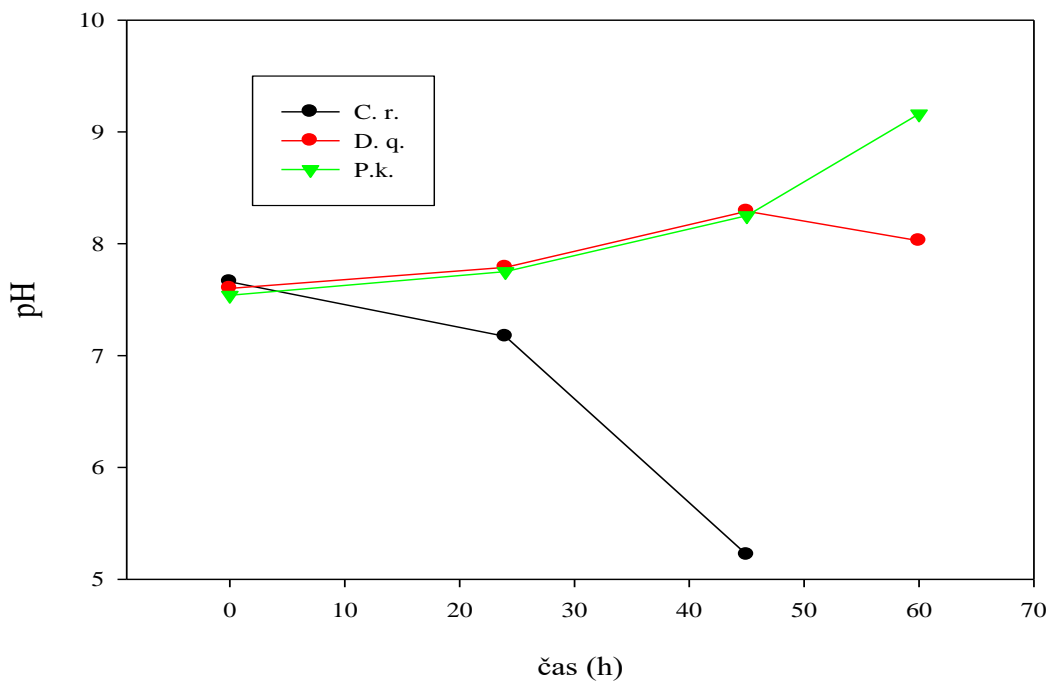
Graf č. 3: Kontrolní měření pH pro řasu *Chlamydomonas reinhardtii*.

### Parachlorella kessleri



Graf č. 4: Kontrolní měření pH pro řasu *Parachlorella kessleri*.

### pH kontrolních vzorků řas



Graf č. 5: Naměřené hodnoty pH pro kontroly všech modelových organismů.

## 5.2 Kultivace vybraného modelového organismu s červeným

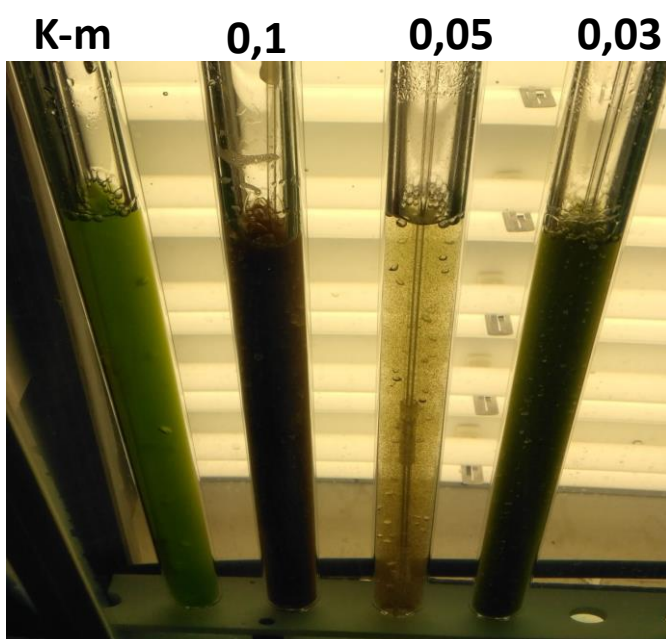
### kalem při rozdílné bohatosti živin v médiu

Vzhledem k tomu, že se řasa *Desmodesmus quadricauda* nejlépe osvědčila pro růst v přítomnosti červeného kalu, byla vybrána pro další fázi pokusů. Tyto pokusy měly za úkol objasnit, zda je řasa schopna akumulovat živiny z červeného kalu, pokud bude mít snížený obsah živin v médiu.

#### 5.2.1 Kultivace řasy *D. quadricauda* na ½ ŠS médiu bez mikroelementů

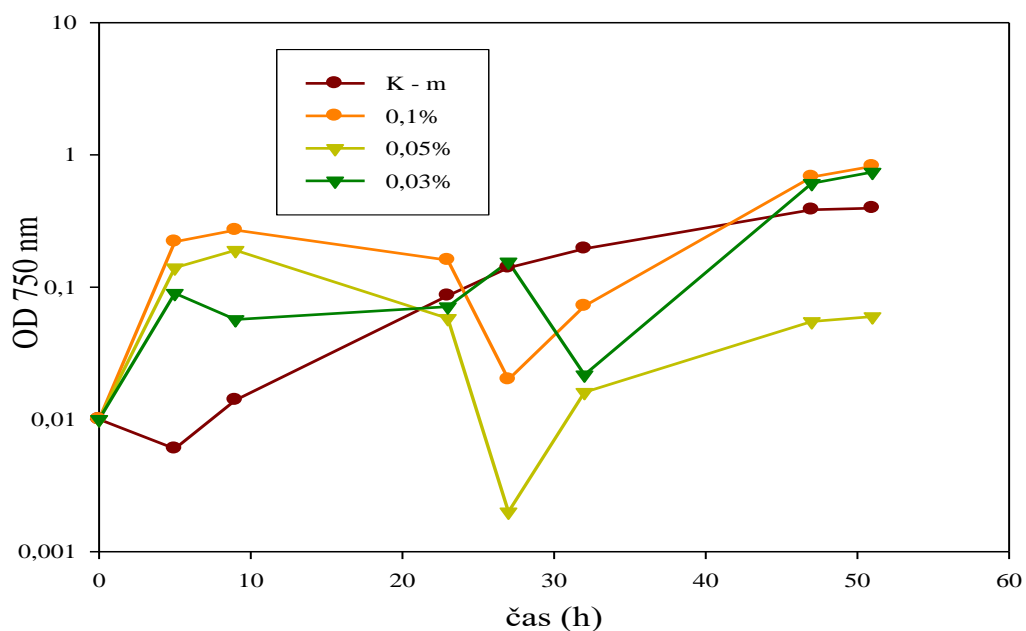
První z médií, které bylo vybráno pro další pokus, bylo médium ½ ŠS bez mikroelementů blíže popsané v tabulce č. 7 v kapitole 4.2.1. Růst řas s různými koncentracemi červeného kalu byl testován ve válečcích s modifikovaným médiem, do kterého byly na začátku přidány vodné suspenze kalu o koncentracích 0,1 %, 0,05 %, 0,03 %. Spolu s těmito různými koncentracemi červeného kalu byly kultivovány kontroly. Negativní kontrola obsahovala ½ ŠS médium bez mikroelementů (K-m) (viz obr. č. 13). V dalším pokusu byla přidána i pozitivní kontrola, která obsahovala standartní ½ ŠS médium (K+m).

Získaná data z počítání buněk za pomoci mikroskopie a měření OD byla zpracována v programu SigmaPlot 8.0.

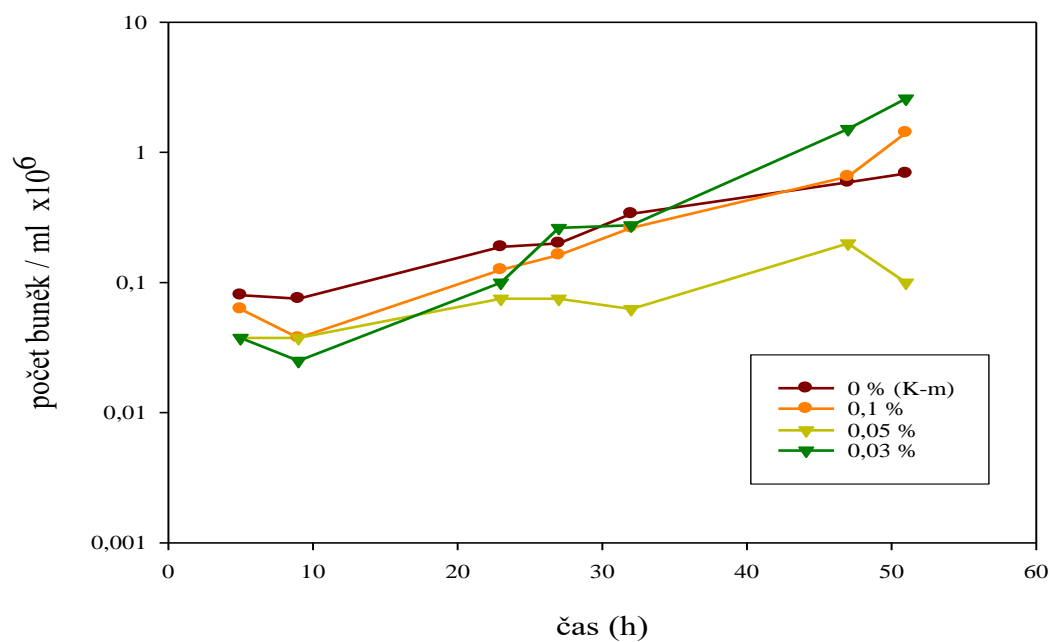


**Obrázek č. 13:** Kultivace řas ve fotobioreaktorech po 48 hodinách cyklu. Ve vzorku s koncentrací 0,05 % je patrná zrnitost sraženého červeného kalu.

