

Diplomová práce

# AKUMULACE URANU ROSTLINAMI KULTIVOVANÝMI V LABORATORNÍCH PODMÍNKÁCH

## ACCUMULATION OF URANIUM BY PLANTS CULTIVATED UNDER LABORATORY CONDITIONS

Martin Buzek

Školitel: RNDr. et Mgr. Petr Soudek, Ph.D.

Konzultant: Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.



Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



Ústav experimentální botaniky

Akademie věd České Republiky

**PRAHA 2010**

## SOUHRN

Schopnost akumulace uranu byla testována na celkem 20 kultivarech a GMO rostlin tabáku (*Nicotiana* sp.) kultivovaných v Hoaglandově hydroponickém médiu pod umělým osvětlením. Kromě vlastní akumulace a translokace uranu v rostlinách byl zkoumán vliv genetických úprav rostlin a úprav živného média na schopnost rostlin uran akumulovat a přesouvat do nadzemní části. Jako nejvhodnější rostliny pro akumulaci uranu se jevíly *N. glauca*, *N. tabacum* cv. M 51 a GMO varieta M 51 Pro, koncentrace uranu v rostlinách kultivovaných v médiu o koncentraci uranu 0,5 mM byla až 31,28 mg/g sušiny v kořenu a až 0,21 mg/g v nadzemní části. U rostlin *N. tabacum* cv. La Burley 21 a GMO variety TRI2 – T1 a TRI2 – T2 byla prokázána schopnost uran akumulovat a translokovat jej do nadzemní části. Nejvyšší zjištěná koncentrace uranu činila 72,49 mg/g sušiny v kořenu, 4 mg/g ve stonku a 1,1 mg/g v nejvyšších listech pro rostliny kultivované v médiu o koncentraci uranu 1 mM. Na schopnost uranu akumulovat měla nejvyšší vliv deficiencie fosfátové složky v médiu.

## ABSTRACT

The ability to accumulate uranium was tested on 20 different cultivars and GMOs of *Nicotiana* spp. grown in Hoagland's hydroponic medium indoors. Apart from the accumulation and translocation of uranium in plants, the effects of genetic modifications and adaptations of hydroponic medium on the ability of plants to accumulate uranium were tested. *N. glauca*, *N. tabacum* cv. M 51 and GMO M 51 Pro seemed to be the best plants for accumulation of uranium. Concentrations of uranium in these plants grown in medium with 0,5 mM of uranium were as high as 31.28 mg/g dry weight in roots and 0.21 mg/g in upper parts. *N. tabacum* cv. La Burley 21 and GMOs TRI2 – T1 and TRI2 – T2 were tested for accumulation and translocation of uranium. Highest concentration was 72.49 mg/g in roots, 4 mg/g in stems and 1.1 mg/g in highest leaves for plants cultivated in medium with 1 mM of uranium. Absence of phosphate in the hydroponic medium resulted in increased accumulation of uranium.

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli, RNDr. et Mgr. Petru Soudkovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval, za praktické rady při psaní práce a za pomoc v laboratoři. Také děkuji paní Prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za konzultace a zaštitění této práce na školní půdě.

Tato práce byla podpořena granty COST FA 0605OC 9082, NPV II 2B08058 a NPV II 2B06187.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb. (o vysokých školách) ve znění pozměňovacích předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že na moji práci se vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb. (autorský zákon) ve znění pozměňovacích předpisů.

V Praze dne 1.9.2010

Martin Buzek

## OBSAH

1 Úvod.....	5
2 Teoretická část.....	6
2.1 Uran .....	6
2.1.1 Využití uranu člověkem .....	7
2.1.2 Uran v životním prostředí .....	8
2.1.3 Toxicita uranu .....	9
2.2 Zdroje znečištění.....	10
2.2.1 Těžba uranu .....	10
2.2.2 Zpracování uranových rud .....	13
2.2.3 Vojenské využití .....	14
2.3 Akumulace uranu rostlinami .....	15
2.3.1 Akumulace v přírodě .....	15
2.3.2 Půdní experimenty .....	16
2.3.3 Hydroponie .....	16
2.3.4 In vitro.....	17
2.4 Fytoremediace.....	18
2.4.1 Typy fytoremediace.....	18
2.4.2 Výhody a nevýhody fytoremediace .....	19
3 Materiál a metody .....	21
3.1 Materiál .....	21
3.1.1 použité chemikálie.....	21
3.1.2 Rostliny .....	22
3.2 Metodika.....	24
3.2.1 Test toxicity .....	24
3.2.2 Kultivace rostlin .....	24
3.2.3 Stanovení uranu .....	26
4 Výsledky.....	29
4.1 Test toxicity.....	29
4.2 Akumulace rostlinami <i>Nicotiana Sp.</i> .....	30
4.3 Akumulace a translokace v rostlinách <i>N. tabacum</i> .....	32
4.3.1 Tabák La Burley 21.....	32
4.3.2 Tabák TRI2 – T1.....	36
4.3.3 Tabák TRI2 – T2.....	40
4.4 Akumulace v rostlinách <i>N. tabacum</i> v závislosti na složení média .....	45
5 Závěry .....	50
Použitá literatura .....	51

## 1 ÚVOD

Uran jako polutant životního prostředí je záležitostí posledního půlstoletí. Rozvoj jaderného průmyslu, utlumený na konci dvacátého století, se opět začíná zrychlovat a s ním i potřeba těžít uran. Jsou otevírány nová naleziště a úpravny uranu a naopak mnoho starých, vytěžených, je zavíráno. Škody po těžbě uranu jsou značné - miliony tun horniny znečištěné loužením ohrožují své okolí uvolňováním radonu a výluhy vod obsahujících vedle radionuklidů i celou řadu dalších kontaminantů. Dekontaminace klasickými metodami je velmi drahá, vyžaduje přesuny velkého množství materiálu a dekontaminovanou plochu je třeba dále rekultivovat.

Fytoremediace, jakožto nová a rychle se rozvíjející metoda založená na schopnosti rostlin přijímat kontaminanty by v tomto poli mohla uplatnit své hlavní přednosti – aplikaci in situ, značnou redukci množství kontaminovaného materiálu, a z toho plynoucí nižší cenu. Navíc jde o metodu nezatěžující životní prostředí a dobře přijímanou veřejností.

Tato metoda má ovšem i své limity. Pro správnou funkci fyto­remediace je nutné, aby byla rostlina schopna kontaminant z prostředí přijmout a následně jej transportovat do nadzemní části, což se většinou děje v poměrně malém množství, takže je celý proces velmi zdoluhavý. Snahy o zefektivnění procesu se ubírají dvěma směry – jednak směrem zvyšování dostupnosti polutantů pro rostliny pomocí úprav půdy a jednak směrem genetické modifikace rostlin, která by měla umožnit snadnější příjem a transport polutantů v rostlinách.

Cílem této práce je na modelových rostlinách tabáku otestovat potenciál pro fyto­remediaci uranu z prostředí a zároveň i prozkoumat možnosti jejího zefektivnění oběma výše popsanými způsoby.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

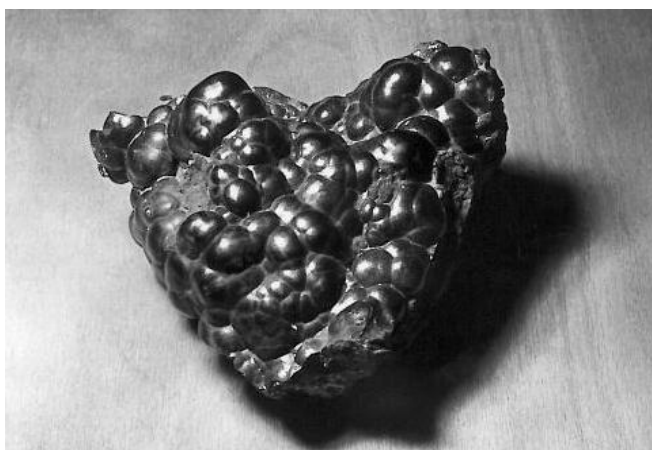
### 2.1 URAN

Uran je radioaktivní kov patřící do skupiny aktinoidů. Je to nejtěžší přirozený prvek, který se vyskytuje ve sluneční soustavě. V čisté formě se jedná o stříbrný lesklý kov, který na vzduchu poměrně rychle oxiduje. Je silně elektropozitivní, paramagnetický a nevodivý. S rostoucí teplotou se stává plastický, rozmělněný na prášek je samozápalný. Uran reaguje prakticky se všemi nekovy, tvoří s nimi řadu sloučenin a komplexů s různými charakteristikami. Kyselina chlorovodíková a dusičná ho velmi dobře rozpouští.<sup>1,2</sup>

Tabulka 1: Základní fyzikálně chemické vlastnosti uranu

Protonové číslo	92
Relativní atomová hmotnost	238,0289
Elektronová konfigurace	[Rn] 5f3 6d1 7s2
Hustota	19.1 g·cm <sup>-3</sup>
Oxidační číslo	6, 5, 4, 3
Elektronegativita	1,38

Uran se vyskytuje prakticky ve všech rudách, vodách, vzduchu, rostlinách i živočiších, ovšem ve velmi malých koncentracích. Je součástí přirozeného radiačního pozadí. Průměrná koncentrace v zemské kůře se, v závislosti na zdroji, pohybuje mezi 2 – 4 ppm.<sup>3</sup> Vyšší koncentrace je možné nalézt v alkalických horninách, z důvodu jeho komplexace v karbonátových komplexech.<sup>4</sup> V přírodě se vyskytuje jako směs tří izotopů, které jsou všechny radioaktivní. Nejhojnějším je <sup>238</sup>U (99,28%), druhým nejhojnějším je <sup>235</sup>U (0,72%) a třetím <sup>234</sup>U (0,0054%). Ve vlastních minerálech má především oxidační čísla +4 a +6. Nejdůležitějším minerálem je uraninit UO<sub>2</sub> (česky smolinec), který je hlavní průmyslově těženou formou. Díky zvýšené afinitě



Obrázek 1: Jáchymovský smolinec

k tvorbě organických komplexů je snadno akumulován v organismech, což má za důsledek vyšší koncentrace uranu ve fosilních palivech, zejména v uhlí a rašelině.<sup>3</sup>

Tabulka 2: Vlastnosti izotopů uranu

Izotop	% hmotnosti	% aktivity	Poločas rozpadu (roky)
<sup>238</sup> U	99,2745	48,9	4,46 * 10 <sup>9</sup>
<sup>235</sup> U	0,720	2,2	7,04 * 10 <sup>8</sup>
<sup>234</sup> U	0,0055	48,9	2,45 * 10 <sup>5</sup>

### 2.1.1 VYUŽITÍ URANU ČLOVĚKEM

Po útlumu na konci 20. století je nyní využívání a těžba uranu opět na vzestupu. Jen v loňském roce bylo všemi způsoby vytěženo přes 50 000 tun uranu. Těžba probíhá dvěma metodami: klasickou důlní a in-situ loužením pomocí kyselin. Podíl uranu vytěženého in-situ loužením dlouhodobě roste, loni činil 36%. Celkové světové těžitelné zásoby činí přes 5,4 milionu tun.<sup>5</sup>

Největší podíl z vytěženého množství je využíván ve nukleárním průmyslu jako palivo do atomových elektráren. Dříve bylo také množství uranu využíváno pro výrobu jaderných hlavic. Jako štěpný materiál se používá izotop <sup>235</sup>U, kterého je ovšem velmi málo a tak je nutné jeho koncentraci zvýšit. Tomuto procesu se říká obohacování uranu. Pro energetické využití stačí, aby byla koncentrace izotopu <sup>235</sup>U zvýšena na 4 – 5%, u jaderné bomby ovšem musí být vyšší než 95%.<sup>2</sup>

Odpad po obohacování uranu (DU - ochuzený uran, převážně <sup>238</sup>U) je pro svou vysokou hustotu využíván ve vojenství jako příměs do pancířů obrněných vozidel nebo jako jádro průbojných podkaliberních střel. Civilní využití ochuzeného uranu zahrnuje například protizávaží v letadlech či lodích nebo výrobu speciálních kontejnerů pro převoz jaderného odpadu.<sup>2</sup>

Sloučeniny uranu byly zejména v minulosti používány ve fotografii k zesilování negativů nebo jako tónovací lázně. Uran, který byl původně odpadním produktem z výroby radia se také již 160 let používá k barvení skla a keramických glazur, jeho sloučeniny produkují žluté až žlutozelené odstíny. V současnosti je ovšem toto využití na ústupu, i když bylo prokázáno, že příměs uranu nepředstavuje žádné zdravotní riziko.<sup>6</sup>

## 2.1.2 URAN V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

### 2.1.2.1 PŮDA

Průměrný obsah uranu v půdách se pohybuje mezi 1,2 – 11 ppm. Studie prováděné v USA ukázaly, že v půdách stejného typu je koncentrace uranu podobná a nezávislá na místě. Výjimkou je izotop  $^{238}\text{U}$ , jehož výskyt je vázán na půdní systémy v blízkosti vody.<sup>7</sup> Většina uranu v půdách je ve formě  $\text{U}^{6+}$ , díky biologickým procesům či změnám redoxního potenciálu či pH je ovšem možná redukce na  $\text{U}^{4+}$ , jehož koncentrace v podzemních vodách se mohou pohybovat v rozmezí 0,05 – 0,2  $\mu\text{g}/\text{l}$ , přičemž nejvyšší koncentrace byly naměřeny v půdách intenzivně hnojených chemickými hnojivy a kompostem.<sup>8</sup> Několik druhů mikroorganismů běžně přítomných v půdách je schopno biologické redukce uranu bez přístupu vzduchu, ovšem tento proces je kontrolován hydroxidy železa.<sup>9</sup> V půdách bez většího množství organického materiálu je nejmobilnější a nejčastěji transportovaná forma uranylový iont ( $\text{UO}_2^{2+}$ ).<sup>10</sup>

### 2.1.2.2 VODA

O koncentraci uranu ve sladkých vodách existuje pouze velmi málo dat. Průměrná koncentrace v povrchových vodách byla odhadnuta na 0,372  $\mu\text{g}/\text{l}$  (rozpětí 0,02 – 4,94  $\mu\text{g}/\text{l}$ ).<sup>11</sup> Koncentrace uranu v německých řekách byla zvýšená v okolí uranových dolů a v místech, kde bylo v zemědělství intenzivně používáno hnojiv na bázi fosfátů.<sup>12</sup> Sladké vody v severní Austrálii většinou obsahují méně než 0,2  $\mu\text{g} / \text{l}$ .<sup>13</sup>

V podzemních vodách je dominantní formou výskytu uranylový iont, který je přítomen v celé řadě komplexů. V rozmezí pH 6 – 10 je uran nejčastěji vázán ve třech stabilních komplexech: v kyselém bifosfátovém  $\text{UO}_2(\text{HPO}_4)_2^{2-}$ , v bikarbonátovém  $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$  a trikarbonátovém  $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ . Jejich vzájemná koncentrace je určena jak koncentrací ligandů ve vodě, tak celkovým pH<sup>14</sup>

Koncentrace  $^{238}\text{U}$  v baltském moři se pohybují od 0,67 do 1,65  $\mu\text{g} / \text{l}$ , v tichém oceánu je průměrná koncentrace 3,2  $\mu\text{g} / \text{kg}$ .<sup>15</sup>



---

### 2.1.2.3 VZDUCH

Zdrojem uranu ve vzduchu je zejména pálení tuhých fosilních paliv. Zatímco průměrná koncentrace uranu v uhlí je odhadována na 6,1 ppm, v popílku vypouštěném z uhelných elektráren může činit až 22 ppm.<sup>16</sup> Rostoucí koncentrace sloučenin uranu ve vzduchu je považována za největší hrozbu pro zdraví organismů.<sup>4</sup> Maximální koncentrace uranu ve znečištěných oblastech se pohybují pod 0,5 ng / m<sup>3</sup>.<sup>17</sup>

---

### 2.1.3 TOXICITA URANU

Uran i jeho soli jsou vysoce toxické, zejména pro mladé jedince, jejich akutní toxicita je daleko závažnější než radioaktivita. Toxicita uranu pro vodní organismy je závislá na pH, s rostoucím pH se zvyšuje.<sup>18</sup> S rostoucí tvrdostí vody způsobenou uhličitanovými ionty se toxicita snižuje – při padesátinásobném zvýšení tvrdosti vody se pětinašobně sníží toxicita.<sup>13</sup>

Výsledný toxický efekt velmi závisí na sloučenině a cestě, kterou se do těla dostává. Uran většinou vstupuje do organismu vdechnutím plicemi. Nerozpustné soli uranu působí dráždivě na dýchací cesty a plicní tkáň, způsobují respirační potíže. Jelikož zůstávají v těle poměrně dlouho, jejich radioaktivita může působit karcinogenně.<sup>19</sup>

Rozpustné soli uranu jsou vysoce toxické zejména při příjmu perorálně či inhalací. Především z plicní tkáně se velmi rychle vstřebávají. V organismu působí toxicky zejména uranylový iont. Během vylučování dochází k těžkému poškození ledvin (poškození buněk proximálního tubulu a stočených kanálků), které je většinou reverzibilní.<sup>20</sup>

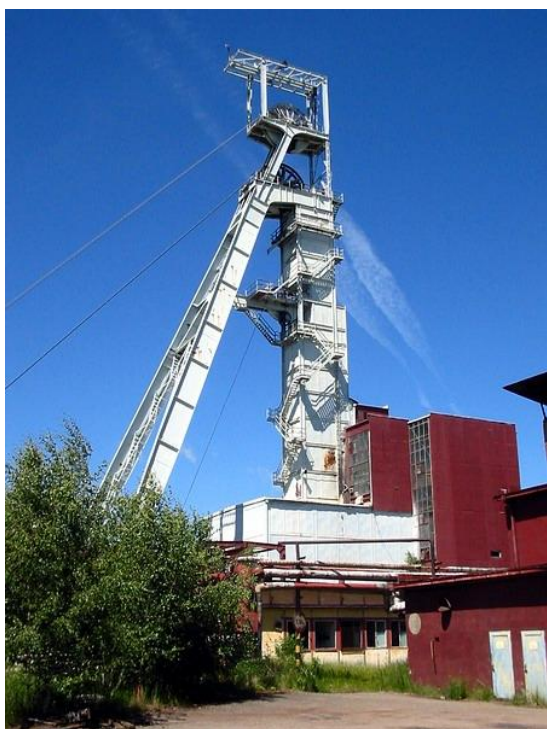
## 2.2 ZDROJE ZNEČIŠTĚNÍ

### 2.2.1 TĚŽBA URANU

Těžba uranu v současnosti probíhá dvěma způsoby: Klasickou důlní technologií v otevřených či hlubinných dolech a in-situ loužením z hornin pomocí kyselin.

#### 2.2.1.1 URANOVÉ DOLY

Největší množství uranu je těženo v povrchových a podpovrchových dolech, ovšem po snížení cen uranu v osmdesátých letech je podpovrchový způsob těžby pro nerentabilitu na ústupu.<sup>21</sup> Vzhledem k tomu, že obsah uranu v rudách se často pohybuje mezi 0,1 až 0,2%, je



Obrázek 2: Důl Rožná

nutné kromě uranu vytěžit velké množství hlušiny, která obsahuje stopové množství přírodních radioaktivních materiálů. Kromě izotopů uranu se zde nacházejí izotopy radia a thoria, jejichž distribuce v okolí je ovlivněna přítomností minerálů obsahujících hliník, železo či mangan.<sup>22</sup> Tyto haldy pak po uzavření dolů stále ohrožují své okolí uvolňováním radonu a vody, která může z haldy louhovat radionuklidy a další toxické látky.<sup>21</sup> Podle studie provedené na výsypkách čtyř východoněmeckých dolů z padesátých let ovšem nedochází

k významnému znečištění okolí výsypek přítomnými radionuklidy ani produkty jejich rozpadových řad, pouze u pat výsypek dochází k mírné akumulaci přítomných radionuklidů.<sup>23</sup>

#### 2.2.1.1.1 ZÁTĚŽ V ČR

Na území ČR bylo nalezeno a prozkoumáno 164 ložisek a rudných výskytů uranu, z nichž bylo 66 následně těženo. Mezi největší patří ložiska Příbram, Rožná, Stráž, Hamr, Jáchymov, Horní Slavkov a Zadní Chodov.<sup>24</sup>

## ROŽNÁ<sup>25</sup>

---

Hlubinná těžba zde byla zahájena roku 1958 a v současnosti se jedná o jediný funkční uranový důl v Evropě. Hloubka dobývání se pohybuje od 950 do 1100 m pod povrchem. Zpočátku byla vytěžená ruda zpracovávána v úpravně Mydlovary, od konce 60. let je v provozu úpravna v Dolní Rožínce. Do roku 2006 zde bylo vytěženo 18 370 tun uranu, roční produkce se pohybuje kolem 300 tun. Dle usnesení vlády č. 565 z 23.5.2007 zde bude těžba pokračovat po dobu ekonomické výhodnosti.

## PŘÍBRAM<sup>26</sup>

---

Těžba v tomto ložisku probíhala od roku 1950 do roku 1991. Z hloubky okolo 1400 metrů pod povrchem bylo vytěženo celkem 48 432, 2 tun uranu. Od roku 1958 byla v provozu i úpravna rud. V současné době jsou šachty zlikvidovány a podzemí částečně zatopeno a částečně využito jako zásobník zemního plynu. Haldy jsou postupně sanovány.

## JÁCHYMOV

---

Uran byl v této oblasti těžen od poloviny 19. století až do roku 1964. Celkem bylo vytěženo zhruba 7500 tun uranu.<sup>27</sup> V současné době jsou doly zlikvidovány, pouze v oblasti bývalé úpravny rud je prováděno čištění vod vytékajících z bývalého odkaliště.<sup>28</sup>

## HAMR NA JEZEŘE<sup>29</sup>

---

Těžba na tomto dole probíhala v letech 1972 – 1993, likvidace v letech 1995 – 2001. Celkem zde bylo z hloubky 160 m pod povrchem vytěženo 13205,9 tun uranu. V současné době je podzemí dolu pomalu zaplavováno a využíváno jako hydrobariéra pro oblasti chemické těžby.

## HORNÍ SLAVKOV<sup>30</sup>

---

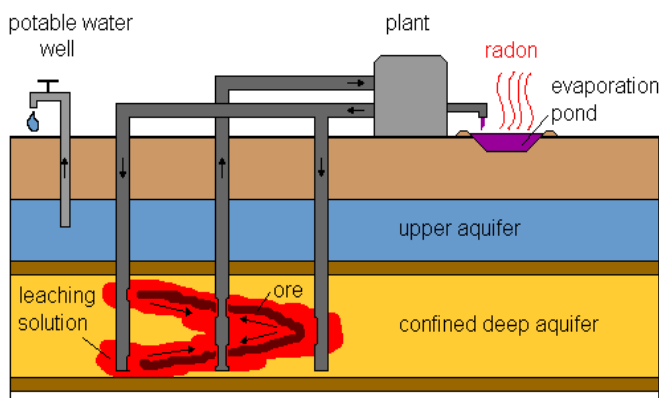
Mezi lety 1948 – 1962 zde bylo vytěženo celkem 2668,3 tun uranu. V současné době je důl zlikvidován a podzemí zatopeno. Povrch je částečně zrekultivován, neustále však probíhá čištění vytékajících kontaminovaných důlních vod a vod z odkališť.

## ZADNÍ CHODOV<sup>31</sup>

Tento důl v okrese Tachov byl v provozu v letech 1953 – 1993. Z hloubky 1200 metrů bylo vytěženo celkem 4150,7 tun uranu. Ruda byla zpracovávána na úpravně v Mydlovarech. V současné době je důl zlikvidován, odvaly sanovány a probíhá pouze čerpání a čištění důlních vod.

### 2.2.1.2 IN SITU LOUŽENÍ (ISL)<sup>32</sup>

Tímto způsobem nedochází k vytěžení uranové rudy ze země. Místo toho je do ložiska vrty vpraven loužící roztok, ve kterém se uran rozpustí a je následně dalšími vrty vypumpován na povrch. Pro správnou funkci je třeba, aby byla uranová ruda obklopena vrstvou horniny, která nepropouští vodu. Jedná se o levnou metodu



Obrázek 3: Schéma ISL

zejména pro těžení ložisek s nižším obsahem uranu. V současnosti je v přípravě několik nových projektů těžby tímto způsobem v USA, Rusku, Kazachstánu a Austrálii.

K loužení se používá roztoků uhličitanu amonného či kyseliny sírové. Největším rizikem při tomto typu těžby je možný únik loužícího roztoku mimo oblast ložiska a následná kontaminace spodních vod, která se velmi obtížně sanuje. Během procesu získávání uranu z loužícího roztoku se také uvolňuje větší množství radonu a tekutého i pevného odpadu, který může obsahovat stopy radioaktivního materiálu.

### 2.2.1.2.1 ZÁTĚŽ V ČR

#### STRÁŽ POD RALSKEM<sup>33</sup>

Těžba technologií ISL pomocí kyseliny sírové s přídavkem kyseliny dusičné zde probíhala v letech 1967 – 1996. Od té doby je uran získáván jako vedlejší produkt likvidace provozu. Celkově zde bylo do roku 1996 vytěženo 15 562 tun uranu.

V současné době se v podzemí nachází ještě přes 240 milionů m<sup>3</sup> kyselých technologických roztoků. Sanace je řešena čerpáním a zpracováváním roztoků na dekontaminační a neutralizační stanici. Vedlejším produktem sanace je rovněž menší množství uranu.

## 2.2.2 ZPRACOVÁNÍ URANOVÝCH RUD



Obrázek 4: Uranový důl s úpravnou a odkališti

Ruda z dolů se mele a louží ve zpracovatelských závodech většinou umístěných v jejich blízkosti. V závislosti na povaze rudy se louží dvěma cestami – alkalickou a kyselou. Protože se během loužení z rudy neuvolňuje jenom uran, ale i další prvky jako selen, vanad, molybden, železo či arsen, je nutné uran

z loužícího roztoku dále vyseparovat. Finálním produktem je tzv. „yellow cake“ U<sub>3</sub>O<sub>8</sub>, který se posílá k dalšímu zpracování.<sup>21</sup>

Odpad po zpracování se ukládá ve formě kalů do usazovacích nádrží, ve kterých je zanechán. Kromě uranu obsahuje vše, co obsahovala původní ruda a má také prakticky stejný objem. Navíc stále ještě vyzařuje na 85% intenzity původní horniny, protože kromě radionuklidů doprovázejících uran obsahuje ještě technologicky nevyužitelných zhruba 5 – 10% uranu.<sup>34</sup>

Na odkalištích jsou kontaminanty vystaveny mnoha vnějším vlivům, které mohou způsobit jejich uvolňování do prostředí. Uvnitř odkališť navíc celou dobu probíhají nejrůznější geochemické procesy, které mohou toto nebezpečí dále zvýšit. V suchých oblastech mohou soli migrovat k povrchu, kde jsou následně vystaveny erozi.<sup>21</sup> Rizikem je také přítomnost pyritu v hornině, který v přítomnosti vody a kyslíku oxiduje za vzniku kyseliny sírové, která pak dále louží zbytkový uran.<sup>35</sup>

---

### 2.2.2.1 ZÁTĚŽ V ČR

---

#### MAPE MYDLOVARY

---

Bývalý závod na zpracování uranových rud se nachází asi 20 km severovýchodně od Českých Budějovic.

Činnost závodu byla zahájena v roce 1961 a ukončena v roce 1991, v současnosti probíhá sanace celého území. V době činnosti zde bylo zpracováno celkem 16745835 tun uranové rudy z celého území ČR s průměrným obsahem uranu 0,184 %. Bylo vyrobeno celkem 28525 tun uranového koncentráту, což znamená, že v odkalištích zůstalo ještě 2320 tun uranu.<sup>36</sup>

Probíhalo zde loužení jak kyselým, tak alkalickým způsobem. Odkaliště jsou vybudována v jámách po těžbě lignitu, která v lokalitě probíhala v letech 1860 – 1979, které poté nebyly vhodně zajištěny proti průsaku kontaminantů z odkališť.<sup>37</sup>

#### HAMR NA JEZEŘE<sup>29</sup>

---

Tato úpravna v letech 1979 – 1993 zpracovávala kyselým procesem rudu z dolů Hamr a Křižany. Bylo zde zpracováno celkem 77,3 milionů tun rudy a 1,7 milionů tun kalů. V současnosti je úpravna částečně využívána pro technologii sanace ložiska, odkaliště je připraveno pro další využití v rámci sanace ložiska Stráž pod Ralskem.

#### DOLNÍ ROŽÍNKA<sup>38</sup>

---

Tato úpravna byla zprovozněna na konci 60. let a slouží k úpravě rudy vytěžené v ložisku Rožná. Ruda se zde drtí, mele a následně louží v sodovém roztoku za katalytického účinku tetraamoměďnatého iontu. Uran je separován na ionexech, vyloužený rmut se ukládá plavením na odkalištích se sypanými hrázemi. Na odkalištích je uloženo přes 10 milionů tun rmutu. Voda z odkališť je zachycována a vracena zpět do technologie, případně do odkališť.

---

### 2.2.3 VOJENSKÉ VYUŽITÍ

Spolu s rozvojem jaderné energetiky vzrůstal i zájem o vojenské využití odpadu z výroby jaderného paliva – ochuzeného uranu (DU). Výsledkem je mnoho oblastí kontaminovaných

v důsledku vývoje a testování munice obsahující DU. Koncentrace uranu na vojenských střelnicích v oblasti dopadu střel často přesahují i 10 000 mg/kg půdy.<sup>39</sup>

K masivnímu použití munice obsahující ochuzený uran došlo zejména při válkách v Iráku v letech 1990 – 1991 a v Jugoslávii v roce 1999. Tření, vyvolané při průniku střely skrz pancíř může vést až k samovznícení, které má za následek rozptýlení toxického aerosolu po vozidle i v jeho okolí.<sup>40</sup>

## 2.3 AKUMULACE URANU ROSTLINAMI

Schopnost rostlin přijímat uran je vedle mezidruhových odlišností ovlivněna složením a pH půdy. Rostlina je schopna přijmout pouze iont, který je rozpustný, takže reakce, které v půdě ovlivňují retenci a rozpustnost uranu budou přímo ovlivňovat jeho dostupnost. Koncentrace uranu v rostlině obecně klesá v pořadí kořen > stonek > listy > plody.<sup>41</sup>

Jako ukazatel akumulace v rostlinách se používá transportní faktor (TF) – poměr koncentrace v suché rostlině ku koncentraci v suché půdě.<sup>42</sup> Nejvyšší schopnost akumulace uranu mívá obecně listová zelenina, následovaná zeleninou kořenovou, ovocnými stromy a obilovinami. TF ovšem zřídka přesahuje 0,1. Pouze na vysoce kontaminovaných lokalitách je tento poměr vyšší, v prostředí s velmi nízkým pH se dokonce může blížit k jedné.<sup>43</sup>

### 2.3.1 AKUMULACE V PŘÍRODĚ

Koncentrace uranu ve stromech (*Betula pendula*, *Alnus glutinosa* a *Pinus sylvestris*) rostoucích na haldách zrušených uranových dolů obsahovaly v nadzemní části maximálně 10  $\mu\text{mol U / kg}$ . V kořenech byly koncentrace vyšší – přes 100  $\mu\text{mol U / kg}$ . Během pěti let nedocházelo k výrazným odchylkám v obsahu uranu.<sup>44</sup>

Rostliny *Raphanus* sp. rostoucí divoce na kontaminovaných půdách v uranovém dole bez speciálního ošetření dokázaly naakumulovat uran až do koncentrace 7,7  $\mu\text{g / g}$  sušiny. Nejvyšší koncentrace byly zjištěny v rostlinách rostoucích na hlušíně (obsah uranu 50 ppm) a na rudě s nízkým obsahem uranu (500 ppm). Koncentrace uranu v rostlinách se zmenšovala směrem listy – kořen - stonek.<sup>45</sup>

---

### 2.3.2 PŮDNÍ EXPERIMENTY

Studie provedená na 8 běžně pěstovaných plodinách vysazených na haldě dolu v Srbsku ukázala velké mezidruhové rozdíly v akumulaci a translokaci uranu. Nejvyšší koncentrace (1,19 µg/g sušiny v nadzemní části) byla naměřena v salátu (*Lactuca sativa*), nejnižší (0,03 µg/g sušiny v nadzemní části) v kukuřici (*Zea mays*). Nadzemní části rostlin akumulovaly uran více než zásobní orgány či semena.<sup>46</sup> Rostliny hrachu (*Pisum sativum*), kukuřice (*Z. mays*) a slunečnice (*Helianthus annuus*) kultivované na upravené půdě z haldy obsahovaly v nadzemní části v průměru 0,40 – 0,53 ppm uranu. V kořenech těchto rostlin byly koncentrace vyšší – v průměru 13,65 – 23,43 ppm. Koncentrace v rostlinách závisela jednak na obsahu uranu v půdě, ale hlavně na způsobu zavlažování – nejvyšší byla v případě závlahy vodou s rozpuštěným uranem.<sup>47</sup>

Chen *et al.*<sup>48</sup> provedli experiment celkem s devíti různými druhy na půdě z výsypky uranového dolu, kterým měřili TF z půdy do nadzemní části. Nejvyšší TF vykazoval *Lupinus albus* (0,042), nejnižší naopak *Brassica chinensis* (0,005). *Nicotiana tabacum* měl TF 0,01.

Na rostlině *Brassica chinensis* probíhal i další experiment, při kterém byla kontaminovaná půda ošetřena různými roztoky (CaCl<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, kaseinu, sacharózy, kyseliny citrónové a extraktu z řepky) a zkoumán jejich vliv na akumulaci. V případě ošetření půdy kyselinou citrónovou vzrostla koncentrace v kořenech z 75,41 mg / kg sušiny na 175,5 mg / kg, v případě nadzemní části z nuly na 9,353 mg/kg. V případě přidavku kyseliny citrónové pouze 7 a 6 den před sklizní byla koncentrace v nadzemní části rostliny dokonce 201,3 mg / kg sušiny. Naopak přidavek CaCl<sub>2</sub> a NH<sub>4</sub>Cl příjem uranu snižoval.<sup>49</sup> U rostliny *B. juncea* pěstované na kontaminované půdě (750 mgU / kg) byla po aplikaci kyseliny citrónové týden před sklizní naměřena koncentrace uranu až 5000 mg / kg sušiny oproti kontrolní koncentraci 5 mg / kg. Byly také pozorovány rozdíly v příjmu uranu u jednotlivých kultivarů této rostliny.<sup>50</sup>

---

### 2.3.3 HYDROPONIE

Rostliny pouštního keře *Artemisia tridentata* subsp. *tridentata* vyklíčené ze semen získaných v lokalitách se zvýšenou koncentrací uranu vykazovaly po 60 dnech růstu schopnost absorbovat uran. Z roztoku uranu o koncentraci 1 µM dokázaly absorbovat až 0,6 µg uranu



na 1 g popela vzniklého spálením rostlin. Schopnost akumulace klesala společně s koncentrací fosfátů v živném médiu.<sup>51</sup> Kořeny hrachu setého (*P. sativum*) kultivované v Hoaglandově médiu dokázaly z kontaminovaného roztoku odstranit 50 % přítomného uranu za 60 – 90 minut. Pokud byly z média odstraněny fosfáty, snížil se tento čas na 45 minut.<sup>52</sup>

Rostliny *Arabidopsis halleri* v modifikovaném Hoaglandově hydroponickém médiu s přídatkem uranu o koncentraci 1  $\mu\text{M}$  dokázaly během 100 denní kultivace naakumulovat až 3 mg U /g sušiny v kořenech a až 0,25 mg / g v nadzemní části. Tyto koncentrace byly přibližně 100x vyšší nežli koncentrace v rostlinách pěstovaných na kontaminované půdě. Rozdíl byl zřejmě dán absencí iontů železa v živném médiu.<sup>53</sup>

Houba hávnatka blanitá (*Peltigera membranacea*) kultivovaná v médiu s obsahem uranu 100 ppm a pH v rozmezí 2 – 10 byla schopna naakumulovat až 42 000 ppm, neboli 4,2% hmotnosti. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo po 24 hodinách a při pH v rozmezí 4 – 5.<sup>54</sup>

---

#### 2.3.4 IN VITRO

Geneticky upravené hairy root kultury rostlin *Brassica juncea* a *Chenopodium amaranticolor* vykazují dobré předpoklady k rhizofiltraci. *B. Juncea* vykazovala při koncentraci uranu nad 2000 $\mu\text{M}$  schopnost naakumulovat 200 – 230 mg uranu na gram suché váhy, zatímco *C. amaranticolor* pouze 130 mg/g suché váhy. Pokud byly z média odstraněny fosfáty, zvýšila se u *B. juncea* při koncentraci uranových iontů 10  $\mu\text{M}$  schopnost akumulace ze 181 na 291,5  $\mu\text{g/g}$  suché váhy.<sup>55</sup>

Kořeny arbuskulární mykorrhizní houby *Glomus intraradices* v symbióze s geneticky upravenými kořeny mrkve (*Daucus carota*) dokáží přijímat uranové ionty a transportovat je směrem ke hostitelským kořenům. Míra příjmu a transportu byla velmi ovlivněna pH – příjem byl nejvyšší při pH 5,5, transport nejvyšší při pH 4.<sup>56</sup>

## 2.4 FYTOREMEDIACE

Fytoremediace je technologie využívající zelené rostliny a s nimi spojené mikroorganismy k odstraňování či transformaci různých kontaminantů z životního prostředí. Při tomto procesu se mohou uplatňovat čtyři různé mechanismy: extrakce kontaminantů z půdy či vody (těžké kovy a radionuklidy), degradace kontaminantů biochemickými procesy v rostlině (organické sloučeniny), volatilizace kontaminantů (organické sloučeniny, ale i rtuť) a stimulace mikrobů v rhizosféře.