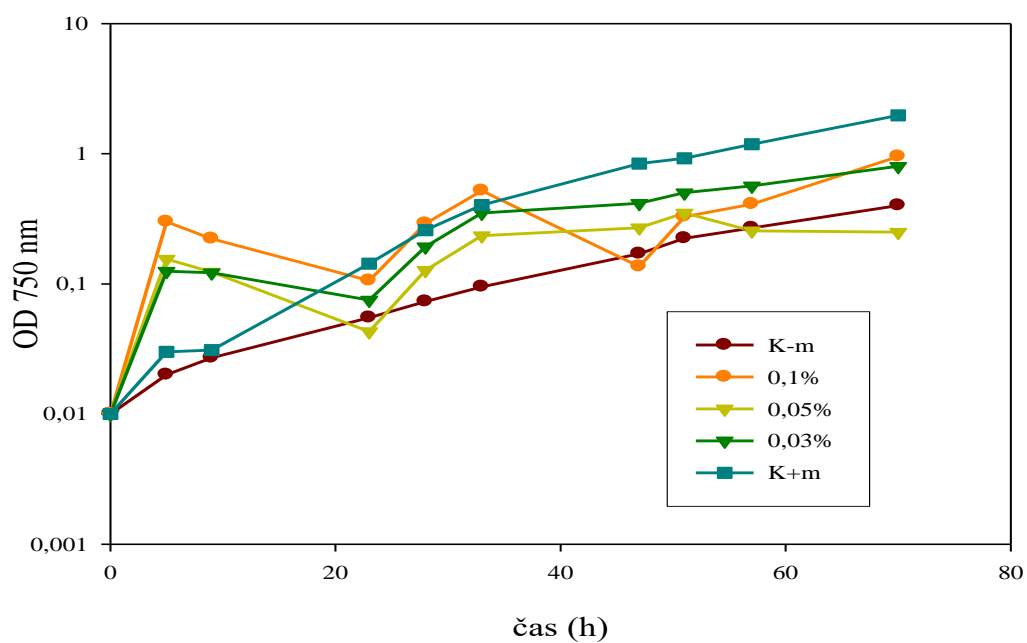
Z růstových křivek a naměřených dat OD můžeme potvrdit, že vzorky s červeným kalem o koncentraci 0,1 % a 0,03 % rostou lépe než negativní kontrola bez mikroelementů (K-m) (viz graf č. 6 a 7), ale hůře než pozitivní kontrola (viz graf č. 8 a 9).



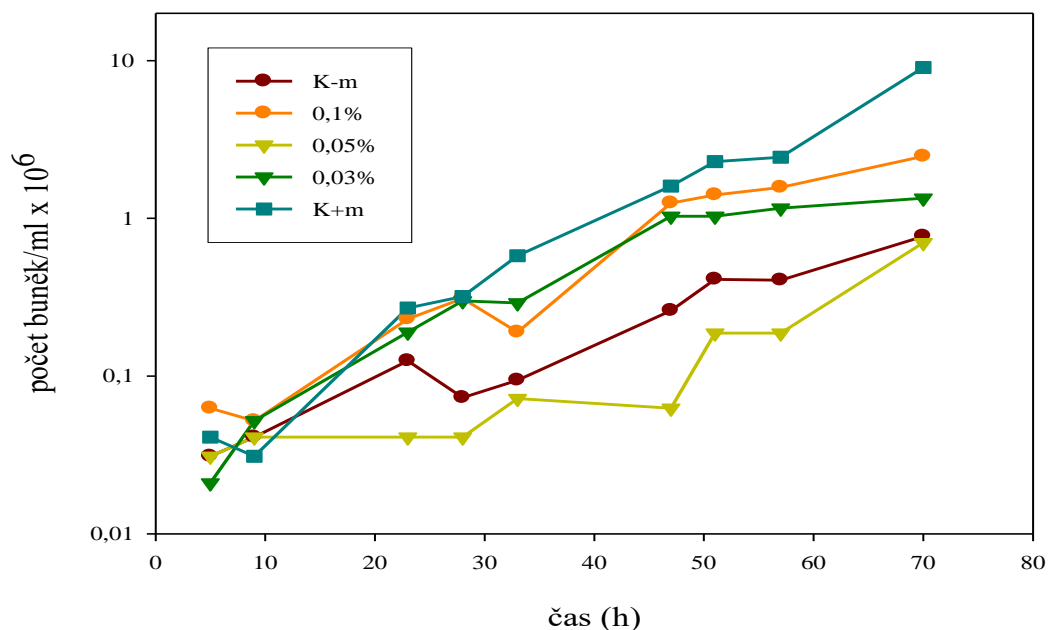
**Graf č. 6:** Optická densita při 750 nm v závislosti na čase s ½ ŠS médiem bez mikroelementů.



**Graf č. 7:** Růstové křivky jednotlivých kultur řas v závislosti na čase s ½ ŠS médiem bez mikroelementů.

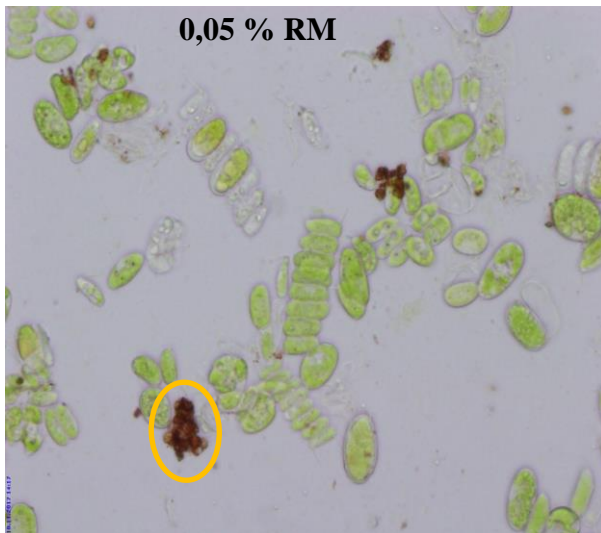


**Graf č. 8:** Optická densita při 750 nm v závislosti na čase s ½ ŠS médiem bez mikroelementů s pozitivní kontrolou.

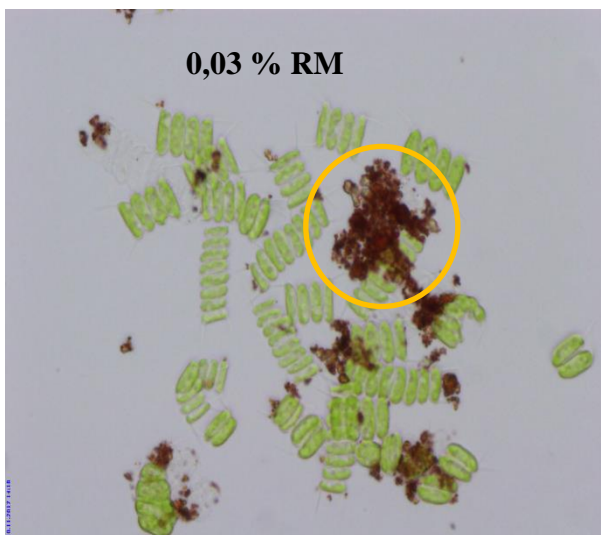


**Graf č. 9:** Růstové křivky jednotlivých kultur řas v závislosti na čase s 1/2 ŠS médiem bez mikroelementů s pozitivní kontrolou.

Pro kontrolu stavu buněk a růstu byly vždy po odběrech vzorky kontrolovány pod mikroskopem. V koncentracích 0,05 % a 0,03 % a negativní kontrole (K-m) byly nalezeny zvláštní struktury uvnitř buněk a sraženiny kalu (viz obr. č. 14 a 15). Proto byly tyto buňky obarveny fluorescenční barvou Nile Red a pozorovány za pomoci fluorescenčního mikroskopu. Obarvení vzorků prokázalo přítomnost lipidových tělísek (viz obr. č. 16), tyto vzorky byly poslány na analýzu ICP-MS a analýzu lipidů, blíže popsány budou níže.