### 2.4.1 TYPY FYTOREMEDIACE

Z hlediska mechanismu působení na kontaminované prostředí dělíme fytoremediace na:

#### 2.4.1.1 FYTODEGRADACE

Též zvaná fytotransformace je procesem, při kterém dochází k absorpci a odbourávání kontaminantu metabolickými pochody uvnitř rostliny. Fytodegradace je vhodná pro komplexní organické polutanty jako PAH, PCB či výbušniny.

#### 2.4.1.2 RHIZODEGRADACE (FYTOSTIMULACE)

Tato metoda pracuje na základě rozkladu kontaminantů v rhizosféře pomocí půdních bakterií a hub nacházejících se v blízkosti kořenů. Kořeny rostlin do půdy vylučují nejrůznější organické sloučeniny, které se stávají potravou pro organismy v jejich blízkosti. To má za následek růst jejich počtu a zvýšení jejich aktivity, což se projevuje mimo jiné odbouráváním kontaminantů. Na rozdíl od fytodegradace je tento proces pomalejší.<sup>57</sup>

#### 2.4.1.3 FYTOAKUMULACE (FYTOEXTRAKCE)

Metoda založená na absorpci kontaminantů kořeny rostliny s následným transportem a akumulací v nadzemní části rostliny. Poté se nadzemní část rostliny sklídí a vhodnou technikou zlikviduje. Ke správné funkci této metody je třeba, aby byl extrahovaný kontaminant pro rostlinu dostupný, aby ho rostlina mohla přijmout a transportovat z kořene do nadzemní části a aby byla její produkce biomasy dostatečná.<sup>43</sup> Tato metoda je nejvhodnější pro odstraňování těžkých kovů a radionuklidů.

---

#### 2.4.1.4 RHIZOFILTRACE

Rhizofiltrace se používá k odstraňování kontaminantu z velkých objemů vody za použití kořenového systému rostlin. Dochází při ní k precipitaci nebo dokonce k absorpci kontaminantu v kořenovém systému rostlin. Je velmi podobná fytoextrakci, pracovní částí rostliny však není nadzemní část, ale kořeny. Je vhodná pro odstraňování těžkých kovů a radionuklidů.

---

#### 2.4.1.5 FYTOVOLATILIZACE

Při fytovolatilizaci dochází k absorpci kontaminantu v kořenech a jeho následném transportu do nadzemní části rostliny, v některých případech následovaným jeho biotransformací. Těkavý kontaminant či jeho metabolit je následně transpirován z rostliny ven do ovzduší. Hodí se k odstraňování organických metabolitů, ale i rtuti. Tato metoda je sporná, protože se nejedná o dekontaminaci, ale o pouhé přesunutí kontaminantu z jednoho prostředí (půda) do druhého (vzduch).

---

#### 2.4.1.6 FYTOSTABILIZACE

Fytostabilizace využívá rostliny k imobilizaci kontaminantů v půdě a podzemních vodách. Kořenový systém rostlin díky absorpci snižuje riziko vymývání kontaminantů z půdy či sedimentů. Dále se uplatňuje vlastní rostlinný pokryv, který svou přítomností brání erozi půdy a vytváří podmínky vhodné pro růst další vegetace. Užívá se jako finální úprava již dekontaminovaných ploch.

---

### 2.4.2 VÝHODY A NEVÝHODY FYTOREMEDIACE

---

#### 2.4.2.1 VÝHODY

- Aplikace in situ – není třeba kontaminovaný materiál přesouvat
- Energeticky nezávislá – energii pro svůj chod si bere ze slunce
- Rychlejší než přirozená atenuace
- Dekontaminovaná půda je poté dále využitelná
- Vysoká společenská přijatelnost – jedná se o „zelenou“ technologii

- Množství kontaminovaného materiálu – po usušení je třeba likvidovat daleko menší množství odpadu než v případě vytěžení kontaminované půdy
- Snížení rizika pro okolí – rostliny vytvářejí kryt nad kontaminovaným místem a tím snižují riziko kontaktu.
- Cena – metoda aplikovaná in situ, která navíc zmenšuje množství odpadu, bude levnější.

---

#### 2.4.2.2 NEVÝHODY

- Nízká tolerance rostlin vůči toxickým polutantům
- Nízký transport polutantů z kořene do nadzemní části
- Vhodné rostliny jsou většinou velmi malé a rostou pomalu.
- Dlouhodobý proces (desítky až stovky let)
- Nebezpečí kontaminace potravního řetězce
- Účinnost – rostliny většinou akumulují jenom jeden druh kontaminantu, ale znečištění bývá směsí mnoha.

### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 MATERIÁL

##### 3.1.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Všechny použité chemikálie byly dodány v kvalitě p.a.

<b>Chemikálie</b>	<b>Dodavatel</b>	<b>Chemikálie</b>	<b>Dodavatel</b>
<b>MgSO<sub>4</sub> * 7 H<sub>2</sub>O</b>	PENTA chemicals	<b>NaNO<sub>3</sub></b>	PENTA chemicals
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	PENTA chemicals	<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	PENTA chemicals
<b>CaCl<sub>2</sub> * 2 H<sub>2</sub>O</b>	PENTA chemicals	<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	PENTA chemicals
<b>CaCl</b>	PENTA chemicals	<b>HCl</b>	PENTA chemicals
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> * 2 H<sub>2</sub>O</b>	PENTA chemicals	<b>HNO<sub>3</sub></b>	PENTA chemicals
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> * 12 H<sub>2</sub>O</b>	PENTA chemicals	<b>HClO<sub>4</sub></b>	PENTA chemicals
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> * 2 H<sub>2</sub>O</b>	PENTA chemicals	<b>MnSO<sub>4</sub> * 4 H<sub>2</sub>O</b>	PENTA chemicals
<b>ZnSO<sub>4</sub> * 7 H<sub>2</sub>O</b>	PENTA chemicals	<b>CuSO<sub>4</sub> * 5 H<sub>2</sub>O</b>	PENTA chemicals
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	PENTA chemicals	<b>NaOH</b>	PENTA chemicals
<b>KCl</b>	PENTA chemicals	<b>UO<sub>3</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> * 6 H<sub>2</sub>O</b>	Lachema n. p.
<b>FeSO<sub>4</sub> * 7 H<sub>2</sub>O</b>	PENTA chemicals	<b>Th(NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub> * 4 H<sub>2</sub>O</b>	Lachema n. p.
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub></b>	PENTA chemicals	<b>U<sub>3</sub>O<sub>8</sub></b>	SCP Science
<b>Putrescin</b>	Fluka	<b>Kyselina vinná</b>	Lachema n. p.
<b>Komplexon III</b>	PENTA chemicals	<b>SiO<sub>2</sub> amorfní</b>	RMI

### 3.1.2 ROSTLINY

#### 3.1.2.1 NICOTIANA TABACUM<sup>58</sup>

Tato jednoletá (v tropech i víceletá) bylina z čeledi lilkovité (Solanaceae) dorůstá výšky 80 – 300 cm. Má přímou, málo větvenou a na bázi dřevnatějící lodyhu. Listy přisedlé, pouze dolní krátce řapíkaté, až 60 cm dlouhé, vejčité až kopinaté. Květy rostou v koncových květenstvích, kvete v červnu až říjnu. Jde o kulturní rostlinu, která zřejmě vznikla spontánním křížením *N. sylvestris* a *N. tomentosa*. Původní rozšíření je Jižní Amerika (střední Andy), do Evropy dovezena v 16. století.



Obrázek 5: *N. tabacum*

Bylo použito celkem šest kultivarů *N. tabacum*: M 51, La Burley 21, Samsun, Xanthi, W 38 a SR1, ze kterých byly odvozeny GMO dle tabulky.

Kultivar	GMO	Kultivar	GMO
M 51	M 51 Pro <sup>59</sup>	La Burley 21	TR12 – T1 <sup>60</sup>
Xanthi	M II 6 <sup>61</sup>	Samsun	TR12 – T2 <sup>60</sup>
	M II 7 <sup>61</sup>		A <sup>62</sup>
	PA II 4 <sup>63</sup>		C <sup>62</sup>
	PA II 12 <sup>63</sup>	Xanthi	PC II 5 <sup>63</sup>
	PC II 3 <sup>63</sup>		PC II 6 <sup>63</sup>
	PC II 4 <sup>63</sup>		

### 3.1.2.2 NICOTIANA GLAUCA<sup>64</sup>

*N. glauca*, zvaná též stromový tabák, je až 5 metrů vysoký, řídký větvený keř. Má střídavé, celokrajné, řapíkaté a široce kopinaté listy. Květy ve vrcholových latách jsou pětičetné s trubkovou žlutou korunou. Původním domovem tohoto druhu je Jižní Amerika, druhotně se rozšířil na sever až do jižních států USA. Ve Středomoří je jako dekorativní rostlina vysazován v parcích, odkud často zplaňuje a šíří se na stanoviště ovlivněná člověkem. V řadě míst má jeho šíření invazivní charakter. Semena tohoto druhu byla získána P. Soudkem z planě rostoucí rostliny v Negevské poušti v Izraeli (Ohalim junction, Be'er Sheva).



Obrázek 6: *N. Glauca*

## 3.2 METODIKA

### 3.2.1 TEST TOXICITY

Pro stanovení toxicity byl použit test inhibice elongace kořene při klíčení semen čtyř rostlin – hořčice bílé (*Sinapis alba*), řeřichy (*Lepidium sativum*), okurky (*Cucumis sativa*) a salátu (*Lactuca sativa*).

Během testu byla semena všech čtyř rostlin vystavena koncentrační řadě uranu vždy ve čtyřech paralelních nasazeních. Do Petriho misek byl vložen filtrační papír kopírující tvarem dno misky se 17 pravidelně rozmístěnými otvory. Následně bylo do každé misky odměřeno 5 ml média dle tabulky s přidanou příslušnou koncentrací uranu nebo. Do otvorů bylo položeno 17 semen testovaných rostlin. Poté byly Petriho misky uzavřeny a ponechány 72 hodin v temném prostředí při laboratorní teplotě. Následně byla všem semenům pomocí milimetrového pravítka změřena délka kořenů. Z délek kořenů všech čtyř paralelních stanovení byl vypočítán aritmetický průměr délky kořenů. Porovnáním s kontrolou byla stanovena míra inhibice růstu kořenů pro dané koncentrace. Ze závislosti míry inhibice na koncentraci byla vypočtena hodnota EC 50 pro danou rostlinu.

Tabulka 3: Složení média pro test toxicity

Sloučenina	Hmotnost (mg) v 1 litru média
CaCl	220, 35
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	109, 8
NaHCO <sub>3</sub>	64, 8
KCl	5,8

### 3.2.2 KULTIVACE ROSTLIN

Rostliny byly kultivovány v hydroponickém médiu dle Hoaglanda.<sup>65</sup> Médium bylo připravováno ze zásobních roztoků ředěním destilovanou vodou a nebylo sterilizováno. Kultivace probíhala v uzavřené kultivační místnosti za stálé laboratorní teploty. Jako zdroj světla byly použity úsporné výbojky Plug & Grow pro růst o výkonu 250W. Světelný režim byl 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Výbojky byly rozmístěny tak, aby byla celá plocha rovnoměrně osvětlena a nemohlo dojít k ovlivnění růstu rostliny v důsledku jejího umístění. S rostlinami se nakládalo v souladu s vnitřními předpisy o nakládání s GMO.



Tabulka 4: Složení hydroponického média

Makroživiny (mg/l média)	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	369,7
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	348,51
	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	588,07
Fosfátový pufr pH 5,5 (mg/l média)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	291,73
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 12 H <sub>2</sub> O	46,56
	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	8,58
Mikroživiny (mg/l média)	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,06
	MnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	4,64
	ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,66
	CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	0,82
Železo (mg/l média)	FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	17,92
	NaNO <sub>3</sub>	339,98
Dusíkaté látky (mg/l média)	NH <sub>4</sub> Cl	213,97
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	160,09



Obrázek 7: Kultivace *N. tabacum* v hydroponických boxech

### 3.2.3 STANOVENÍ URANU

#### 3.2.3.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ K ANALÝZE

Při sklizni byly rostliny postupně omyty v destilované vodě, roztoku EDTA a znovu v destilované vodě, aby se předešlo případnému ovlivnění výsledku částicemi adsorbovanými na kořenovém systému. Následně byly dle požadavků pokusu nožem rozděleny na části, které byly vloženy do uzavíratelných plastických sáčků a popsány. Poté byly vzorky vloženy do mrazicího boxu s teplotou  $-24^{\circ}\text{C}$ , kde byly skladovány do doby lyofilizace. Lyofilizace probíhala za teploty  $-50^{\circ}\text{C}$  a tlaku 5 – 10 Pa do doby úplného vysušení. Do dalšího zpracování byly vzorky skladovány v suchém prostředí při laboratorní teplotě.

Vysušené vzorky byly váženy na analytických vahách a následně kvantitativně převedeny do mineralizačních zkumavek. Vzorky s vahou vyšší než 0,5 g byly homogenizovány a následně zmenšeny zhruba na tuto váhu, čímž se předcházelo případným problémům při mineralizaci. Před mineralizací bylo do každé zkumavky se vzorkem poloautomatickou pipetou přidáno 5 ml mineralizační směsi kyselin ve složení dle tabulky a zkumavky se nechaly minimálně dva dny stát v digestoři při laboratorní teplotě.

Tabulka 5: Složení směsi kyselin pro mineralizaci

Sloučenina	Objem v 1 l mineralizační směsi
$\text{HNO}_3$ 65%	830 ml
$\text{HClO}_4$ 60%	150 ml
$\text{H}_2\text{O}$	20 ml

Samotná mineralizace probíhala při teplotách  $60^{\circ}\text{C}$  –  $80^{\circ}\text{C}$  do doby, než došlo k rozložení rostlinného materiálu ve zkumavkách, minimálně však po čtyři hodiny. Poté se teplota v průběhu zhruba 2 hodin postupně zvyšovala až na  $195^{\circ}\text{C}$ , aby došlo k odpaření přebytku mineralizační směsi. Po vychladnutí byly vzorky ve zkumavkách zality 2,5 ml 20% HCl a zahřáty na  $80^{\circ}\text{C}$  po dobu 30 minut. Poté byl vzorek kvantitativně převeden do 15 ml plastových uzavíratelných zkumavek, doplněn destilovanou vodou na objem 10 ml a skladován při laboratorní teplotě do doby analýzy.

### 3.2.3.2 STANOVENÍ URANU VE VZORCÍCH

Obsah uranu ve vzorcích byl stanoven pomocí spektrofotometru FLUORAT 02 – 2M. Metoda je založena na měření intenzity fosforescence uranových iontů excitovaných UV zářením při vlnové délce  $\lambda = 530$  nm. Jako zesilovač záření se používá roztok křemičitanu sodného o pH 8 – 10. Pro odstranění rušivých vlivů způsobených rychlou fluorescencí doprovodných složek matrice se využívá odečet signálu v přesně definovaném časovém úseku po excitačním pulzu výbojky (time resolving mode).

#### 3.2.3.2.1 PŘÍPRAVA POMOCNÝCH ROZTOKŮ

Na roztok pro zesílení fosforescence bylo do 250 ml fluoroplastové nádoby naváženo 14 g amorfního  $\text{SiO}_2$  a zalito 100 ml roztoku NaOH o koncentraci 52 g / l demineralizované vody. Výsledná směs byla po promíchání vložena do ultrazvukové lázně, kde byla zahřívána na 75°C - 80°C do doby, kdy z roztoku zmizel veškerý zákal, minimálně však po dobu 5 hodin. Po celou dobu zahřívání byla kontrolována hladina v nádobce a případný pokles způsobený výparem byl eliminován doléváním demineralizované vody z kádinky. Hotový roztok byl přelit do 250 ml fluoroplastové lahvičky s uzávěrem, kde byl skladován do doby použití, maximálně však po dobu jednoho měsíce.

Kalibrační roztoky uranu o koncentracích 100 000, 10 000, 1000, 100, 10 a 0  $\mu\text{g/l}$  byly připravovány ze standardního roztoku uranu o koncentraci 1g / l v 7%  $\text{HNO}_3$  jeho postupným ředěním 7% HCl do 10 ml baněk za použití 1 ml dělené pipety. Jako slepý roztok sloužila pouze 7% HCl. Trvanlivost 100 000  $\mu\text{g/l}$  roztoku byla 14 dnů, zbylé roztoky bylo nutno připravovat před každou kalibrací znovu. Všechny použité nádoby byly před dalším použitím louhovány ve 20%  $\text{HNO}_3$ .

#### 3.2.3.2.2 KALIBRACE PŘÍSTROJE

Přístroj byl nastaven dle tabulky a spuštěn minimálně 15 minut před plánovaným začátkem měření a přepnut do módu kalibrace.

Parametr přístroje	Hodnota
Režim měření	Fosforescence
Strobe delay	300 $\mu\text{s}$

Strobe duration	400 $\mu$ s
Sensitivity	Medium
Ref. Chan	ON
Abs. Chan	ON
Excitační kanál	Filtr č. 1
Emisní kanál	Filtr č. 8

Tabulka 6: Nastavení přístroje Fluorat 02 - 2M

Pro kalibraci přístroje byla užitá řada kalibračních roztoků o koncentracích 0, 10, 100, 1000 a 10 000  $\mu$ g/l. Do připravených 15 ml plastových zkumavek se zkoseným dnem bylo postupně odpipetováno 5 ml roztoku NaOH o koncentraci 8,7 g / l, 0,5 ml příslušného kalibračního roztoku a 0,5 ml roztoku křemičitanu a celá směs krátce promíchána.

Po přelití vzorku do kyvety a vložení do přístroje bylo nutné počkat minimálně 3 minuty na stabilizaci vnitřního prostředí a poté byla 5x změřena odezva přístroje a z pořízených hodnot vypočítán aritmetický průměr. Po proměření všech koncentrací (byly užity dvě kyvety – jedna pro měření slepého vzorku a druhá pro měření kalibračních koncentrací) byly získané hodnoty uloženy do paměti přístroje jako kalibrační přímka a přístroj byl připraven ke stanovování vzorků.

### 3.2.3.2.3 STANOVENÍ VZORKŮ

Zkalibrovaný přístroj byl zapnut minimálně 15 minut před začátkem měření a nastaven do módu měření (measurement). Do 15 ml plastových zkumavek bylo odpipetováno 5 ml roztoku NaOH o koncentraci 8,7 g / l a 0,5 ml vzorku. Těsně před vlastním měřením bylo přidáno i 0,5 ml roztoku křemičitanu a celá směs krátce promíchána. Poté byl vzorek v kyvetě vložen do přístroje a po třech minutách byla provedena tři měření koncentrace krátce po sobě. Výsledná koncentrace byla zapsána jako aritmetický průměr těchto tří měření. Během výměny vzorků byla kyveta vymývána destilovanou vodou ze stříčky a po skončení měření louhována v 20%  $\text{HNO}_3$ .

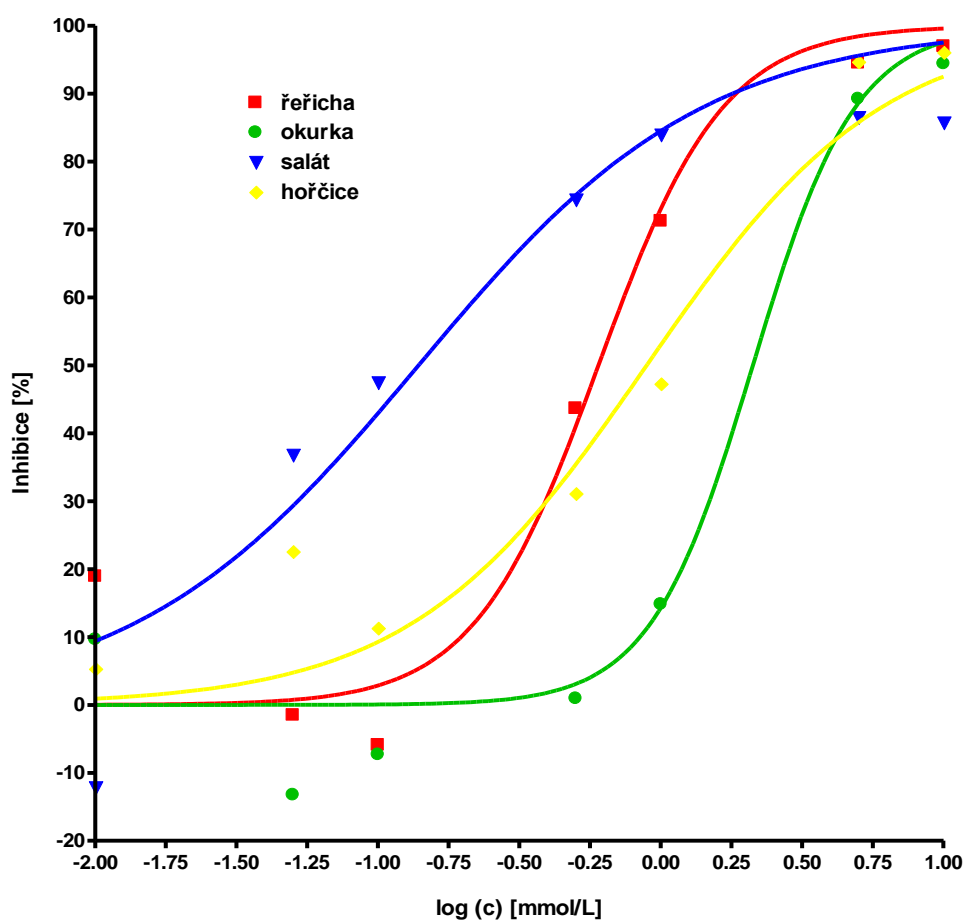
## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 TEST TOXICITY

Dle postupu popsaného v kapitole 3.2.2 byla semena hořčice, okurky, řeřichy a salátu vystavena koncentrační řadě roztoků uranu (0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 a 10 mM).

Tabulka 7: Hodnoty EC50 (mM)

Prvek	Řeřicha	Okurka	Salát	Hořčice
Uran	0,603	2,119	0,139	0,892

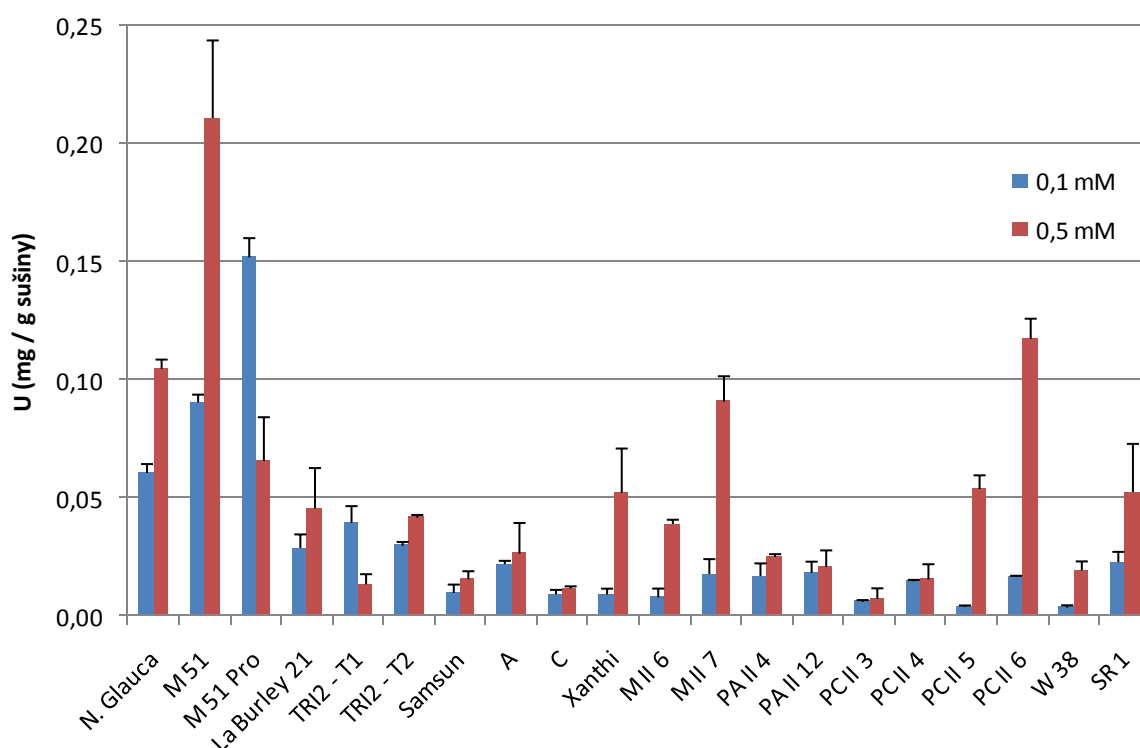


Graf 1: Závislost inhibice růstu kořenů na koncentraci uranu

Uran byl nejméně toxický vůči semenům okurky a nejvíce toxický pro semena salátu. Hodnoty EC 50 se pohybovaly v rozmezí 0,139 – 2,119 mM. Ze zjištěných koncentrací vyplývá, že zvolené koncentrační rozpětí pro další experimenty ( 0,05 – 1 mM) zřejmě nebude pro vzrostlé rostliny letální.

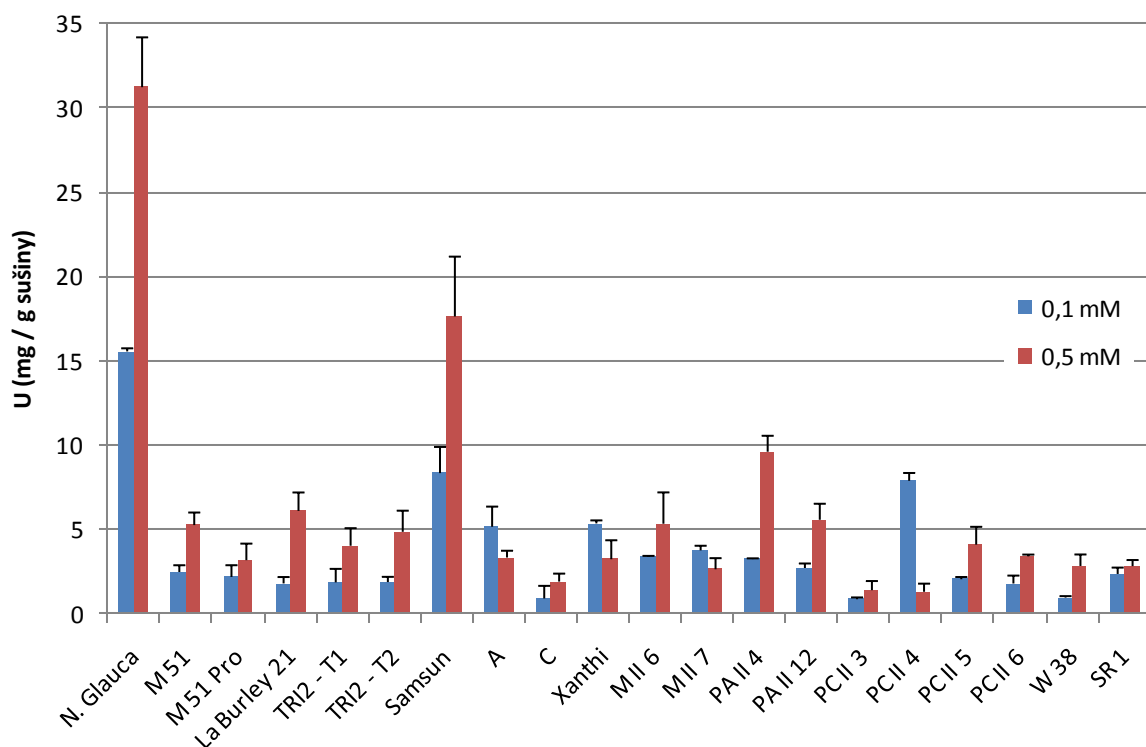
## 4.2 AKUMULACE ROSTLINAMI *NICOTIANA* SP.

Předpěstované rostliny *N. glauca* a *N. tabacum* byly kultivovány v hydroponickém médiu s přídavkem uranu 0,1 a 0,5 mM. Kultivace probíhala v boxech pro hydroponické pěstování rostlin, v každém 2l boxu bylo umístěno celkem 12 rostlin. Po osmi dnech byly sklizeny, rozděleny na kořen a nadzemní část a analyzovány. Pro každý kultivar a každou koncentraci byly k dispozici 4 rostliny.



Graf 2: Akumulace U v nadzemní části

Koncentrace uranu v nadzemní části rostlin (Graf 2) se pohybovaly v rozmezí od 0,004 do 0,15 mg / g sušiny pro koncentraci uranu v roztoku 0,1 mM a od 0,008 do 0,21 mg / g sušiny pro koncentraci 0,5 mM. Nejvyšší akumulace v nižší koncentraci byla zjištěna u GMO M 51 Pro (0,15 mg/g), ve vyšší koncentraci pak u kultivaru M 51 (0,21 mg/g). V kořenech (Graf 3) byla nejvyšší koncentrace zjištěna u *N. glauca* (15,56 mg / g sušiny pro 0,1 mM roztok a 31,24 mg / g sušiny pro 0,5 mM roztok) a *N. tabacum* cv. Samsun (8,35 a 17,64 mg / g sušiny).



Graf 3: Akumulace U v kořenech

Tento pokus sloužil jako screening pro zjištění, které kultivary a GMO budou nejvhodnější pro další pokusy s akumulací. GMO byly vybrány pro své specifické vlastnosti. M 51 Pro byl upraven, aby produkoval více volného prolinu.<sup>59</sup> U rostlin TRI2 byla zvýšena exprese tří genů kódujících proteiny zodpovědné za tvorbu fytochelatinů, polypeptidů schopných vázání těžkých kovů.<sup>60</sup> U rostlin A a C bylo pomocí genu z kvasnic *Schizosaccharomyces pombe* dosaženo zrychlení metabolismu, takže rostliny předčasně vykvétaly.<sup>62</sup> Rostliny M II byly modifikovány genem z rostlin *Arabidopsis thaliana* kódujícím syntézu mebránového transportéru MRP7.<sup>61</sup> U rostlin PA II a PC II byly do kultivaru Xanthi vneseny geny kódující enzym fytochelatin syntázu (PCS) z rostliny *A. thaliana* (PA II) a hádátka obecného *Caenorhabditis elegans* (PC II).<sup>63</sup>

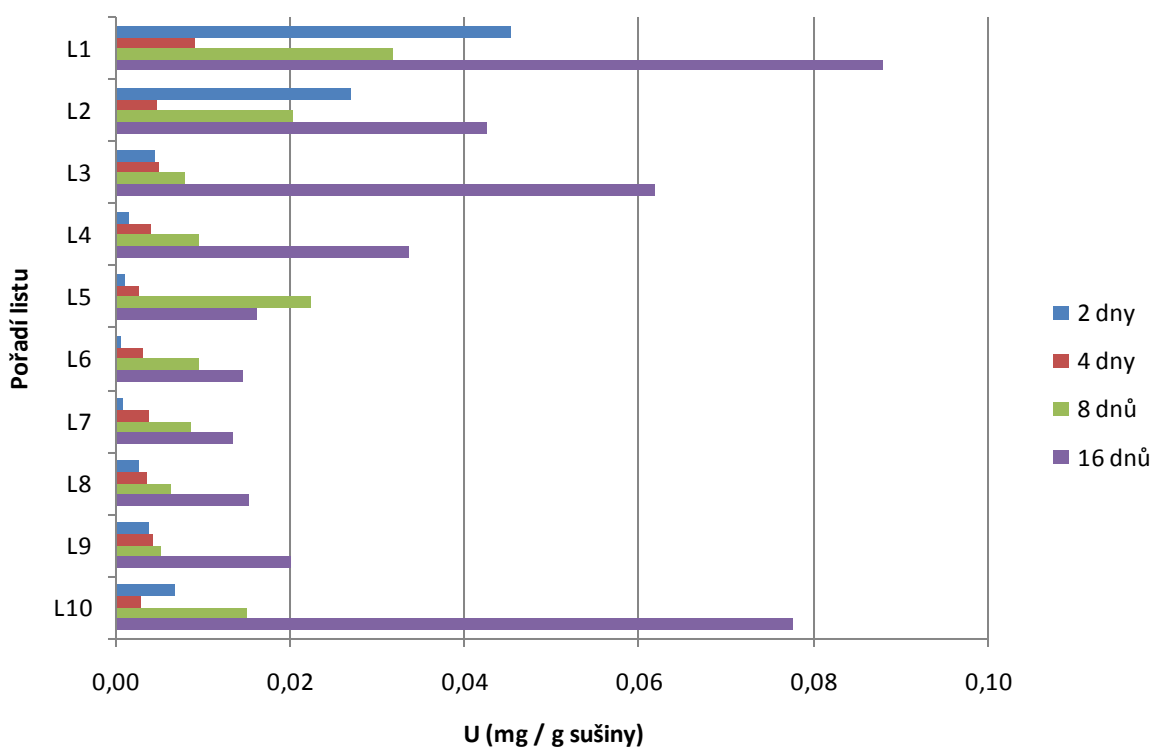
V nadzemních částech rostlin měl výrazný příznivý efekt na akumulaci uranu z 0,1 mM média prakticky pouze nadbytek prolinu v rostlinách M 51 Pro. Ve vyšší koncentraci se příznivě projeví zejména modifikace u rostlin M II 7 a PC II 6. U koncentrací v kořenech rostlin byly rozdíly mezi kultivary a jejich geneticky modifikovanými variantami až na pár výjimek (Samsun / A, C ; Xanthi - PA II 4, PC II 4) minimální.

Jako nejvhodnější rostliny pro další pokusy se jevíly *N. glauca*, *N. tabacum* cv. M 51 a GMO M 51 pro, bohužel pro nedostatek semen je nebylo možné použít, takže bylo pro další pokusy použito rostlin *N. tabacum* cv. La Burley 21 a GMO TRI2 – T1 a TRI2 –T2

#### 4.3 AKUMULACE A TRANSLOKACE V ROSTLINÁCH *N. TABACUM*

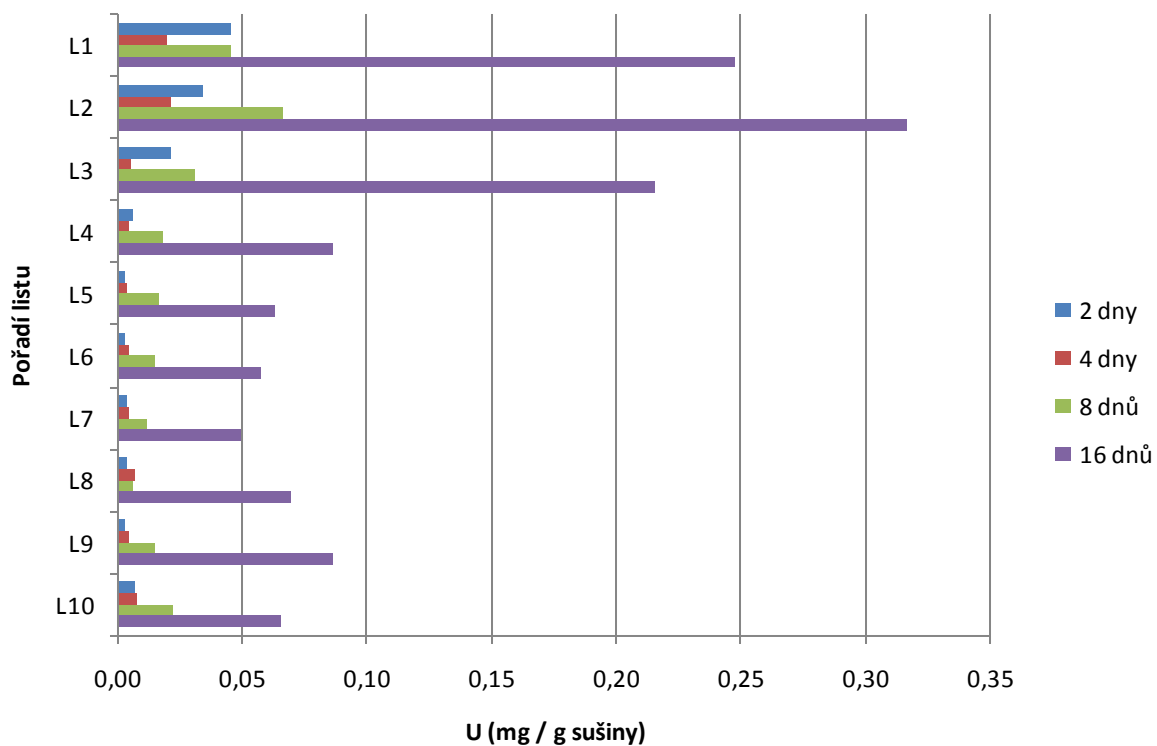
Předpěstované rostliny *N. tabacum* cv. La Burley 21 a GMO TRI – 2 – T1 a TRI – 2 – T2 byly kultivovány v hydroponickém médiu s přidavkem uranu 0,05, 0,25, 0,5 a 1 mM. Kultivace probíhala v Erlenmayerových baňkách o objemu 300 ml, které byly obaleny hliníkovou folií. Rostliny byly sklizeny po 2, 4, 8 a 16 dnech, přičemž každý čtvrtý den jim bylo kompletně vyměněno médium. Při sklizni byly rostliny rozděleny na kořen, stonk a jednotlivé listy. Byly sklizeny vždy tři rostliny od každého druhu pro každý čas a koncentraci.