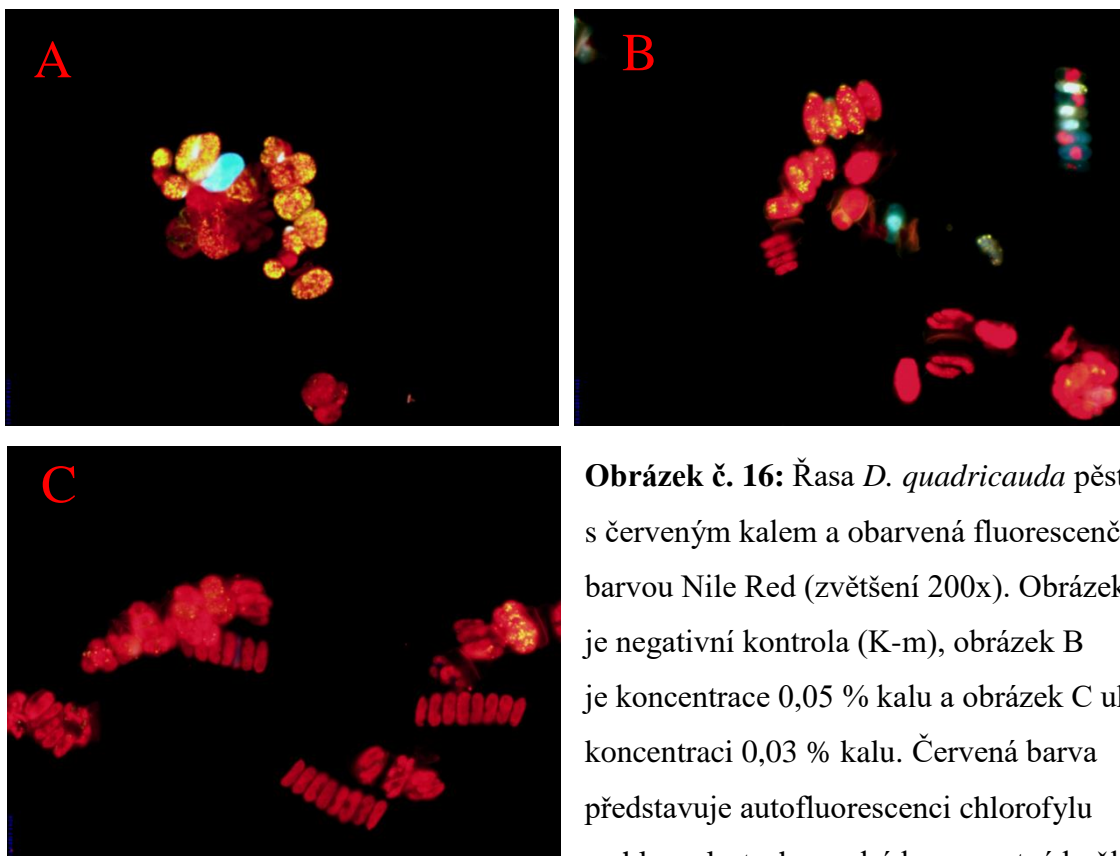


**Obrázek č. 14:** Fotografie ze světelného mikroskopu, kde můžeme vidět sražený červený kal (označeno oranžovým kroužkem) a řasy *D. quadricauda* (zvětšení 200x) při koncentraci 0,05 % RM. Na detailní fotografii vpravo jsou viditelná lipidová tělíska (zvětšení 400x).



**Obrázek č. 15:** Fotografie ze světelného mikroskopu, kde můžeme vidět sražený červený kal (označeno oranžovým kroužkem) a řasy *D. quadricauda* (zvětšení 200x) při koncentraci 0,03 % RM.





**Obrázek č. 16:** Řasa *D. quadricauda* pěstovaná s červeným kalem a obarvená fluorescenční barvou Nile Red (zvětšení 200x). Obrázek A je negativní kontrola (K-m), obrázek B je koncentrace 0,05 % kalu a obrázek C ukazuje koncentraci 0,03 % kalu. Červená barva představuje autofluorescenci chlorofylu v chloroplastech, modrá barva mrtvé buňky a žlutě jsou obarvené lipidy.

Kontrolní kultury *D. quadricauda* pěstované na médiu bez mikroelementů byly sklizeny, lyofilizovány a zaslány na analýzu obsahu lipidů pomocí na MBÚ AVČR v Praze. Byla prokázána přítomnost neutrálních lipidů v celkovém množství 16,5 % a 18,0 % sušiny (viz tab. č. 11).

**Tabulka č. 11:** Procentuální obsah lipidů z celkové sušiny kontrolních kultur řasy *D. quadricauda* pěstované na médiu ½ ŠS bez mikroelementů.

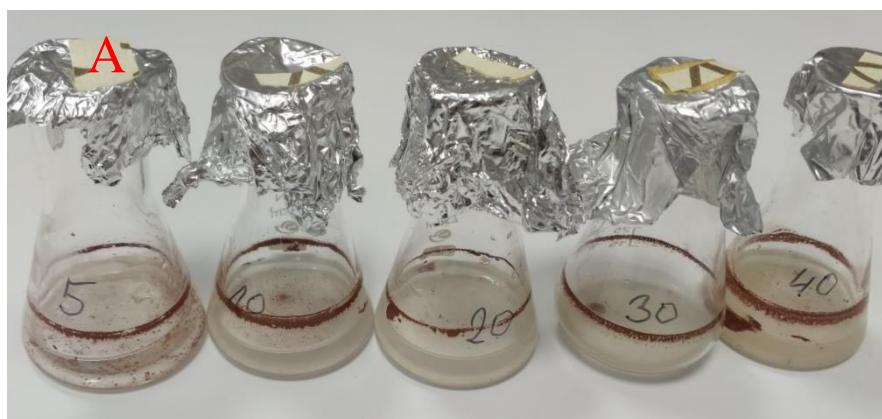
vzorek	navážka (g)	vialka (g)	vialka + lip. (g)	lipidy (g)	procenta sušiny
D. q.					
10.11.17	0,02190	10,29328	10,29722	0,00394	18,0
16.11.17	0,02505	10,23128	10,23541	0,00413	16,5

**Tabulka č. 12:** Zastoupení jednotlivých mastných kyselin v procentech.

<b>Lipid</b>	<b>10.11.17</b>	<b>16.11.17</b>
i14:0	0,0	0,1
a15:0	0,0	0,1
n15:0	0,1	0,1
16:4w6	18,3	15,8
16:4w3	3,6	2,3
16:1w9	0,2	0,5
16:1w7	0,2	0,3
16:1w3	0,9	0,0
n16:0	20,2	22,1
a17:0	0,0	0,0
n17:0	0,0	0,1
18:3w6	0,9	1,0
18:3w3	2,9	2,7
18:2w9	7,8	10,8
18:1w9	44,9	44,0
18:1w7	0,0	0,1

Analýza lipidů prokázala přítomnost a určila druhové zastoupení vytvořených lipidů (viz tab. č. 12). Nejvíce zastoupena byla kyselina olejová, která je v tabulce č. 12 označena červeně. Analýza neprokázala přítomnost mastných kyselin zajímavých pro biotechnologické účely.

Pro zodpovězení otázky, proč došlo v kultuře s 0,05 % koncentrací červeného kalu k jeho vysrážení, byl proveden s danou koncentrací kalu test s řepkovým olejem, který je svým složením velmi podobný oleji zjištěnému v *D. quadricauda*. Došlo k vysrážení červeného kalu (viz obr. č. 17), z čehož vyplývá, že červený kal má lipofilní charakter. Takže vysrážení bylo pravděpodobně důsledkem, a ne příčinou tvorby lipidů.



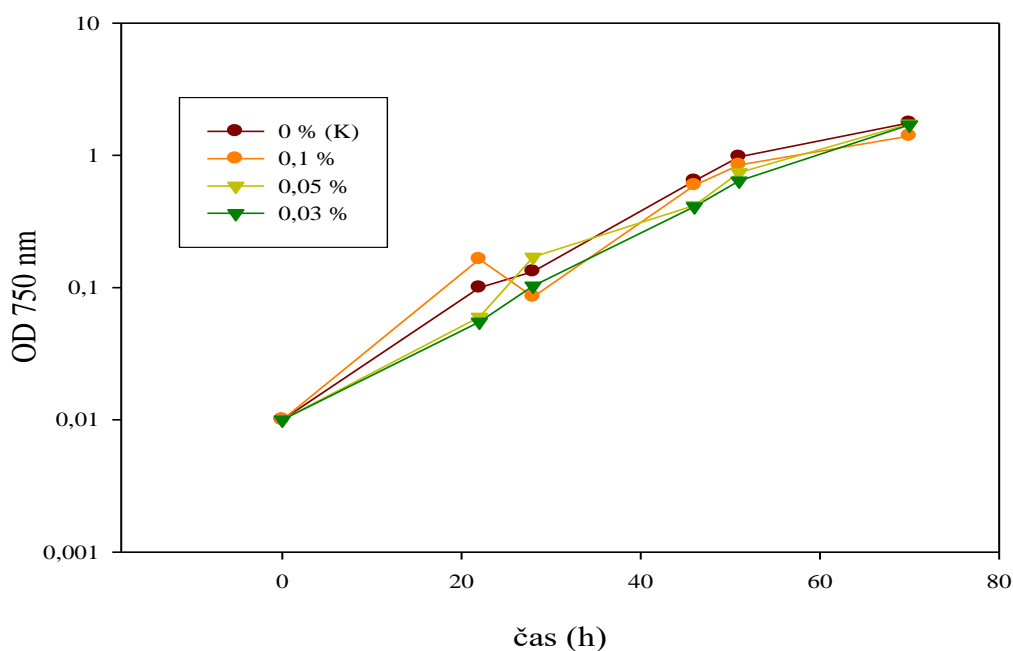
**Obrázek č. 17:** Na obrázku A jsou vzorky vysráženého červeného kalu o koncentraci 0,05 % v emulzích vody a oleje s různou koncentrací oleje. Na obrázku B je detail vysráženého kalu v emulzi.