##### 4.3.1 TABÁK LA BURLEY 21

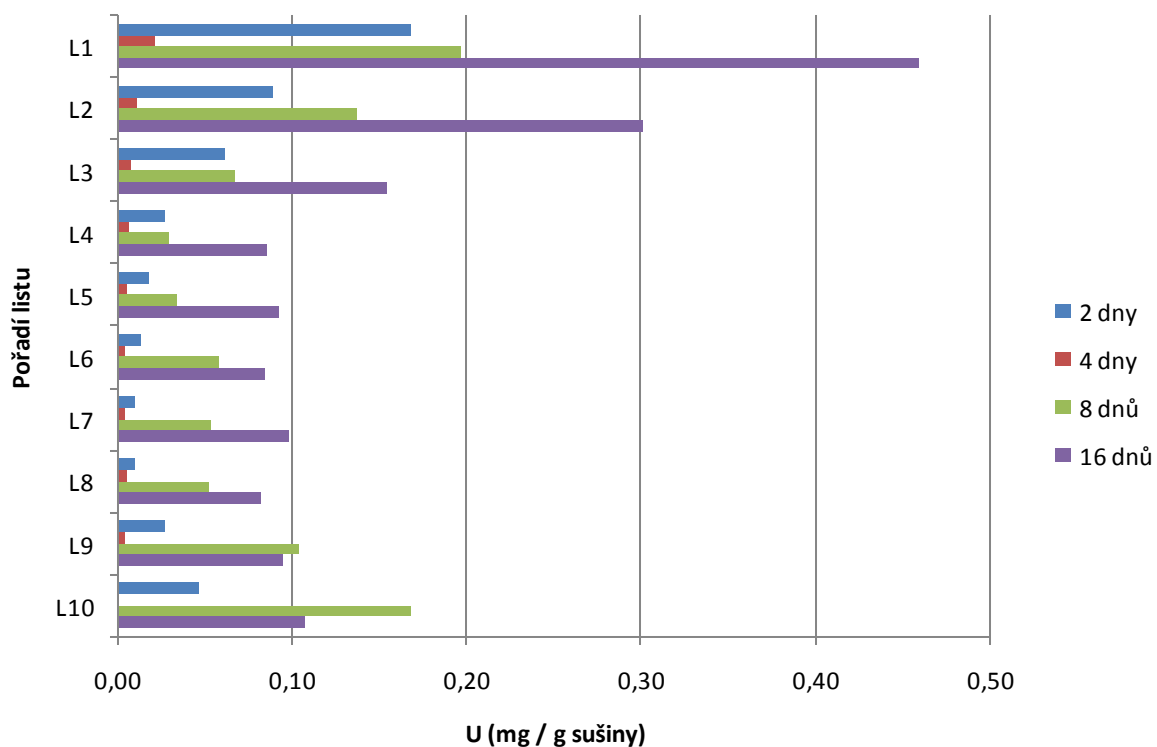


Graf 4: Akumulace uranu v listech tabáku La Burley 21 rostoucím na médiu s koncentrací uranu 0,05 mM

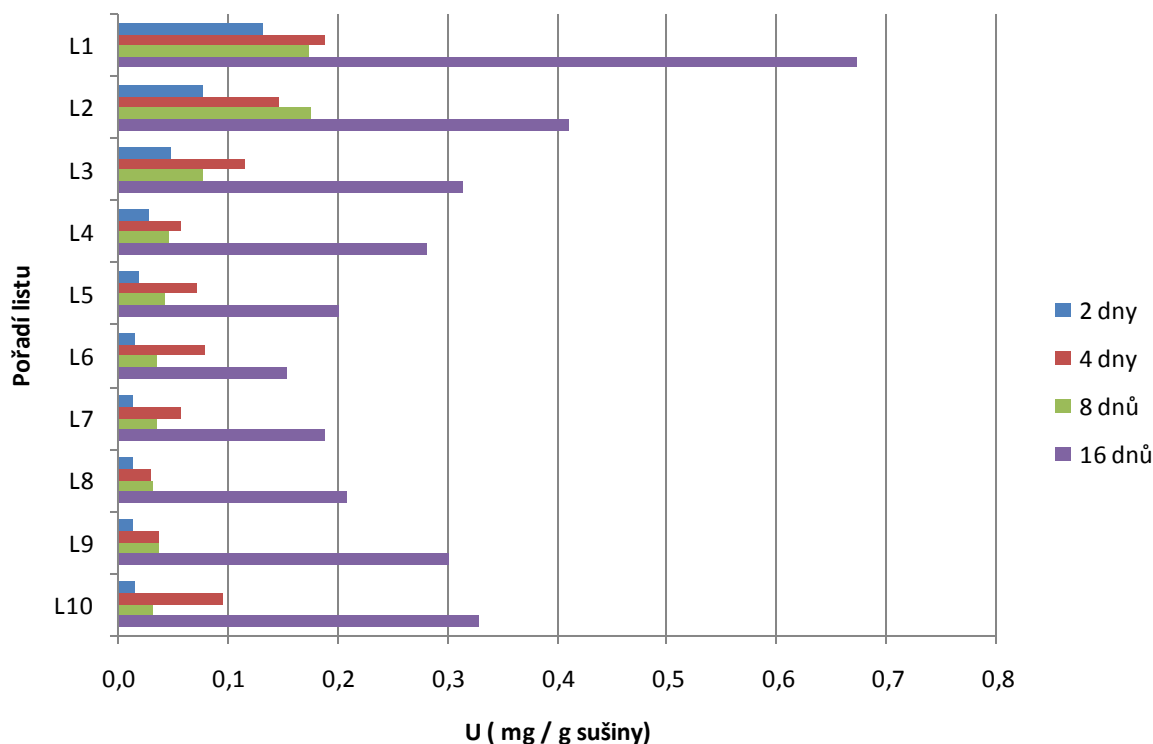




Graf 5: Akumulace uranu v listech tabáku La Burley 21 rostoucím na médiu s koncentrací uranu 0,25 mM

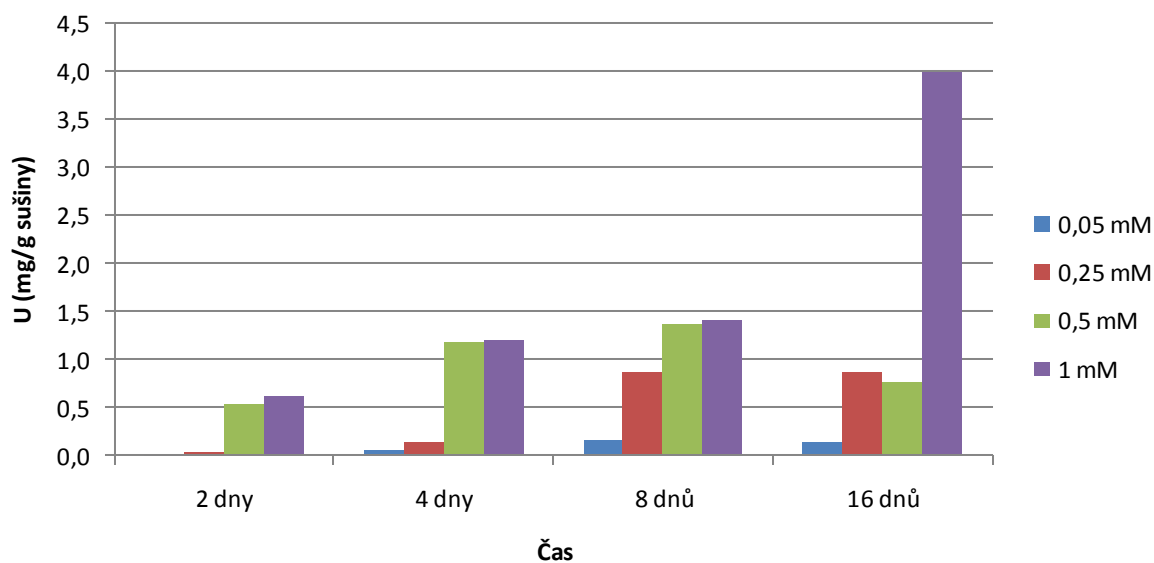


Graf 6: Akumulace uranu v listech tabáku La Burley 21 rostoucím na médiu s koncentrací uranu 0,5 mM.



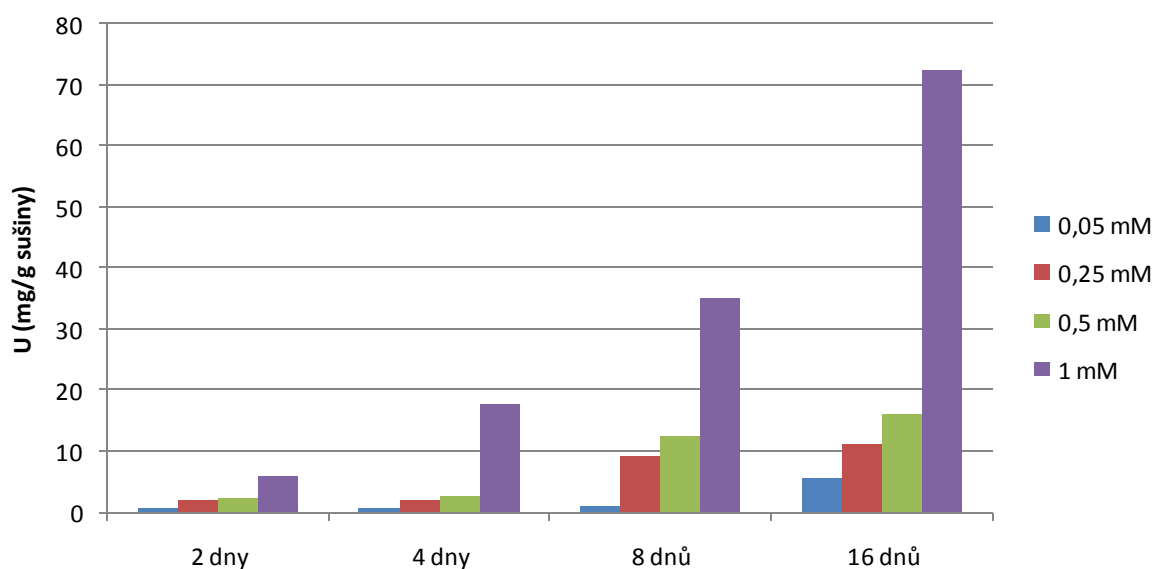
Graf 7: Akumulace uranu v listech tabáku La Burley 21 rostoucím na médiu s koncentrací uranu 1 mM

Při koncentraci uranu v médiu 0,05 mM (Graf 4) byl uran akumulován především v horních listech rostlin, s postupem času ovšem narůstala jeho koncentrace i v listech spodních. Koncentrace v listech po poklesu mezi 2. a 4. dnem v dalším průběhu kultivace rostly. Nejvyšší naměřená koncentrace činila 0,09 mg/g sušiny (16. den v nejvyšších listech). V rostlinách kultivovaných v médiu o koncentraci 0,25 mM (Graf 5) byl uran akumulován převážně v horních listech. Po poklesu koncentrace mezi 2. a 4. dnem následoval její růst, který byl mezi 8. a 16. dnem velmi výrazný. Nejvyšší koncentrace byla naměřena 16. den v listech těsně pod vrcholem rostlin (0,32 mg/g sušiny). Při koncentraci uranu v médiu 0,5 mM (Graf 6) se po velkém poklesu mezi 2. a 4. dnem koncentrace uranu v listech po zbytek kultivace zvyšovala. Uran byl akumulován převážně v horních a v menší míře i ve spodních listech rostlin. Nejvyšší koncentrace byla naměřena 16. den kultivace v nejvyšších listech (0,46 mg/g sušiny). V médiu o nejvyšší koncentraci (Graf 7) následoval po růstu během prvních čtyř dní mezi 4. a 8. dnem mírný pokles a následně prudký vzestup koncentrace uranu v listech. Uran byl akumulován převážně v horních listech, ovšem v průběhu kultivace vzrůstala i koncentrace v listech spodních. Nejvyšší koncentrace (0,67 mg/g sušiny) byla naměřena po 16 dnech v nejvyšším listu rostlin.



Graf 8: Akumulace uranu ve stoncích La Burley 21

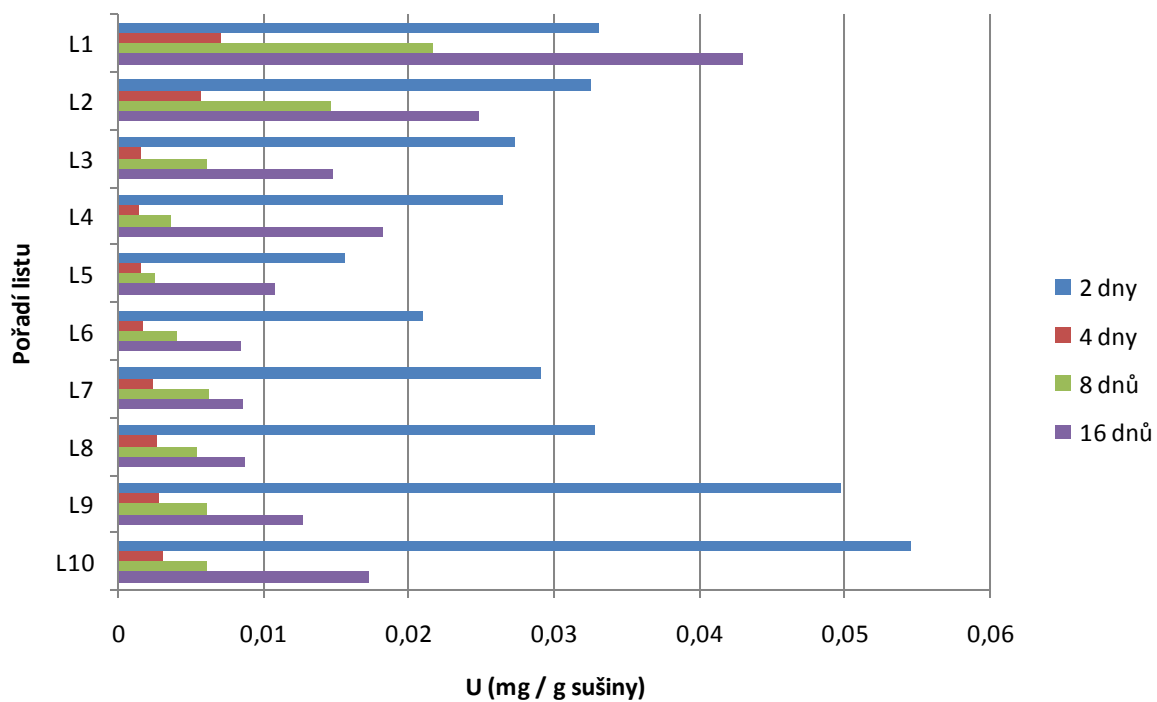
Koncentrace uranu ve stoncích (Graf 8) během kultivace vzrůstala až do osmého dne. Mezi osmým a šestnáctým dnem došlo u třech nižších koncentrací k poklesu, který byl nejvýraznější u koncentrace 0,5 mM (z 1,36 na 0,76 mg / g sušiny). U nejvyšší koncentrace naopak došlo k výraznému nárůstu (z 1,42 na 3,99 mg / g sušiny).



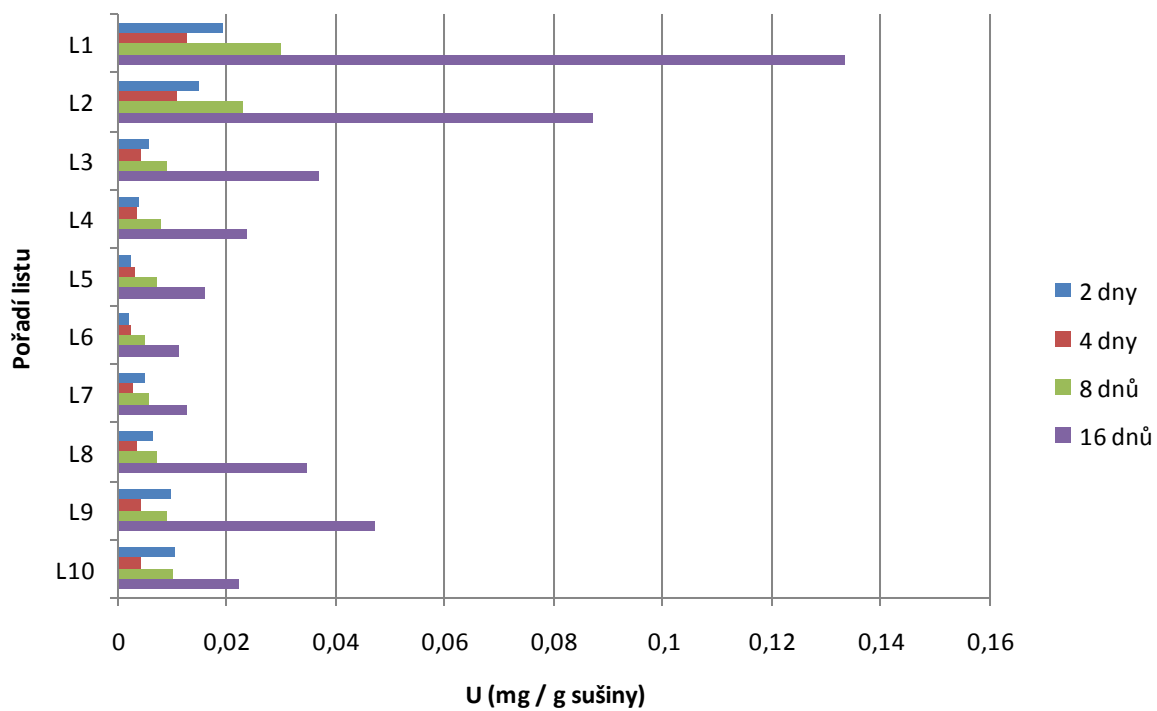
Graf 9: Akumulace uranu v kořenech La Burley 21

Koncentrace uranu v kořenech (Graf 9) během kultivace plynule stoupala až na 5,48 mg / g u koncentrace 0,05 mM, 11,08 mg/g u koncentrace 0,25 mM, 16,16 mg/g u koncentrace 0,5 mM a 72,49 mg/g u koncentrace 1 mM.

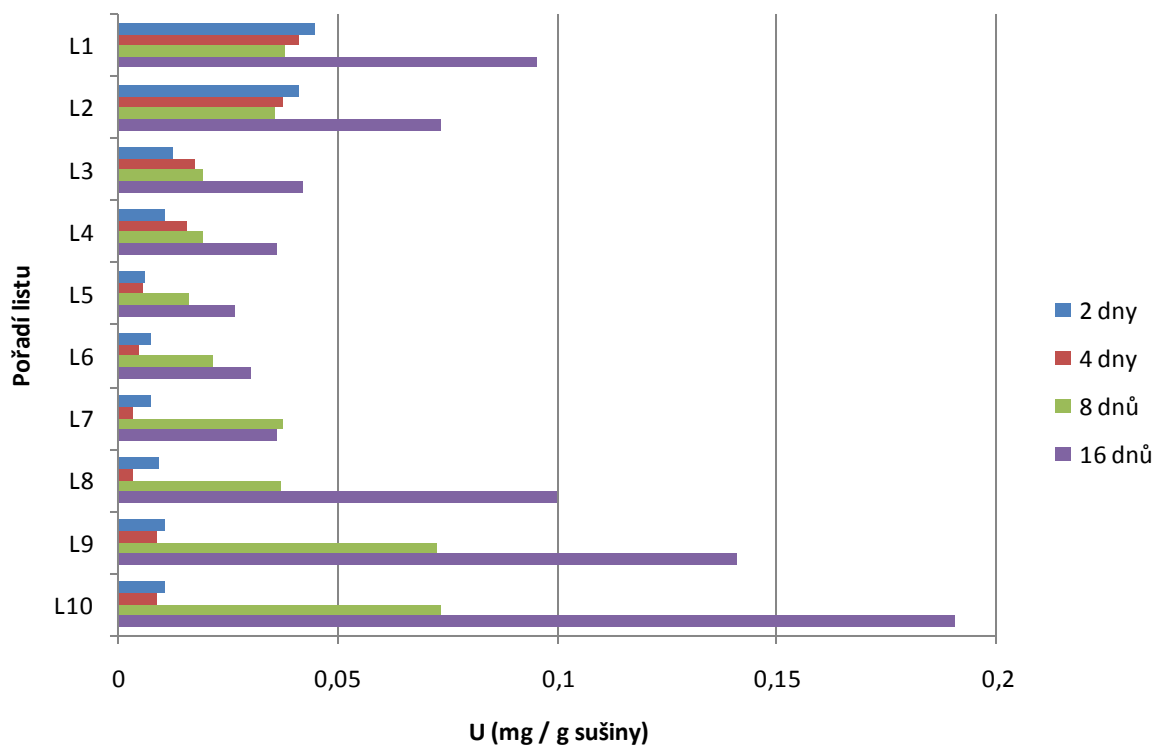
### 4.3.2 TABÁK TRI2 – T1



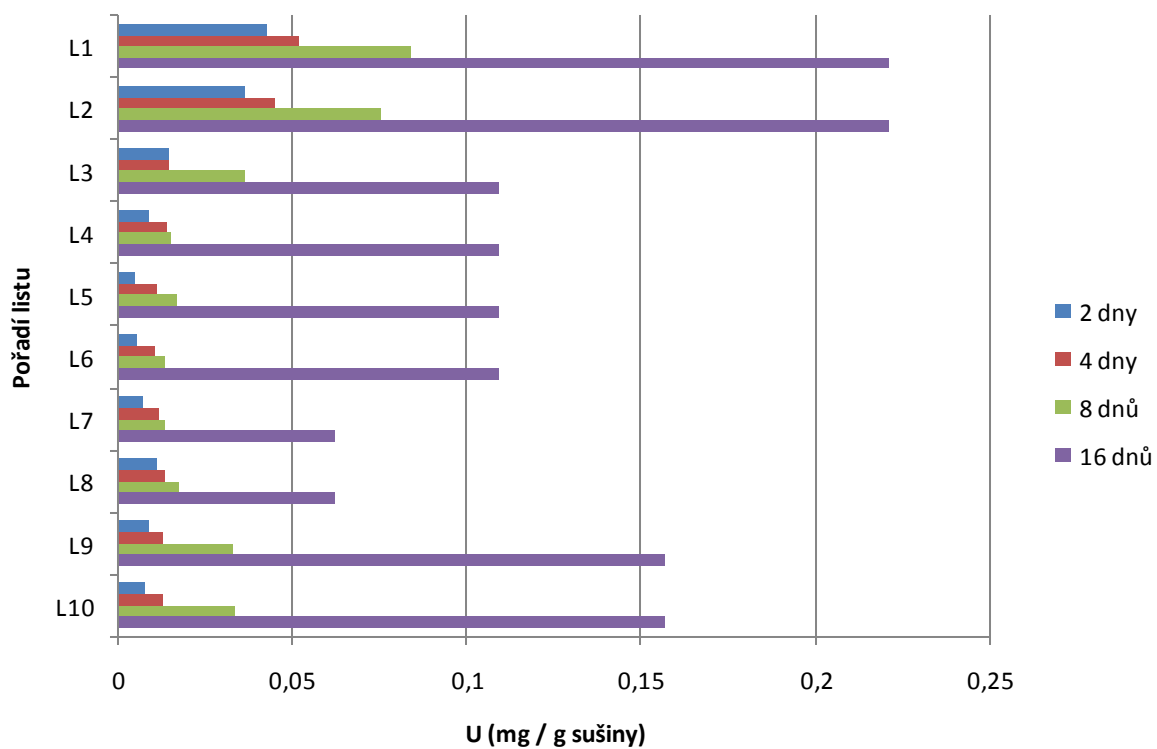
Graf 10: Akumulace uranu v listech tabáku TRI2 – T1 rostoucím na médiu s koncentrací uranu 0,05 mM



Graf 11: Akumulace uranu v listech tabáku TRI2 – T1 rostoucím na médiu s koncentrací uranu 0,25 mM



Graf 12: Akumulace uranu v listech tabáku TRI2 – T1 rostoucím na médiu s koncentrací uranu 0,5 mM

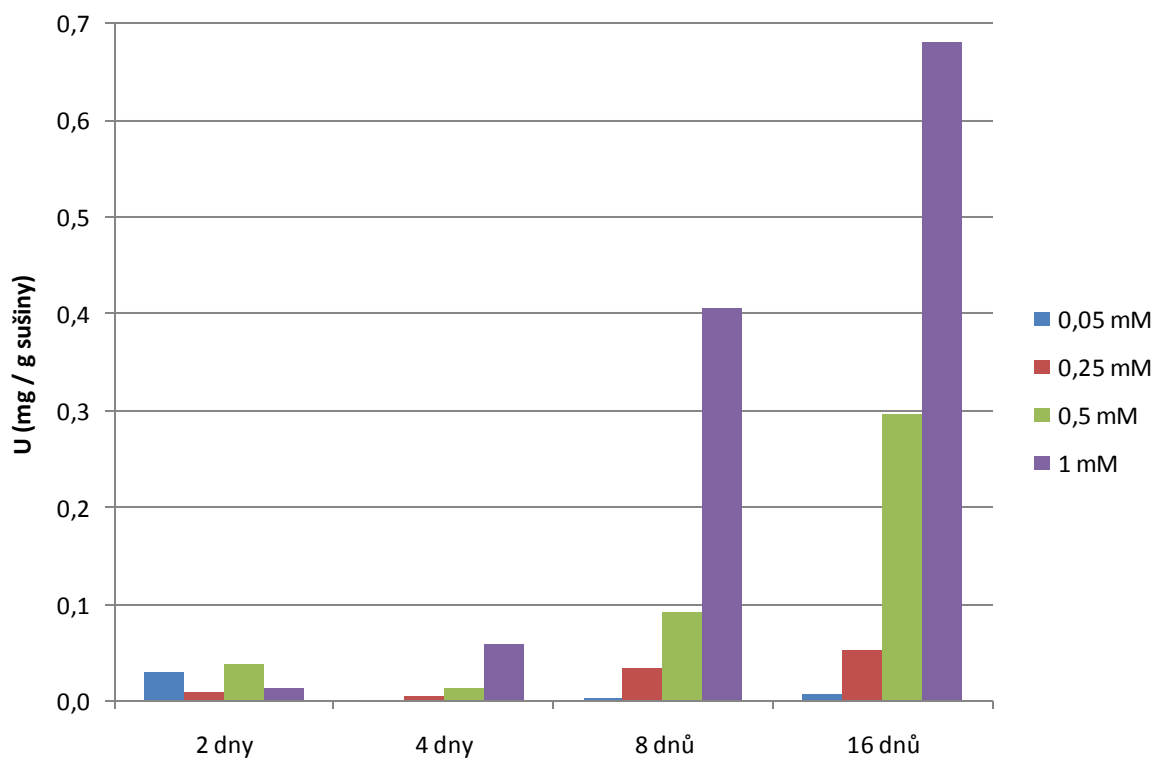


Graf 13: Akumulace uranu v listech tabáku TRI2 – T1 rostoucím na médiu s koncentrací uranu 1 mM

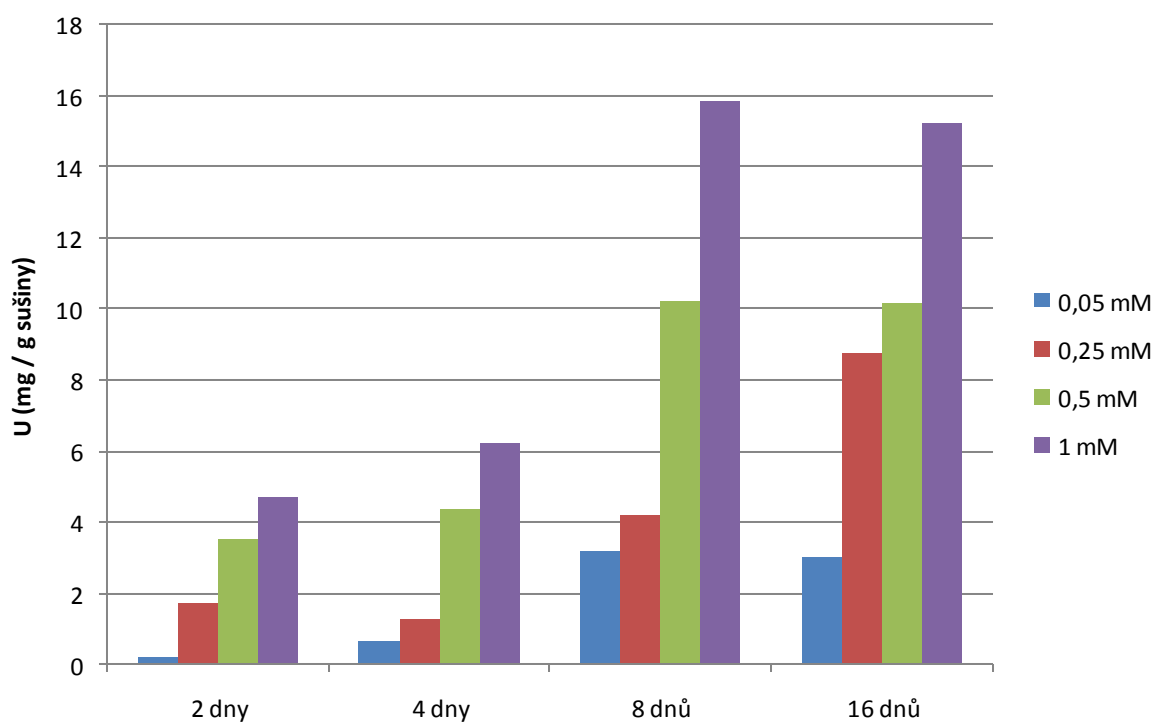
V rostlinách kultivovaných v médiu s nejnižší koncentrací (Graf 10) byl uran akumulován zpočátku v nejnižších listech, s postupem času vzrůstal jeho podíl v listech nejvyšších. Po velmi výrazném poklesu koncentrace mezi 2. a 4. dnem docházelo v dalším průběhu kultivace k plynulému nárůstu, ovšem hodnot z druhého dne nebylo, s výjimkou nejvyššího listu, dosaženo. Nejvyšší koncentrace byla naměřena ve spodním listu 2. den (0,055 mg /g sušiny). U rostlin kultivovaných v médiu s koncentrací uranu 0,25 mM (Graf 11) bylo nejvíce uranu akumulováno v horních listech, postupem času ovšem rostla i koncentrace v listech spodních. Po poklesu mezi 2. a 4. dnem koncentrace uranu po zbytek kultivace rostla. Nejvyšší naměřená hodnota činila 0,13 mg/g sušiny šestnáctý den v nejvyšším listu. Při koncentraci uranu v médiu 0,5 mM byl uran v prvních čtyřech dnech akumulován převážně v horních listech, mezi druhým a čtvrtým dnem došlo k poklesu jeho koncentrace. Od čtvrtého dne kultivace dál vzrůstala koncentrace převážně v listech spodních. Nejvyšší naměřená koncentrace činila 0,19 mg/g 16. den v nejnižším listu. V médiu s nejvyšší koncentrací uranu (Graf 13) koncentrace v listech v průběhu kultivace plynule rostla, mezi 8. a 16. dnem skokově. Uran byl akumulován převážně v horních listech, s přibývajícím časem ovšem rostla i koncentrace v listech spodních. Nejvyšší naměřená koncentrace činila 0,22 mg/g 16. den v horních listech.

Koncentrace uranu ve stoncích (Graf 14) po mírném poklesu či stagnaci mezi druhým a čtvrtým dnem po zbytek kultivace plynule rostla. Nejvyšší dosažené koncentrace činily 0,03 mg/g sušiny pro koncentraci média 0,05 mM (druhý den), 0,05 mg/g pro koncentraci 0,25 mM, 0,3 mg/g pro koncentraci 0,5 mM a 0,7 mg/g pro koncentraci 1 mM (všechny 16. den)

Koncentrace uranu v kořenech (Graf 15) všech rostlin plynule rostly až do osmého dne. Mezi osmým a šestnáctým dnem došlo u všech rostlin, s výjimkou těch kultivovaných v 0,25 mM médiu, k mírnému poklesu koncentrace uranu. Nejvyšší hodnoty činily 3,2 mg/g pro 0,05 mM médium, 8,8 mg/g pro 0,25 mM médium, 10,2 mg/g pro 0,5 mM médium a 15,9 mg/g pro 1 mM médium.