### 5.2.1 Kultivace řasy *D. quadricauda* v ¼ ŠS médiu.

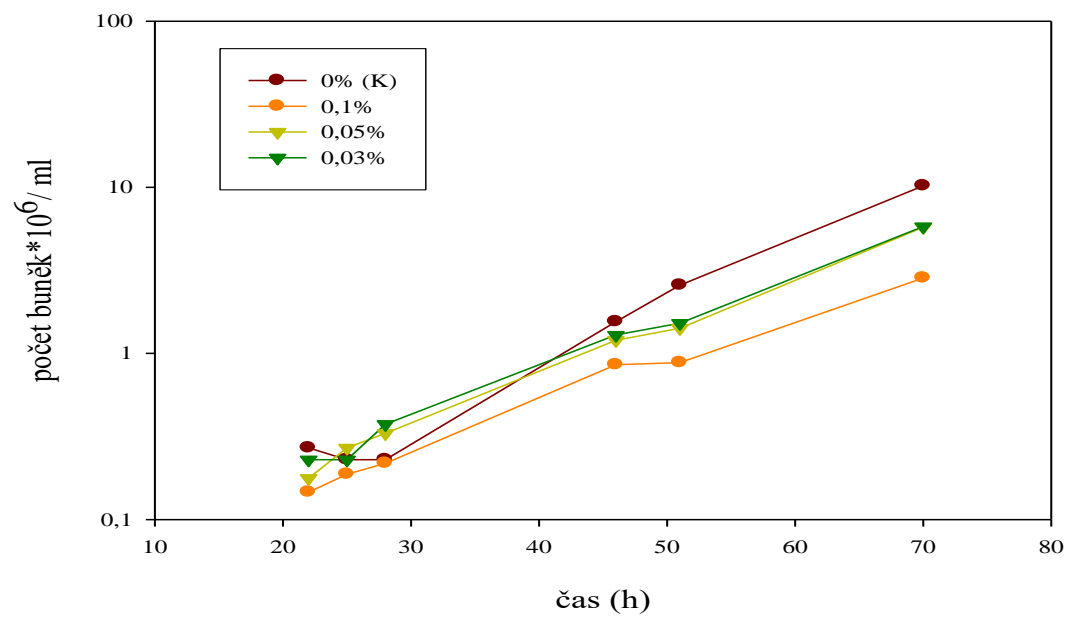
Jako druhé médium bylo použito pro další pokus médium s názvem ¼ ŠS. Toto médium bylo připraveno zředěním standartního ½ ŠS média v poměru 1:1 s destilovanou vodou. Růst řas s různými koncentracemi červeného kalu jsme testovali ve válečkách s modifikovaným médiem, do kterého byly na začátku přidány vodné suspenze kalu o koncentracích 0,1 %, 0,05 % a 0,03 %. Spolu s těmito různými koncentracemi červeného kalu byla kultivována kontrola, která obsahovala pouze ¼ ŠS médium bez přídavku červeného kalu.

Získaná data z počítání buněk za pomoci mikroskopie a měření OD byla zpracována v programu SigmaPlot 8.0.

Růst řasy *D. quadricauda* v ¼ ŠS médiu byl srovnatelný s růstem této řasy v ½ ŠS médiu bez mikroelementů (viz graf č. 9). Rozdíl mezi těmito médii se projevil při 0,1 % koncentraci kalu v ¼ ŠS médiu. Tato kombinace červeného kalu a ¼ ŠS média, které je oproti ½ ŠS médiu bez mikroelementů ochuzené o makroelementy, je již příliš toxická (viz graf č. 10 a 11).



**Graf č. 10:** Optická densita při 750 nm v závislosti na čase s ¼ ŠS médiem.

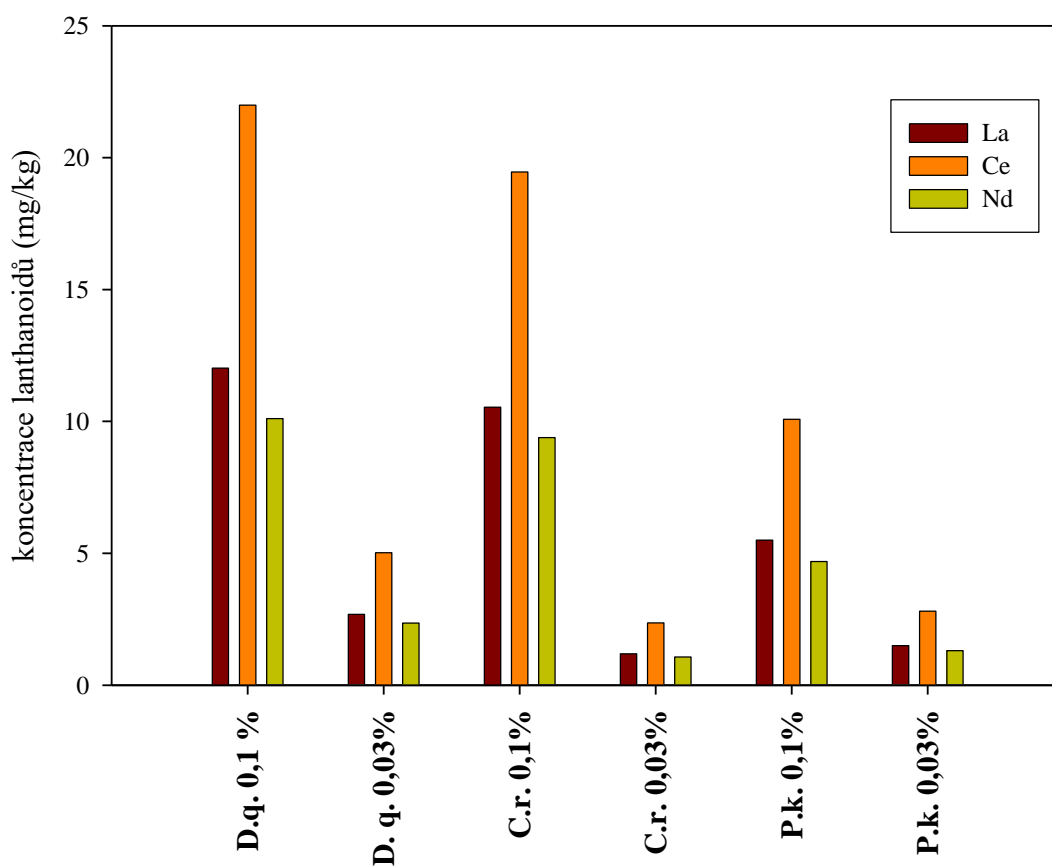


**Graf č. 11:** Růstové křivky jednotlivých kultur řas v závislosti na čase s ¼ ŠS médiem.

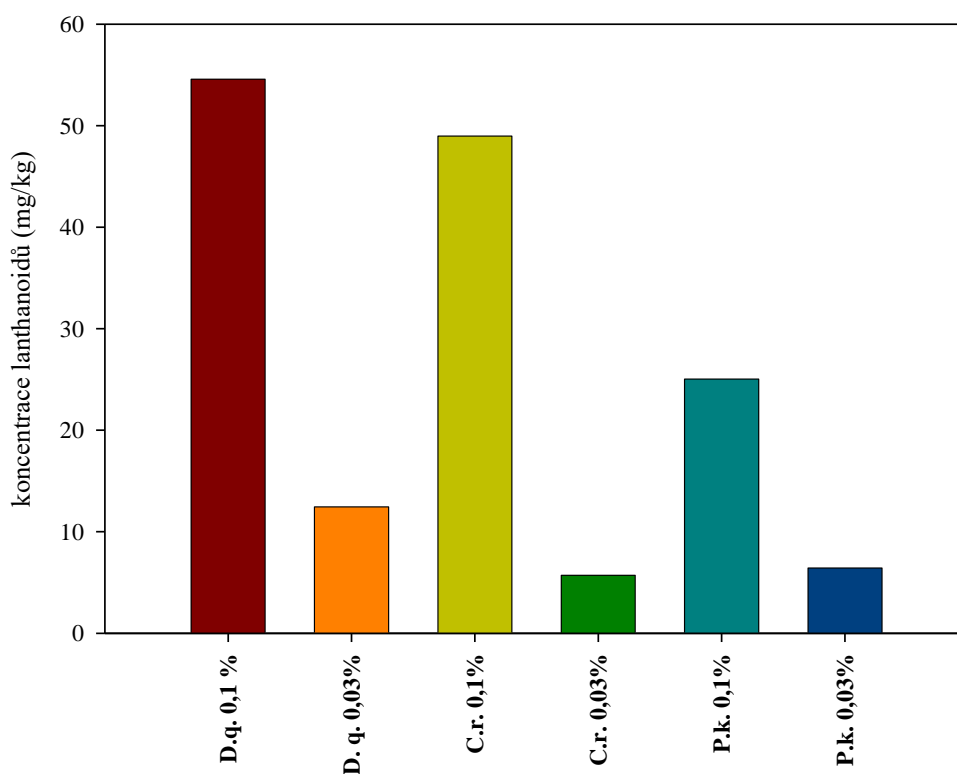
### 5.3 Měření obsahu lanthanoidů v biomase

Pro změření obsahu lanthanoidů v biomase byly lyofilizované vzorky zaslány do Státního zdravotního ústavu v Praze týmu RNDr. Mariána Ruckého, Ph.D. na analýzu ICP-MS. Přijatá data z analýzy ICP-MS byla zpracována do grafů v programu SigmaPlot 8.0.