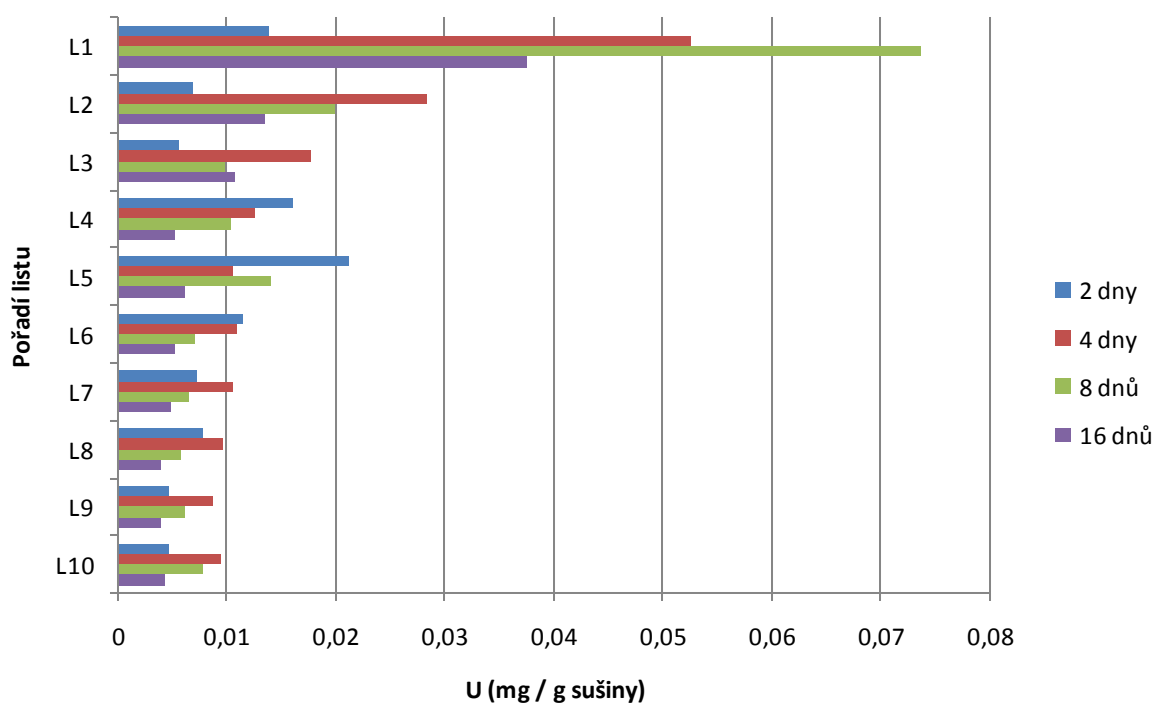


Graf 14: Akumulace uranu ve stoncích tabáku TR12 - T1

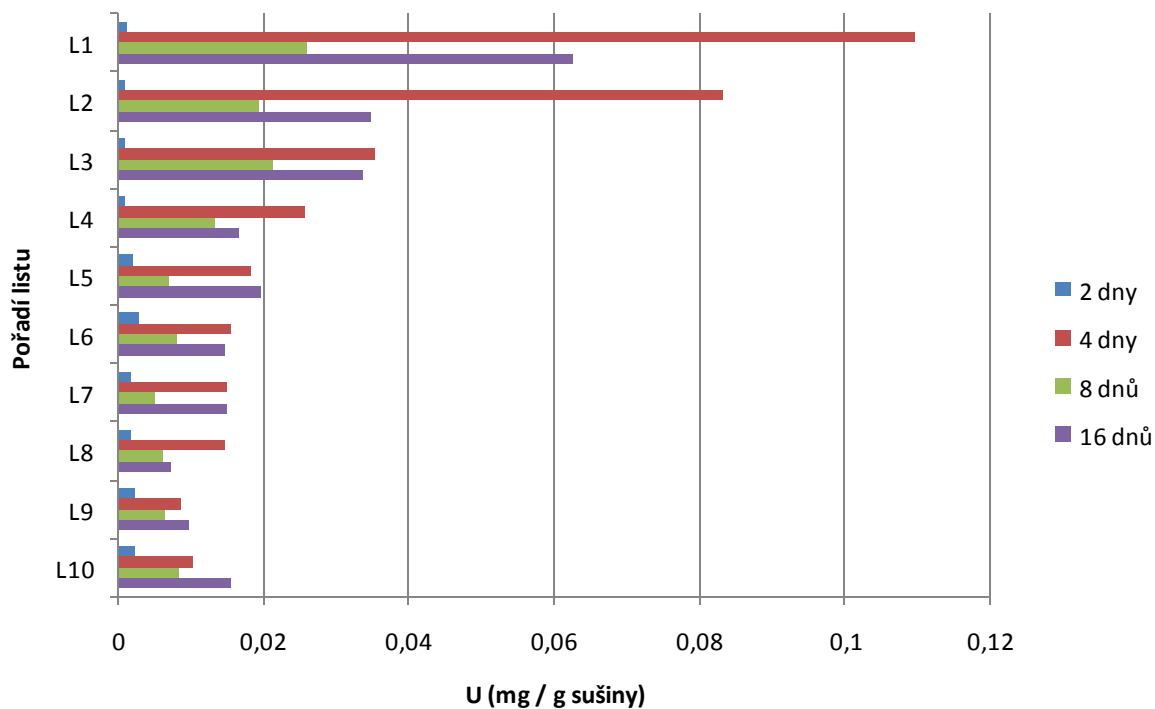


Graf 15: Akumulace uranu v kořenech tabáku TR12 - T1

### 4.3.3 TABÁK TRI2 – T2

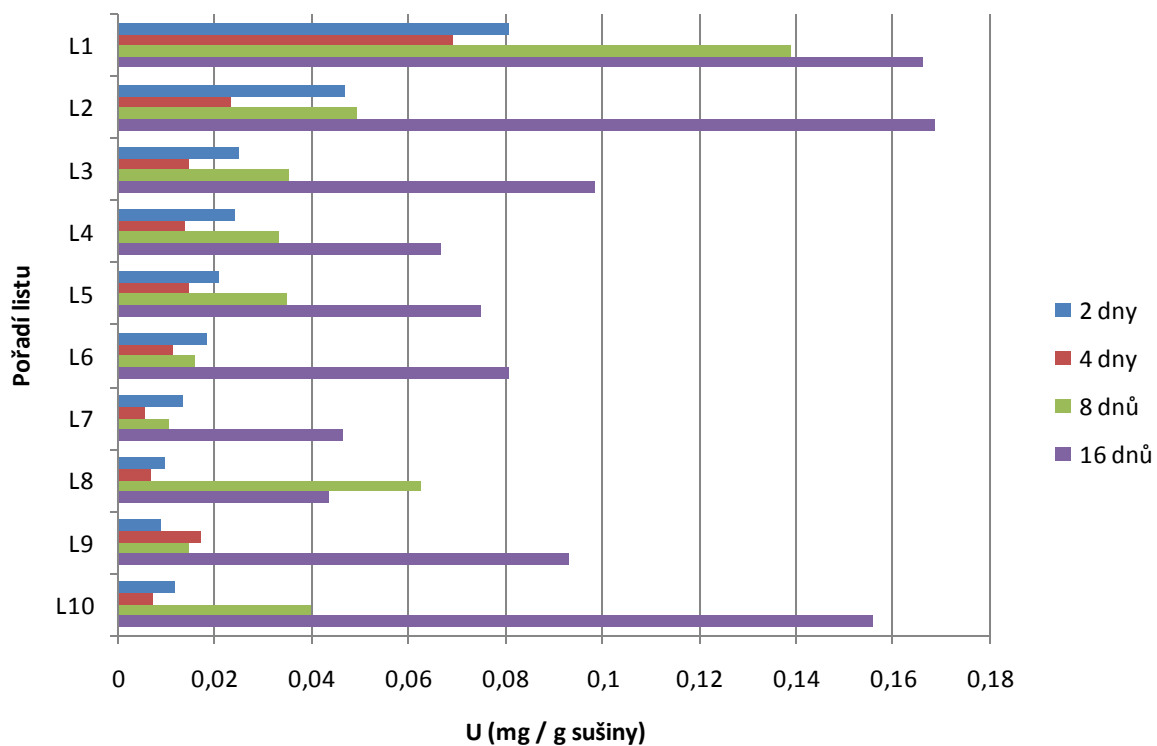


Graf 16: Akumulace uranu v listech tabáku TRI2 - T2 rostucím na médiu s koncentrací uranu 0,05 mM

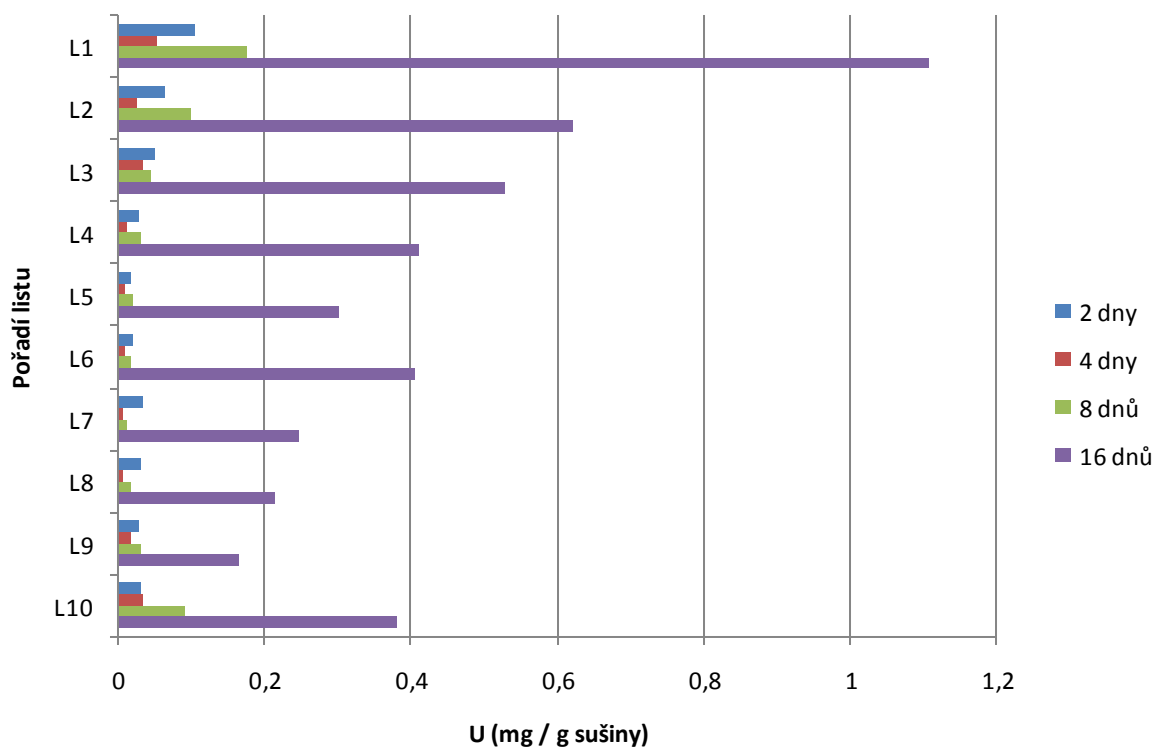


Graf 17: Akumulace uranu v listech tabáku TRI2 - T2 rostucím na médiu s koncentrací uranu 0,25 mM





Graf 18: Akumulace uranu v listech tabáku TRI2 - T2 rostoucím na médiu s koncentrací uranu 0,5 mM

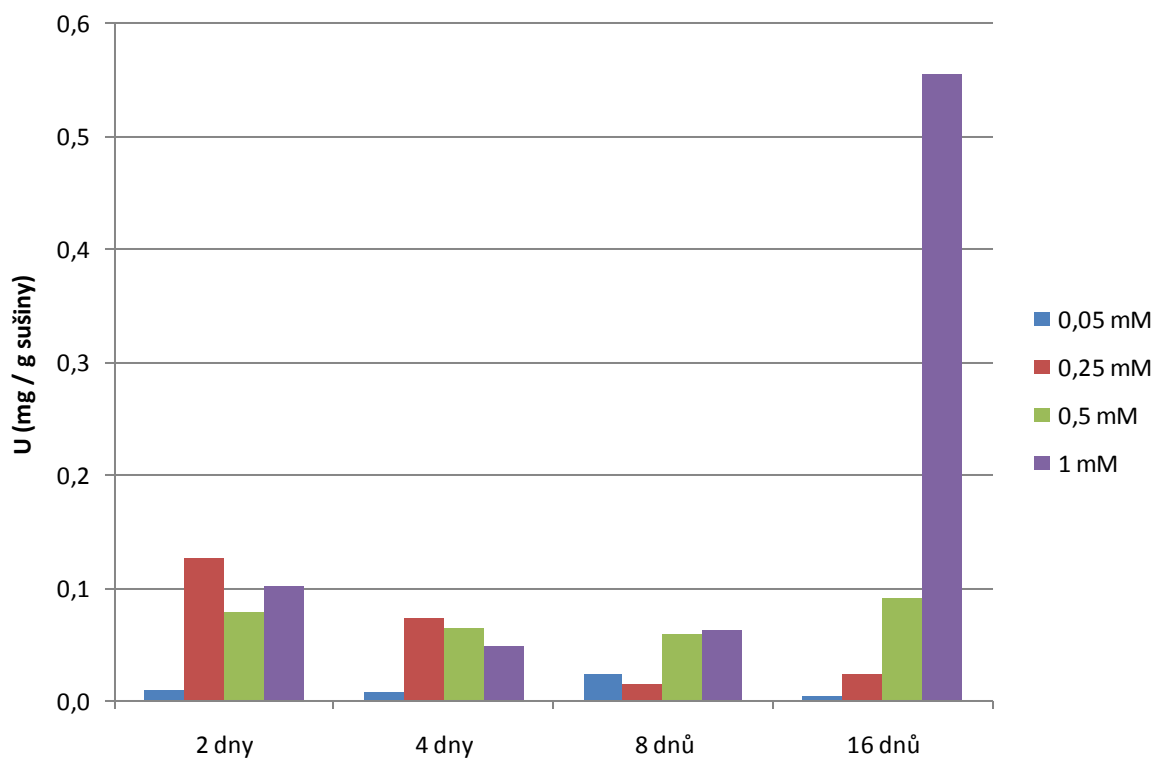


Graf 19: Akumulace uranu v listech tabáku TRI2 - T2 rostoucím na médiu s koncentrací uranu 1 mM

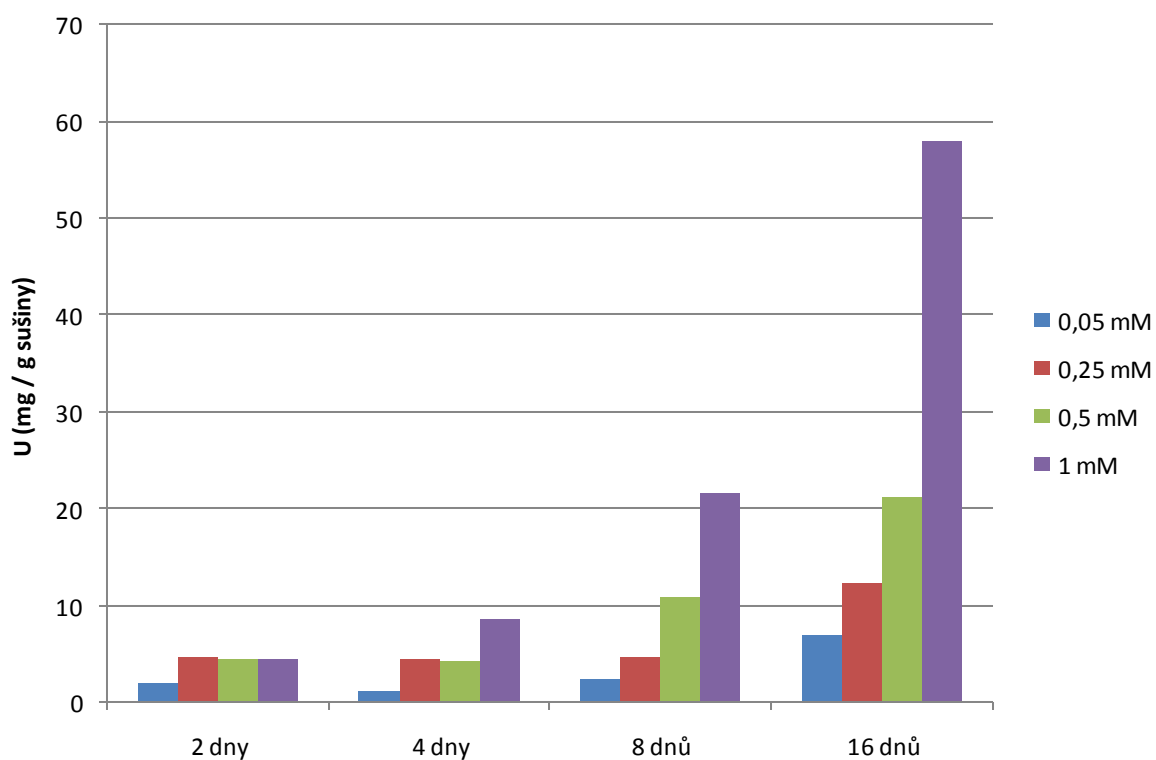
Při kultivaci v 0,05 mM médiu (Graf 16) byl uran akumulován hlavně v horních listech, směrem dolů jeho koncentrace klesala. Až do osmého dne vykazovala jeho koncentrace plynulý růst, mezi osmým a šestnáctým dnem došlo k poklesu. Nejvyšší naměřená koncentrace činila 0,07 mg/g sušiny osmý den v nejvyšším listu. V médiu o koncentraci 0,25 mM (Graf 17) došlo po skokovém nárůstu koncentrací mezi 2. a 4. dnem k velkému poklesu a následně mírnému růstu koncentrace. Uran byl akumulován převážně v horních listech, nejvyšší naměřená koncentrace činila 0,11 mg/g v horním listu čtvrtý den. U rostlin kultivovaných v 0,5 mM médiu (Graf 18) došlo po mírném poklesu koncentrace mezi druhým a čtvrtým dnem k nárůstu koncentrací. Uran byl akumulován převážně v horních listech, s postupem času ovšem vzrůstala koncentrace i v listech spodních. Nejvyšší zjištěná koncentrace činila 0,17 mg/g v horních a 0,15 mg/g ve spodních, obě v 16. den. V médiu o nejvyšší koncentraci (Graf 19) po poklesu mezi druhým a čtvrtým dnem koncentrace v listech dále rostla, mezi 8. a 16. dnem dokonce skokově. Nejvíce uranu bylo akumulováno v horních listech, 16. den až 1,11 mg/g sušiny v prvním listu.

Koncentrace uranu ve stoncích (Graf 20) v průběhu kultivace u všech rostlin kolísala v rozmezí 0,01 a 0,1 mg/g. Pouze u koncentrace 1 mM byla 16. den zjištěna koncentrace ve stonku 0,57 mg/g sušiny.

K plynulému růstu koncentrace uranu v kořenech (Graf 21) docházelo pouze u rostlin v 1 mM médiu – z 4,5 mg/g druhý den až na 58 mg/g den šestnáctý. U zbývajících koncentrací byl růst zjištěn až v období od 4. (pro koncentraci 0,5 mM) a 8. (pro koncentrace 0,05 a 0,25 mM) dne. Konečné koncentrace pro jednotlivá média byly 6,7 mg/g pro 0,05 mM, 12,4 mg/g pro 0,25 mM a 21,1 mg/g pro 0,5 mM.