Řasa *D. quadricauda* s koncentrací kalu 0,1 % akumulovala největší množství lanthanoidů. Akumulace lanthanoidů řasami byla koncentračně závislá na množství dostupných lanthanoidů a byla také druhově závislá. Akumulace lanthanoidů tedy souvisí jak s druhem řasy, tak i s množstvím jednotlivých lanthanoidů v médiu (viz graf č. 12 a 13).



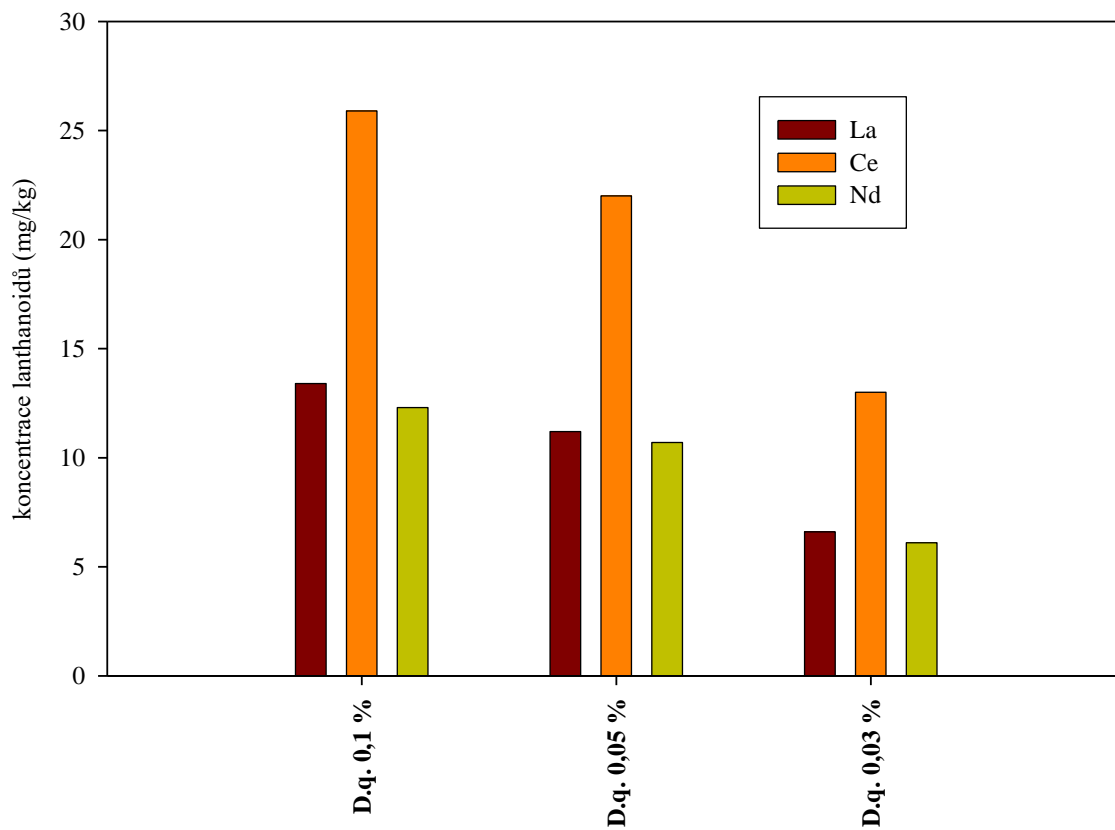
**Graf č. 12:** Množství tří nejvíce akumulovaných lanthanoidů v biomase jednotlivých modelových organismů s různými koncentracemi červeného kalu stanovené pomocí ICP-MS.



**Graf č. 13:** Celkové množství akumulovaných lanthanoidů v modelových organismech s různými koncentracemi červeného kalu stanovené pomocí ICP-MS.

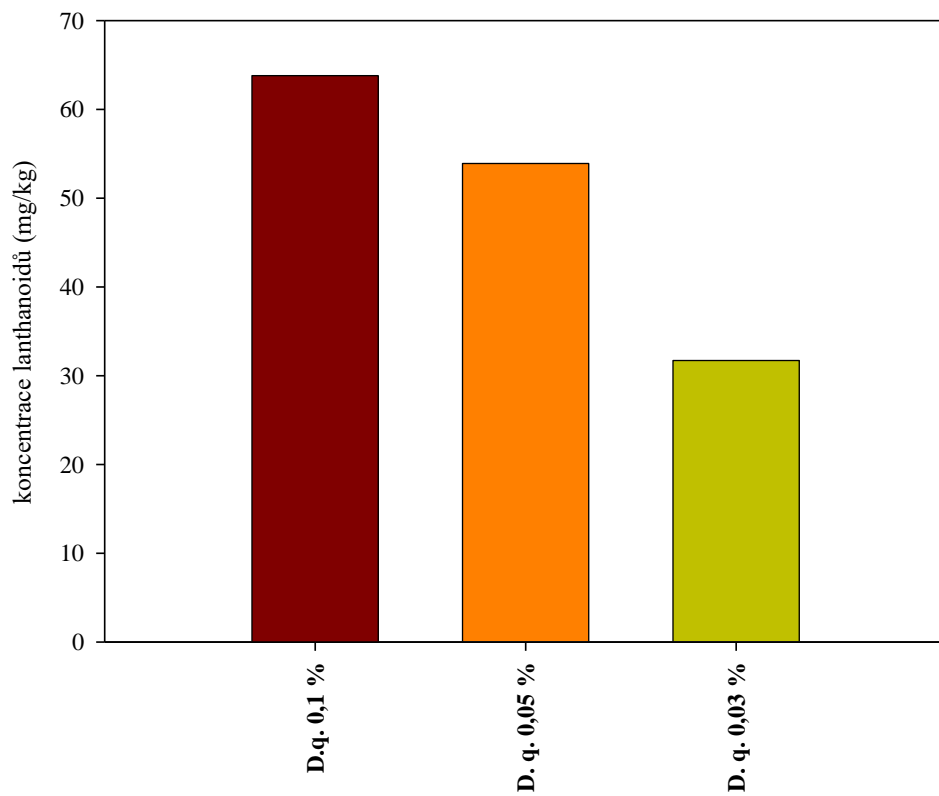
Dalším krokem byla kultivace řasy *D. quadricauda* na  $\frac{1}{2}$  ŠS médiu bez mikroelementů s různými koncentracemi červeného kalu. Tyto kultury byly po sklizení lyofilizovány a zaslány na analýzu ICP-MS.

Kultura s 0,1 % koncentrací kalu akumulovala největší množství lanthanoidů (viz graf č. 14 a 15) a zároveň akumulovala více lanthanoidů, než kultura s identickou koncentrací kalu kultivovaná v klasickém  $\frac{1}{2}$  ŠS médiu (viz graf č. 16).

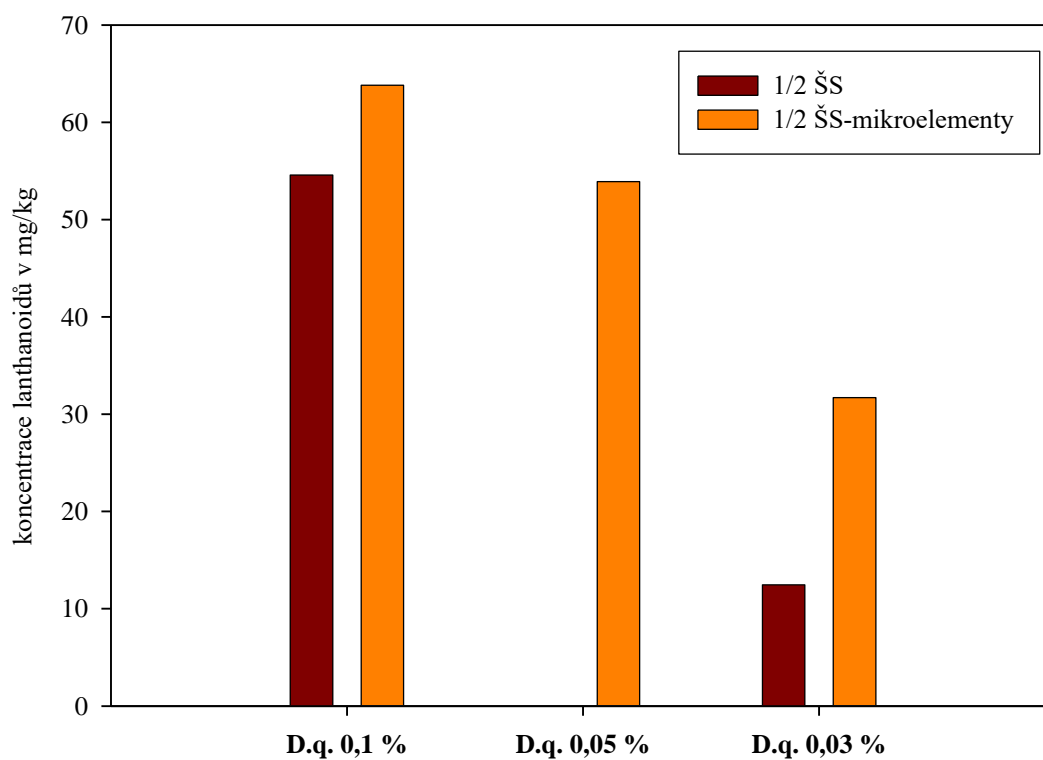


**Graf č. 14:** Množství tří nejvíce akumulovaných lanthanoidů v biomase řasy *D. quadricauda* s různými koncentracemi červeného kalu kultivované v ½ ŠS médiu bez mikroelementů, které bylo stanoveno pomocí ICP-MS.





**Graf č. 15:** Celkové množství lanthanoidů akumulovaných řasou *D. quadricauda* s různými koncentracemi červeného kalu kultivované v ½ ŠS médiu bez mikroelementů, které bylo stanoveno pomocí ICP-MS.



**Graf č. 16:** Porovnání akumulace lanthanoidů řasou *D. quadricauda* kultivovanou v odlišných médiích s různými koncentracemi kalu. Vzorek s koncentrací kalu 0,05 % s 1/2 ŠS médiem nebyl analyzován.

## 6 DISKUZE

Jednobuněčné zelené řasy jsou velmi dobrým modelovým organismem pro základní i aplikovaný výzkum. Jejich kultivace je v laboratorních podmínkách poměrně nenáročná na množství živin a jejich růst je poměrně rychlý. Díky těmto aspektům se řasy používají například pro výzkum fotosyntézy, regulace buněčných cyklů nebo metabolismu. Řasy mají mnoho využití a mnoho z nich souvisí s jejich minerálním obsahem, např. jako potraviny, výživové doplňky, hnojiva, v medicíně a průmyslu (Moreda-Piñeiro et al., 2012).

Lanthanoidy se stávají nedostatkovou komoditou, a proto se mnoho zemí snaží najít efektivní způsob recyklace těchto kovů (Schwabe et al., 2012). Červený kal se jeví jako potenciální druhotný zdroj lanthanoidů a dalších kovů. Kromě toho produkce tohoto odpadu stále roste a kvůli své toxicitě tento odpad velmi zatěžuje životní prostředí (Olszewska et al., 2016).

Pro výzkum recyklace lanthanoidů z červeného kalu byl proveden prvotní experiment, který měl za úkol vybrat vhodnou řasu pro další kultivace s kalem za účelem akumulace lanthanoidů. Jako modelové organismy byly vybrány řasy *Desmodesmus quadricauda*, *Chlamydomonas reinhardtii* a *Parachlorella kessleri*. Tyto tři řasy jsou hojně využívány pro studium buněčných cyklů a v biotechnologických odvětvích (Zachleder et al., 2016; Goecke et al., 2015). Kultivace s červeným kalem byla možná pouze s nízkými koncentracemi kalu v médiu, protože velké částice kalu a jeho tmavé zbarvení způsobují limitaci světlem. Při zpracování vzorků byl zjištěn problém s měřením OD při 750 nm. Přítomnost kalu způsobovala nepřesnosti v měření proti destilované vodě. Proto bylo měření prováděno proti identickým koncentracím kalu, které byly použity při kultivacích. Nejpřesnější metodou pro stanovení počtu buněk se nakonec ukázalo počítání buněk v Bürkerově komůrce, kde bylo možné odlišit buňky od kalu.

Jako nejvhodnější pro další výzkum byla vybrána řasa *D. quadricauda*, protože v přítomnosti kalu rostla nejlépe a podle dat z analýzy ICP-MS akumulovala největší množství lanthanoidů z červeného kalu (viz graf č. 1 a 12). Řasa *D. quadricauda* kultivovaná v ½ ŠS médiu s koncentrací kalu 0,1 % byla schopna akumulovat až 22 mg ceru na kg sušiny (viz graf č. 12). V mnoha studiích byl pro odstranění anorganických a organických látek ze znečištěné vody použit jako bioremediační prostředek právě *Desmodesmus* spp. (Martinez et al., 2000; Kim et al., 2007). Již dříve bylo prokázáno

odstranění lanthanoidů z odpadních vod řasami jako je např. *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis galbana* nebo *Euglena gracilis* (Qu et al., 1998b; Wang et al., 1996; Ishii et al., 2006). Jak bylo dříve zjištěno pro vyšší rostliny, a u řas zatím není jasné, zda pozitivní efekt lanthanoidů vzniká proto, že zmírňují příznaky nedostatku jiných kovů ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  nebo  $\text{Mn}^{2+}$ ) (Tyler, 2004; Gong et al., 2011) nebo díky tomu, že se tyto prvky podílejí na dalších fyziologických reakcích (např. metabolické cesty, fotosyntéza, stabilita membrány, odolnost vůči stresu atd.). Na druhou stranu mohou lanthanoidy působit toxicky, což může mít vliv na fotosyntézu, růst, aktivitu enzymů nebo dýchání (Brown et al., 1990; Li et al., 2005). V nízkých koncentracích mohou mít lanthanoidy stimulační účinek i u řas, kde mohou zastoupit nedostatek  $\text{Ca}^{2+}$  iontů ve stresových podmínkách (Goecke et al., 2015). Na základě těchto poznatků byla k dalším experimentům vybrána dvě nutričně chudší média, a to  $\frac{1}{2}$  ŠS bez mikroelementů a  $\frac{1}{4}$  ŠS médium. Obě tato média vycházejí ze silně minerálního  $\frac{1}{2}$  ŠS média (Zachleder and Šetlík, 1982). Červený kal měl zastoupit nedostatek živin v médiích, a tím řasu přimět k bioakumulaci lanthanoidů podobně jako u Goeckeho et al. (2015). Podle růstových křivek (viz graf č. 7 a 9) můžeme soudit, že akumulované lanthanoidy a ostatní kovy podpořily růst řas na nutričně chudším médiu ( $\frac{1}{2}$  ŠS bez mikroelementů) podobně jako u sinice *Arthrospira platensis* (Li et al., 1999). V případě média  $\frac{1}{4}$  ŠS můžeme z růstové křivky (viz graf č.11) pozorovat efekt limitace růstu a růstového stresu z menšího obsahu nejen mikroelementů, ale i makroelementů, které zapříčinily pomalejší růst. Z grafu č. 11 také vyplývá, že koncentrace kalu 0,1 % je již pro řasy příliš toxická. Při zbylých dvou koncentracích kalu 0,05 % a 0,03 % se řasy chovaly podobně a rostly pomaleji než kontrolní kultura.

V kontrolních kulturách řasy *D. quadricauda* kultivovaných na  $\frac{1}{2}$  ŠS médiu bez mikroelementů a také v kulturách ovlivněných 0,05 % koncentrací kalu byla nalezena lipidová tělíska (viz obr. č. 13 a 14). Analýzou obsahu lipidů pomocí na MBÚ AVČR v Praze byla prokázána přítomnost neutrálních lipidů v celkovém množství 16,5 % a 18,0 % sušiny (viz tab. č. 11). Nejvíce zastoupena byla kyselina olejová, které bylo 44 % z celkového obsahu lipidů v sušině (viz tab. č. 12). Celkové složení lipidů je velmi podobné řepkovému oleji. Následně byl proveden test s olejovou emulzí, který prokázal, že červený kal má lipofilní charakter, což vysvětluje i vysrážení červeného kalu v kultuře s 0,05 % červeného kalu (viz obr. č. 13). Tyto lipidy nejsou zajímavé pro další biotechnologické využití, protože neobsahují žádnou na trhu žádanou mastnou kyselinu a také proto, že buňky

obsahují malé množství lipidů (16,5 a 18 % v sušině, viz tab. č. 12) oproti např. 32 – 40 % jak uvádí Goecke et al. (2017b).

Analýza ICP-MS je úspěšně využívaná metoda pro stanovení obsahu lanthanoidů v řasách (např. Goecke et al., 2017a). Tato analýza prokázala akumulaci lanthanoidů z červeného kalu všemi sledovanými modelovými organismy. Nejvíce lanthanoidů akumulovala řasa *D. quadricauda*. Kultura této řasy s koncentrací kalu 0,1 % dokázala akumulovat 54,57 mg lanthanoidů na kilogram sušiny (viz graf č. 13). Při experimentu s chudším médiem ½ ŠS bez mikroelementů bylo zjištěno, že řasa akumuluje lanthanoidy lépe, pokud má nedostatek mikroprvků v médiu. Kultura této řasy s koncentrací kalu 0,1 % kultivována na médiu ½ ŠS bez mikroelementů akumulovala 63,8 mg/kg (viz graf č. 15), což je více než u řasy kultivované na standardním ½ ŠS médiu. Akumulace lanthanoidů řasami je koncentračně závislá na množství dostupných lanthanoidů a je také druhově závislá (viz graf č. 12). Míra akumulace souvisí tedy jak s druhem řasy, tak i s množstvím jednotlivých lanthanoidů v médiu, a také s obsahem makro- a mikroelementů obsažených v médiu.

Řasy kultivované v laboratorních podmínkách na nutričně bohatých médiích mohou akumulovat velké množství dostupných lanthanoidů, oproti přírodním podmínkám, kde je méně živin a také menší množství lanthanoidů. V přírodě se pohybuje akumulace lanthanoidů např. u makrořasy *Colpomenia sinuosa* do 7,62 mg/kg sušiny, jak uvádí Goecke et al. (2017a).

## 7 ZÁVĚR

Jako modelový organismus pro výzkum recyklace lanthanoidů z červeného kalu byla vybrána řasa *Desmodesmus quadricauda*, protože prokázala nejlepší růstové vlastnosti v toxickém prostředí způsobeném červeným kalem, a také akumulovala nejvíce lanthanoidů z červeného kalu. Z výsledků práce vyplývá, že akumulace lanthanoidů je koncentračně závislá, tj. závisí na množství lanthanoidů ve vodném prostředí a je také druhově závislá, tj. závisí na druhu použitého organismu. Řasa *D. quadricauda* rostla na obou testovaných médiích ( $\frac{1}{2}$  ŠS bez mikroelementů a  $\frac{1}{4}$  ŠS) velmi podobně, avšak v médiu  $\frac{1}{4}$  ŠS se projevila limitace nedostatkem makroprvků, a proto toto médium již nebude dále využíváno pro další výzkum. V kontrolní kultuře a v kulturách s kalem o koncentracích 0,05 % a 0,03 % kultivovaných na médiu  $\frac{1}{2}$  ŠS bez mikroelementů byly objeveny lipidy. Důvodem tvorby lipidů byl patrně stres z limitace živinami. Tyto lipidy nebyly shledány biotechnologicky zajímavými. Médium  $\frac{1}{2}$  ŠS bez mikroelementů se ukázalo jako vhodné médium pro kultivace s červeným kalem za účelem recyklace lanthanoidů. Kultury kultivované s přídatkem kalu o koncentraci 0,1 % v médiu  $\frac{1}{2}$  ŠS bez mikroelementů akumulovaly lanthanoidy lépe než kultury na standardním  $\frac{1}{2}$  ŠS médiu. Výsledky ukázaly, že využití mikrořas za účelem recyklace lanthanoidů by mohlo být vhodnou ekologickou alternativou.

## 8 SEZNAM LITERATURY

**An, S.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 Biol*, 1(4): 418-428.

**Ayers, R., Holmberg, J., Andersson, B.** (2001) Materials and the Global Environment Waste Mining in the 21st Century, *MRS Bulletin*, 26(6): 477-480.

**Bišová, K., Zachleder, V.** (2014) Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple fission. *J Exp Bot*, 65(10): 2585-2602.

**Brányiková, I., Maršálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zechleder, V., Vítová, M.** (2011) Microalgae – novel highly efficient starch producers. *Biotechnol Bioeng*, 108(4): 766-76.

**Brown, P.H., Rathjen, A.H., Graham, R.D., Tribe, D.E.** (1990) Rare earth elements in biological systems. In: Gschneidner, Jr. K.A., Eyring, L., (Eds.) Handbook on the physics and chemistry of rare earths. Vol. 13. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 423-453.

**Buchheim, M.A., Sutherland, D.M., Schleicher, T., Forster, F., Wolf, M.** (2012) Phylogeny of Oedogoniales, Chaetophorales and Chaetopeltidales Chlorophyceae: inferences from sequence-structure analysis of ITS2. *Ann Bot*, 109(1): 109-116.

**Evans, K., Nordheim, E., Tsesmelis, K.** (2012) Bauxite Residue Management, *Light Metals*, 63-66.

**Fashui, H., Ling, W., Wang, X. F., Lei, Z., Chao, L.** (2003) Effects of Ce<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, and Hg<sup>2+</sup> on activities and secondary structure of trypsin. *Biol Trace Element Res*, 95(3): 233-240.

**Fernandes, B., Teixeira, J., Dragone, G., Vicente, A. A., Kawano, S., Bišová, K., Přibyl, P., Zachleder, V., Vítová, M.** (2013) Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*., *Bioresour. Technol.*, 144: 268-274.

**Fott, B.** (1967) *Sinice a řasy*. Praha: Academia ČSAV, pp. 517.

**Francisco, E. C., Nevies, D. B., Jacob-Lopes, E., Franco, T. T.** (2010) Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J Chem Technol Biotechnol*, 85(3): 395-403.

**Fu, F.F., Akagi, T., Yabuki, S., Iwaki, M., Ogura, N.** (2000) Distribution of rare earth elements in seaweed: implication of two different sources of rare earth elements and silicon in seaweed. *J Phycol*, 36(1): 62–70.

**Goecke, F., Jerez, C.G., Zachleder, V., Figueroa, F.L., Bíšová, K., Řezanka, T., Vítová, M.** (2015) Use of lanthanides to alleviate the effects of metal ion-deficiency in *Desmodesmus quadricauda* (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Front Microbiol.* 6: 1-11.

**Goecke, F., Zachleder, V., Vítová, M.** (2015) Rare Earth Elements and Algae: Physiological Effects, Biorefinery and Recycling. In: Prokop A., Bajpai R., Zappi M. (eds) *Algal Bioref*, Springer, Cham.

**Goecke, F., Aránguiz-Acuña, A., Palacios, M., Muñoz-Muga, P., Rucki, M., Vítová, M.** (2017a) Latitudinal distribution of lanthanides contained in macroalgae in Chile: an inductively coupled plasma-mass spectrometric (ICP-MS) determination. *J Phycol*, 29: 2117-2128.

**Goecke, F., Vítová, M., Lukavský, J., Nedbalová, L., Řezanka, T., Zachleder V.** (2017b) Effects of rare earth elements on growth rate, lipids, fatty acids and pigments in microalgae. *J Phycol*, 65: 226-234.

**Gong, X., Hong, M., Wang, Y., Zhou, M., Cai, J., Liu, C., Gong, S., Hong, F.** (2011) Cerium relieves the inhibition of photosynthesis of maize caused by manganese deficiency. *Biol Trace Element Res*, 141: 305-316.

**Harris, E.H.** (1989) *The Chlamydomonas sourcebook*, A comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, San Diego, CA, pp.780

**Hou, X.I., Yan, X.J.** (1998) Study on the concentration and seasonal variation of inorganic elements in 35 species of marine algae. *Sci Total Environ*, 222: 141–156



- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A.** (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J*, 54: 621–639.
- Cheng, J.J., Timilsina, G.R.** (2011) Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renewable Energy*, 36: 3541-3549.
- Ishii, N., Tagami, K., Uchida, S.** (2006) Removal of rare earth elements by algal flagellate *Euglena gracilis*. *J Alloys Compd*, 408-412, 417-420.
- Jursík, F.** (2002) *Anorganická chemie kovů*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, pp.152  
Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/uid\\_isbn-978-80-7080-504-6/anotace/](http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/uid_isbn-978-80-7080-504-6/anotace/)
- Kastori, R.R., Maksimović, I.V., Putnik-Delić, M.I., Zeremski-Škorić, T.M.** (2010) Rare earth elements: Yttrium and higher plants. *Matica Srpska Proc Nat Sci*, 118: 87-98.
- Kim, M.K., Park, J.W., Park, C.S., Kim, S.J., Jeune, K.H., Chung, M.U., Acreman, J.** (2007) Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Biores Technol*, 98: 2220-2228.
- Krienitz, L., Hegewald, E.H., Hepperle, D., Huss, V.A.R., Rohr, T., Wolf, M.** (2004) Phylogentic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia*, 43: 529-542
- Lee, S. K., Chou, H., Ham, T. S., Lee, T. S., Keasling, J. D.** (2008) Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. *Curr Opin Biotechnol*, 19 (6): 556-563.
- Li, X.F., Wang, C.H., Wen, S.H.** (1999) Study on culture conditions of *Spirulina platensis*. *Food Ferment Indust*, 25: 13-17. (in Chinese)
- Li, Y. T., Han, D. X., Hu, G. R., Sommerfeld, M., Hu, Q. A.** (2010) Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Bioeng*, 107 (2): 258-268.
- Liu, M., Hasenstein, K. H.** (2005) La<sup>3+</sup> uptake and its effect on the cytoskeleton in root protoplasts of *Zea mays* L. *Planta*, 220: 658-666.

- Martínez, M.E., Sánchez, S., Jiménez, J.M., Yousfi, F.E., Muñoz, L.** (2000) Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Biores Technol.* 73: 263-272.
- Mashitah, S.M., Shazili, N.A.M., Rashid, M.K.A.** (2012) Elemental concentrations in brown seaweed, *Padina sp.* along the east coast of Peninsular Malaysia. *Aquat Ecosyst Health*, 15: 267–278.
- Merchant. S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., et al.** (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318 (5848): 245-250.
- Moreda-Piñeiro, A., Peña-Vázquez, E., Bermejo-Barrera, P.** (2012) Significance of the presence of trace and ultratrace elements in seaweeds. In: Kim SK (ed) Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology, 1st edn. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 116–172.
- Nair, S. Paulose, H.** (2014) Emergence of green business models: The case of algae biofuel for aviation, *Energy Policy*, 65: 175-184.
- Nedelcu, A.M., Lee, R.W., Lemieux, G., Gray, M.W., Burger, G.** (2000) The complete mitochondrial DNA sequence of *Scenedesmus obliquus* reflects an intermediate stage in the evolution of the green algal mitochondrial genome. *Genome Res*, 10(6): 819-31.
- Ogata, T., Terakado, Y.** (2006) Rare earth element abundances in some seawaters and related river waters from the Osaka Bay area, Japan: significance of anthropogenic Gd. *Geochem J*, 40: 463–474.
- Olsewzewska, J.P., Meharg, A.A., Heal, K.V., Carey, M., Gunn, I.D.M., Searle, K.R., Winfield, I.J., Spears, B.M.** (2016) Assessing the legacy of Red Mud in shallow freshwater lake: Arsenic accumulation and speciation in macrophytes. *Environ Sci Technol*, 50(17): 9044-52.
- Power, G., Grarfe, M., Klauber C.** (2011) Bauxite residue issues: Current Management, Disposal and Storage Practices. *Hydrometallurgy*, 108: 33-45.
- Qu, K.M., Yuan, X.Y., Xin, F.Y.** (1998b.) Enhancement of 3 rare earth elements to *Isochrysis galbana*. *J Fish Sci Chin*, 5: 42-47. (in Chinese)

**Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A., & Posewitz, M.C.** (2010) Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production', *Eukar Cell*, 9 (4): 486-501.

**Servigne, M., Tchakirian, A.** (1939) Sur la presence d'elements des terres rares dans les algues calcaires (*Lithothamnium calcareum*). *C R Acad Sci*, 209: 570–572.

**Shakya, P.R.** (2007) Nickel adsorption by wild type and nickel resistant isolate of *Chlorella* sp. *Pak J Anal Environ Chem*, 8: 86-90.

**Schwabe, A., Meyer, U., Grün, M., Voigt, K.D., Flachowsky, G., Dänicke, S.** (2012) Effect of rare earth elements (REE) supplementation to diets on the carry-over into different organs and tissues of fatng bulls. *Livest Sci*, 143: 5–14.

**Sivakumar, G., Vail, D.R., Xu, J.F., Burner, D.M., Lay, J.O., Ge, X.M., Weathers, P.J.** (2010) Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations. *EngLife Sci*, 10 (1): 8-18.

**Sueoka, N.** (1960) Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 46: 83-91

**Sutherland, K.S.** (2015) Solid/Liquid Separation Equipment, Wiley-VCH, Weinheim

**Šetlík, I., Zachleder, V.** (1984) The multiple fission cell reproductive patterns in algae. *The Microbial Cell Cycle. CRC Press, Boca Raton (USA):* 253-279.

**Tse, P.-K.** (2011) China's rare earth industry, U.S. Geological Survey Open-File Report 2011–1042, pp.11.

**Tyler, G.** (2004) Rare earth elements in soil and plant systems - A review. *Plant Soil*, 267: 191-206

**USGS** (2014) Annual publication of the United States Geological Survey, February 2014, pp.128–129.

**Vásquez, J.A., Guerra, N.** (1996) The use of seaweeds as bioindicators of natural and anthropogenic contaminants in northern Chile. *Hydrobiologia*, 326: 327–333

**Vítová, M., Bišová, K., Hlavová, M., Zachleder, V., Rucki, M., Čížková, M.** (2011) Glutathione peroxidase activity in the selenium-treated alga *Scenedesmus quadricauda*. *Aqua Toxicol*, 102: 87–94.

**Wang, Y.J., Li, J., Lü, Y., Jin, H.B., Deng, S.H., Zeng, Y.M.** (2012) Effects of cerium on growth and physiological characteristics of *Anabaena flosaquae*. *J Rare Earth*, 30: 1287-1292.

**Weissig, H., Back, C.F.** (1991) Action spectrum for the light-dependent step in gametic differentiation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 97: 118-121.

**Wu, L.F., Chen, P.C., Huang, A.P., Lee, C.M.** (2012) The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Biores Technol*, 113: 14-18.

**Yamamoto, M., Kurihara, I., Kawano, S.** (2005) Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), *Planta*, 221 (6): 766-775.

**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.

**Zachleder, V., Bišová, 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. *Eur J Phycol*, 37(3): 361-371.

**Zachleder, V., Bišová, K., Vítová, M.** (2016) The Cell Cycle of Microalgae. In: Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A. (ed) *The Physiology of Microalgae*, 1st edn. Springer, Cham, Switzerland, pp 3-47.

**Zachleder, V., Schläfli, O., Boschetti, A.** (1997) Growth-controlled oscillation in activity of histone H1 kinase during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) I. *J Phycol*, 33(4): 673-681.

## Internetové zdroje:

BBC, UK. *Hungarian chemical sludge spill reaches Danube* [online]. [cit. 2018-01-25].

Dostupné z: <http://www.bbc.com/news/world-europe-11491412>

GLOPOLIS. *Světové soupeření o nerostné suroviny jako jeden z nejzávažnějších geopolitických problémů současnosti* [online]. [cit. 2018-03-27].

Dostupné z: <https://glopolis.org/1608/svetove-soupereni-o-nerostne-suroviny-jako-jeden-z-nejzavaznejsich-geopolitickych-problemu-soucasnosti#>

IS.MUNI.CZ. *Počítání v Bürkerově komurce* [online]. [cit. 2018-02-25].

Dostupné z:

[https://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/Bi8250c/um/52663438/54012848/Pocitani\\_v\\_Burkerove\\_komurce.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/Bi8250c/um/52663438/54012848/Pocitani_v_Burkerove_komurce.pdf)

MINDAT.ORG. *Monazite* [online]. [cit. 2018-03-27].

Dostupné z: <https://www.mindat.org/min-2750.html>

REDMUD.ORG. *Red Mud Project/Characteristics* [online]. [cit. 2018-01-25].

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

TELEGRAPH. *Hungary threatened by 'ecological catastrophe' as toxic sludge escapes factory* [online]. [cit. 2018-01-25].

Dostupné z:

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

VELEBIL.NET. *Monazit* [online]. © 2005-2008 Národní muzeum v Praze, mineralogicko-petrologické oddělení [cit. 2018-01-15].

Dostupné z: <http://www.velebil.net/mineraly/monazit>

WIKIPEDIA: the free encyklopedia. *Red Mud* [online]. © 2001-2017 San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, [cit. 2018-01-25].

Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Red\\_mud](https://en.wikipedia.org/wiki/Red_mud)

WORLD ALUMINIUM. *Bauxite Residue Managment* [online]. ©2004-2015 London, United Kingdom: The International Aluminium Institute, [cit. 2018-01-25]. Dostupné z: <http://bauxite.world-aluminium.org>

## 9 ZDROJ OBRÁZKŮ

**Obrázek č.1:** *Desmodesmus quadricauda*, osmibuněčné coenobium **Náhlík, V.** (2017).

**Obrázek č.2:** Kultura řasy *Chlamydomonas reinhardtii* **Šenkyplová, V.** (2018).

**Obrázek č.3:** Kultura řasy *Parachlorella kessleri* **Ivanov, I.** (2017).

**Obrázek č. 4:** Schéma buněčného cyklu *D. quadricauda*

**Zachleder, V., Schläfli, O. a 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. 5:** Schéma mnohonásobného štěpení v buněčném cyklu řasy *Chlamydomonas reinhardtii*

**Bišová, K., Krylov, D. M., Umen, J.** (2005). Genome – Wide annotation and expression profiling of cell cycle regulátory genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology*, 137(2): 475-91.

**Obrázek č. 6:** Buněčný cyklus řasy *Parachlorella kessleri* **Náhlík, V. a Ivanov I.** (2018).

**Obrázek č. 7:** Chemická reakce pro výrobu bionafty

**Cheng, J. J. & Timilsina, G. R.** (2011) Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renewable Energy*, 36: 3541-3549.

**Obrázek č.8:** Monazit **Wikipedia** (2009)

Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Monazit\\_-\\_Mosambik,\\_O-Afrika.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Monazit_-_Mosambik,_O-Afrika.jpg).

**Obrázek č.9:** Mapa oblastí Almásfüzitő s vyznačenými Depy **World Aluminium** (2015)

Obrázek dodán firmou World Aluminium dostupnou z: <http://www.world-aluminium.org/>.

**Obrázek č. 10:** Odběr vzorků červeného kalu pro centrum Algatech **World Aluminium**

(2015) Obrázek dodán firmou World Aluminium dostupnou z:

<http://www.world-aluminium.org/>.

**Obrázek č. 11:** Zobrazení Bürkerovy komůrky s detailem počítačí mřížky. **is.muni.cz**

(2015).

Dostupné z:

[https://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/Bi8250c/um/52663438/54012848/Pocitani\\_v\\_Burkerove\\_komurce.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/Bi8250c/um/52663438/54012848/Pocitani_v_Burkerove_komurce.pdf).

**Obrázek č. 12:** Kultivace řas ve fotobioreaktorech s přidavkem červeného kalu **Náhlík, V.**

(2017).

**Obrázek č. 13:** Kultivace řas ve fotobioreaktorech po 48 hodinách cyklu **Náhlík, V.** (2017).

**Obrázek č. 14:** Fotografie ze světelného mikroskopu řasy *D. quadricauda* **Náhlík, V.**

(2017).

**Obrázek č. 15:** Fotografie ze světelného mikroskopu řasy *D. quadricauda* **Náhlík, V.**

(2017).

**Obrázek č. 16:** *D. quadricauda* pěstovaný s červeným kalem obarvený fluorescenční barvou Nile Red (zvětšení 200x) **Náhlík, V.** (2017).

**Obrázek č. 17:** Vysrážení kalu **Náhlík, V.** (2017).