Graf 20: Akumulace uranu ve stoncích tabáku TR12 – T2



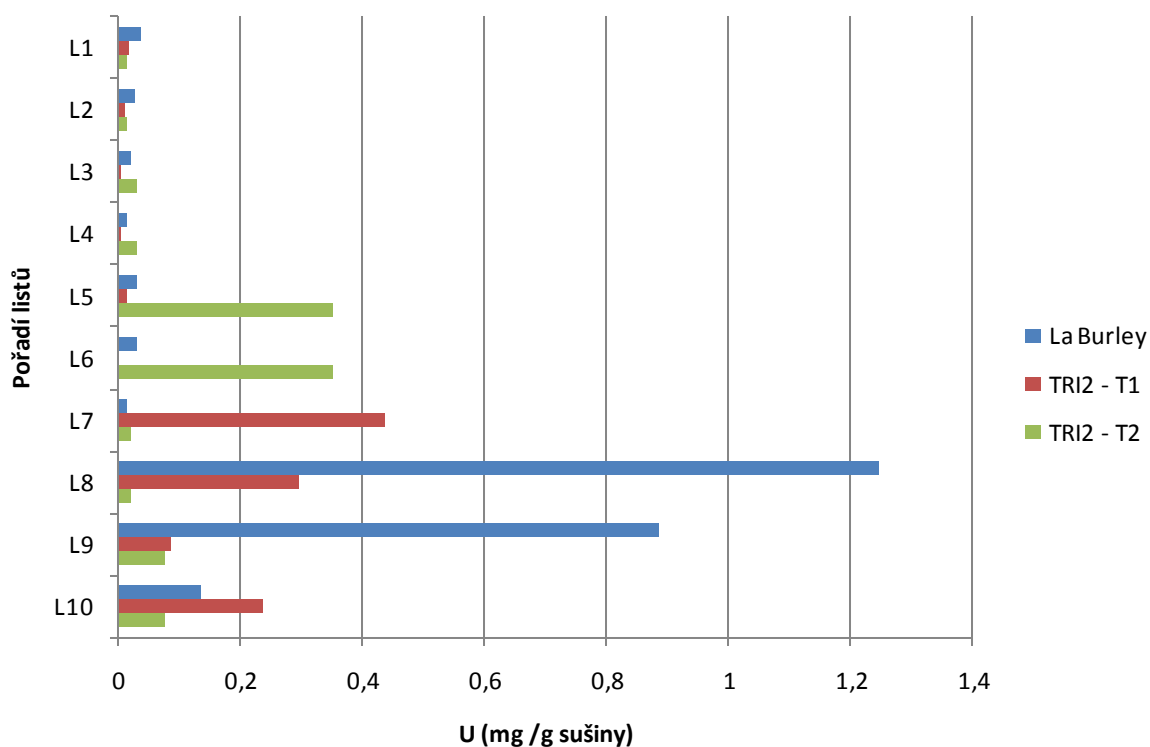
Graf 21: Akumulace uranu v kořenech tabáku TR12 - T2

U všech rostlin byla prokázána schopnost uranu akumulovat a transportovat jej do nadzemní části. V listech se uran akumuloval převážně v horní, tedy nejmladší části rostlin. S růstem koncentrace a času ovšem vzrůstalo množství uranu akumulovaného ve spodních listech. Mezi jednotlivými druhy rostlin se míra tohoto jevu lišila, nejvýraznější byla u TRI2 – T1, nejméně výrazná u TRI2 – T2. Nejvyšší schopnost akumulace byla zjištěna u rostlin La Burley následovaných rostlinami TRI2 – T2. Rostliny TRI2 – T1 měly koncentraci uranu v listech většinou výrazně nižší. Zjištěný poměr mezi koncentracemi zhruba odpovídá hodnotám naměřeným ve screeningovém pokusu (kapitola 4.2). Pokles koncentrace v listech mezi druhým a čtvrtým dnem byl prakticky všudypřítomným jevem, jehož vysvětlení je nejasné a vyžádá si další experimenty. Další nestandardní výkyvy v koncentraci (zejména 2. den v 0,05 mM koncentraci u TRI2 –T1 a 4. den v 0,25 mM koncentraci u TRI2 – T2) byly nejspíše způsobeny chybou při kultivaci rostlin nebo při zpracování vzorků.

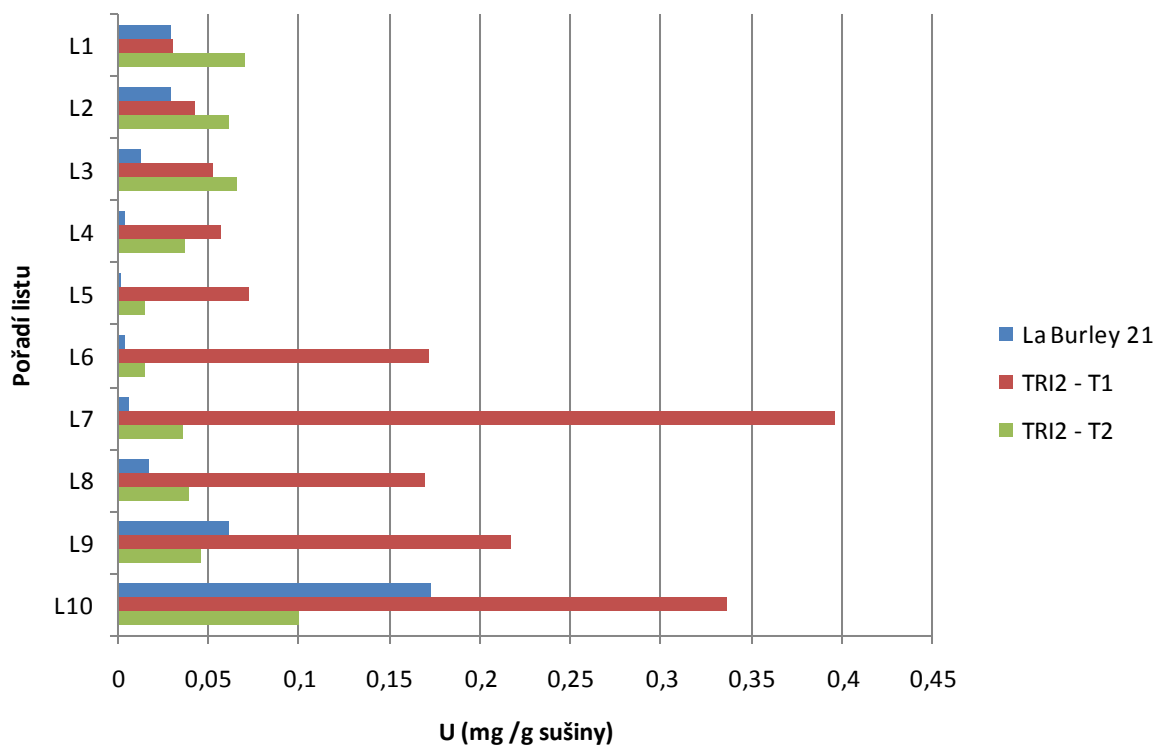
Ve stoncích byly vyšší koncentrace uranu zjištěny pouze u rostlin La Burley 21, obě GMO varianty vykazovaly velmi nízké hodnoty po celou dobu kultivace, které byly dokonce nižší než hodnoty naměřené v listech. Koncentrace v kořenech byly u všech rostlin výrazně (až 100x) vyšší než koncentrace v listech či stoncích. V rostlinách *N. tabacum* cv. La Burley 21 klesala koncentrace v pořadí kořen > stonek > list, což odpovídá poznatkům i v jiných studiích<sup>43 47 49</sup>. V GMO tabácích TRI2 – T1 a TRI2 – T2 nastával pokles v pořadí kořen > list > stonek. Za tento rozdíl by mohla být zodpovědná vyšší koncentrace fytochelatinů v těchto rostlinách a s ní spojená vyšší mobilita uranu.

#### 4.4 AKUMULACE V ROSTLINÁCH *N. TABACUM* V ZÁVISLOSTI NA SLOŽENÍ MÉDIA

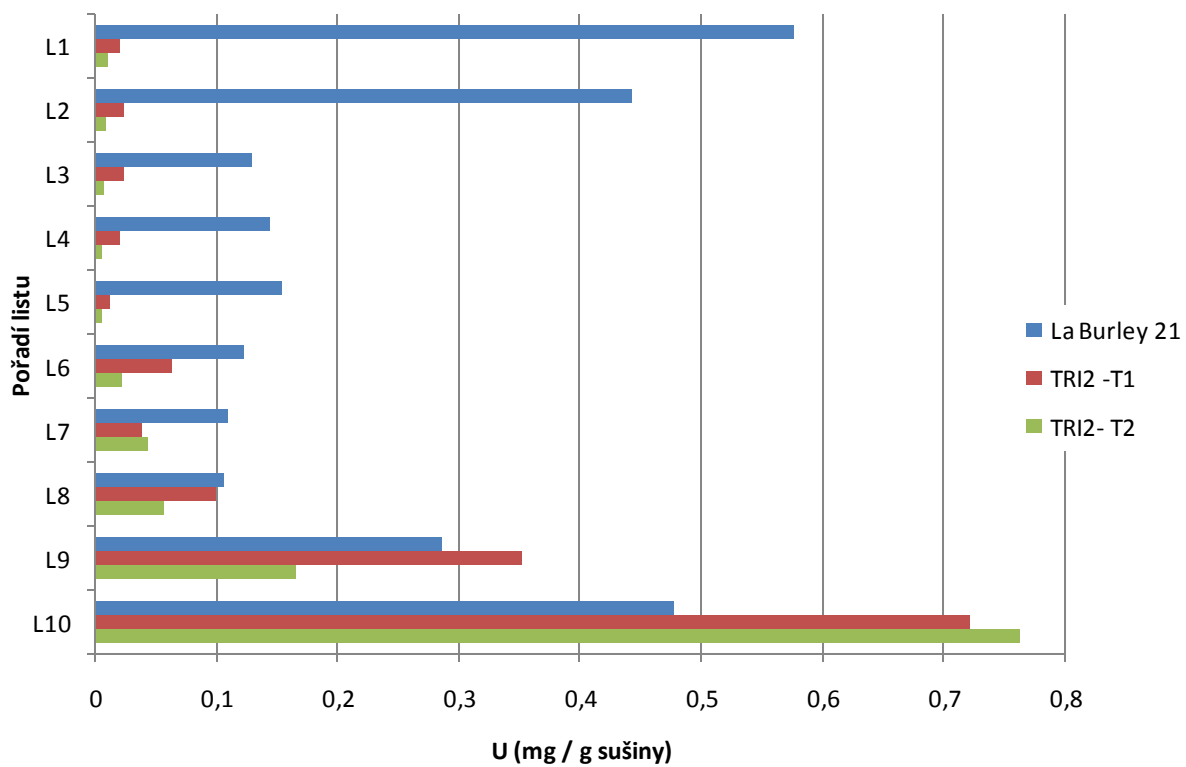
Předpěstované rostliny, *N. Tabacum* cv. La burley 21 a GMO TRI2 – T1 a TRI2 – T2 byly kultivovány ve čtyřech typech hydroponického média s přidavkem uranu o koncentraci 0,2 mM. K prvnímu typu byla přidána kyselina vinná o koncentraci 0,1 mM, v druhém případě byly listy rostlin každý druhý den postřikovány roztokem putrescinu o koncentraci 0,075 mM a ze třetího typu byla odstraněna fosfátová složka. Čtvrté médium sloužilo jako kontrolní. Doba kultivace byla 28 dnů, přičemž po 14 dnech bylo médium kompletně vyměněno.



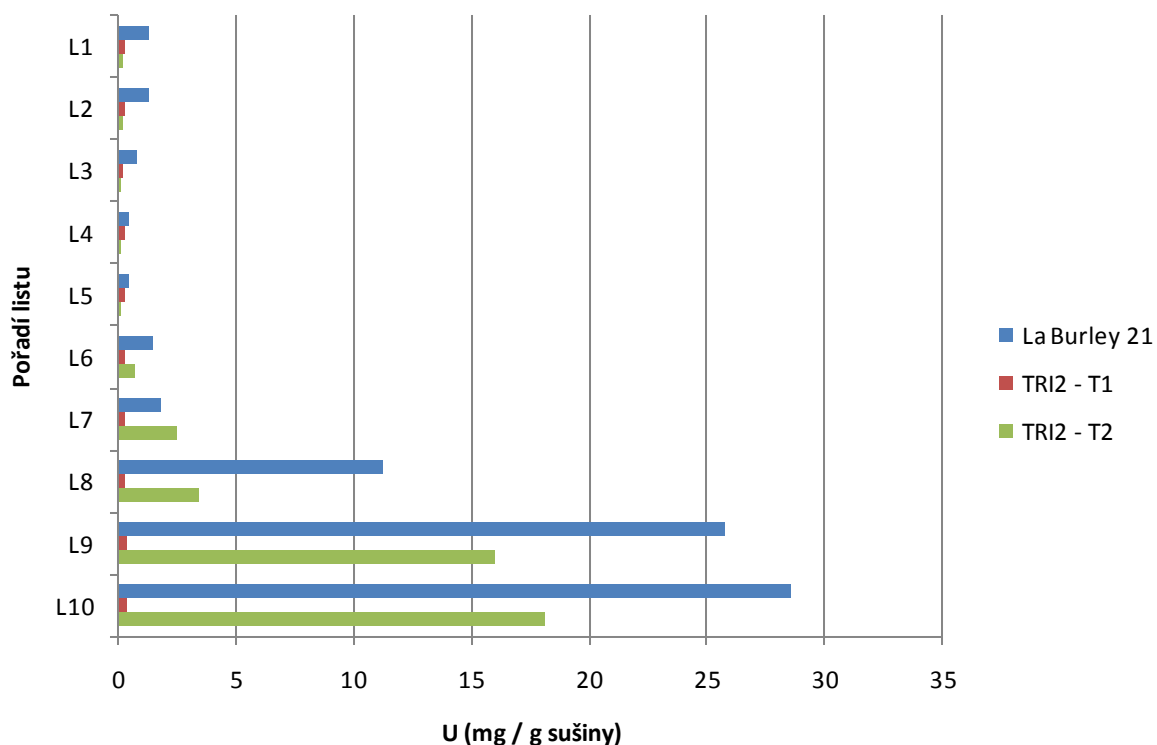
Graf 22: Akumulace uranu rostlinami tabáku rostoucím na médiu o koncentraci uranu 0,2 mM



Graf 23: Akumulace uranu rostlinami tabáku rostoucím na médiu o koncentraci uranu 0,2 mM s přidavkem kyseliny vinné



Graf 24: Akumulace uranu rostlinami tabáku rostoucím na médiu o koncentraci uranu 0,2 mM s postřikem putrescinem



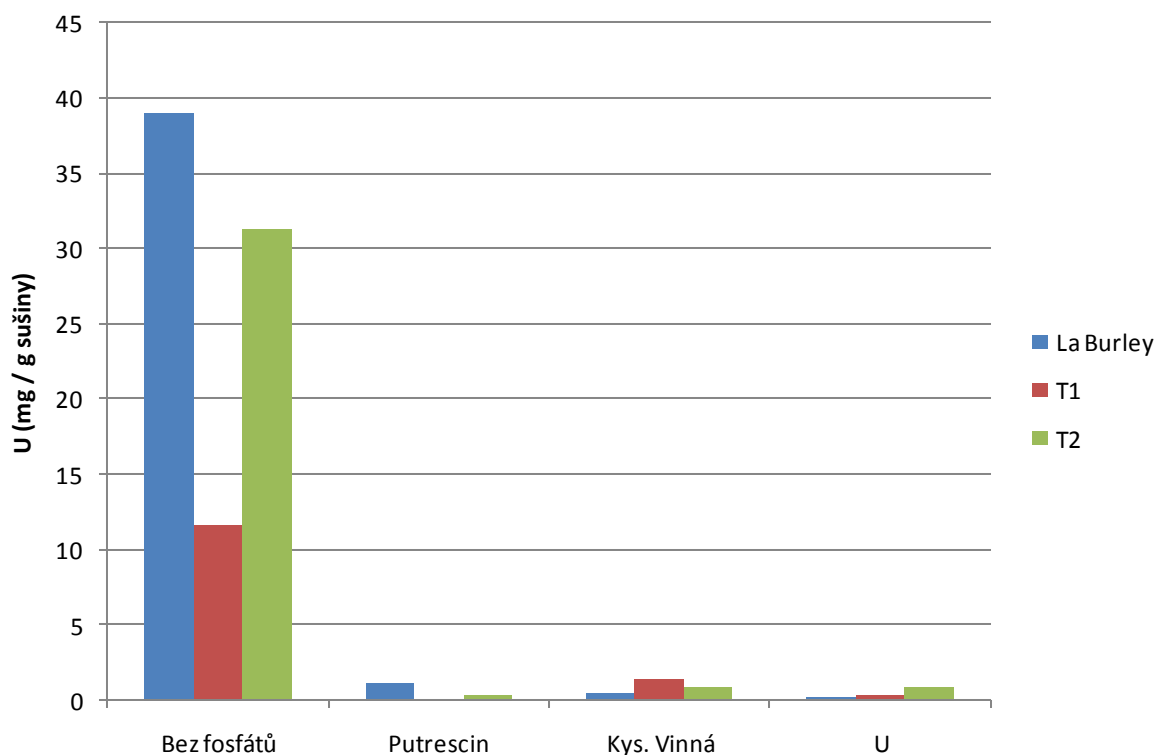
Graf 25: Akumulace uranu rostlinami tabáku rostoucím na médiu o koncentraci uranu 0,2 mM bez fosfátů

Při kultivaci v kontrolním médiu (Graf 22) byl uran akumulován především ve spodních listech, ovšem koncentrace se mezi jednotlivými rostlinami lišila – La Burley 21 byl schopen naakumulovat až 1,25 mg / g sušiny (v osmém listu), kdežto TRI2 - T1 jen 0,44 mg/g v sedmém listu a TRI2 – T2 jen 0,35 mg/g v listu šestém. Směrem k dolním listům se pak koncentrace ve všech rostlinách snižovala. Koncentrace v horních listech pro všechny rostliny nepřekročily 0,035 mg/g sušiny. Při použití média s přidavkem kyseliny vinné (Graf 23) byl uran akumulován převážně ve spodních listech rostlin, ovšem s výraznými rozdíly v koncentracích. U rostlin La Burley 21 a TRI2 – T2 byla nejvyšší koncentrace zjištěna ve spodním listu (0,17 a 0,1 mg /g sušiny), u rostlin TRI2 – T1 v listu sedmém (0,39 mg/kg). V horní části byla vyšší koncentrace zjištěna pouze u rostlin TRI2 – T2 (0,07 mg/kg). Zatímco u rostlin La Burley a TRI2 – T2 koncentrace v listech směrem dolů nejprve klesala, aby pak opět začala růst, u rostlin TRI2 –T1 pouze rostla. U rostlin postřikovaných putrescinem (Graf 24) byl uran akumulován převážně ve spodních listech, pouze v případě rostlin La Burley 21 i v listech horních – koncentrace se postupně snižovala z 0,58 mg/g v prvním listu na 0,11 mg/g v listu šestém, odkud rostla až na 0,49 mg/g v listu posledním. U rostlin TRI2 – T1 a

TRI2 – T2 koncentrace stoupala z hodnot mezi 0,01 a 0,02 mg/g v horní polovině rostliny až na 0,72 (TRI2 – T1) a 0,76 (TRI2 – T2) mg/g ve spodním listu. Při použití média ochuzeného o fosfátovou složku (Graf 25) se v rostlinách TRI2 – T1 koncentrace uranu ve všech listech pohybovala okolo 0,3 mg/g. U rostlin La Burley 21 a TRI2 –T2 byla zjištěna výrazná akumulace ve spodních listech – až 28,6 mg/g v listech La Burley 21 a 18,1 mg/g v listech TRI2 – T2.

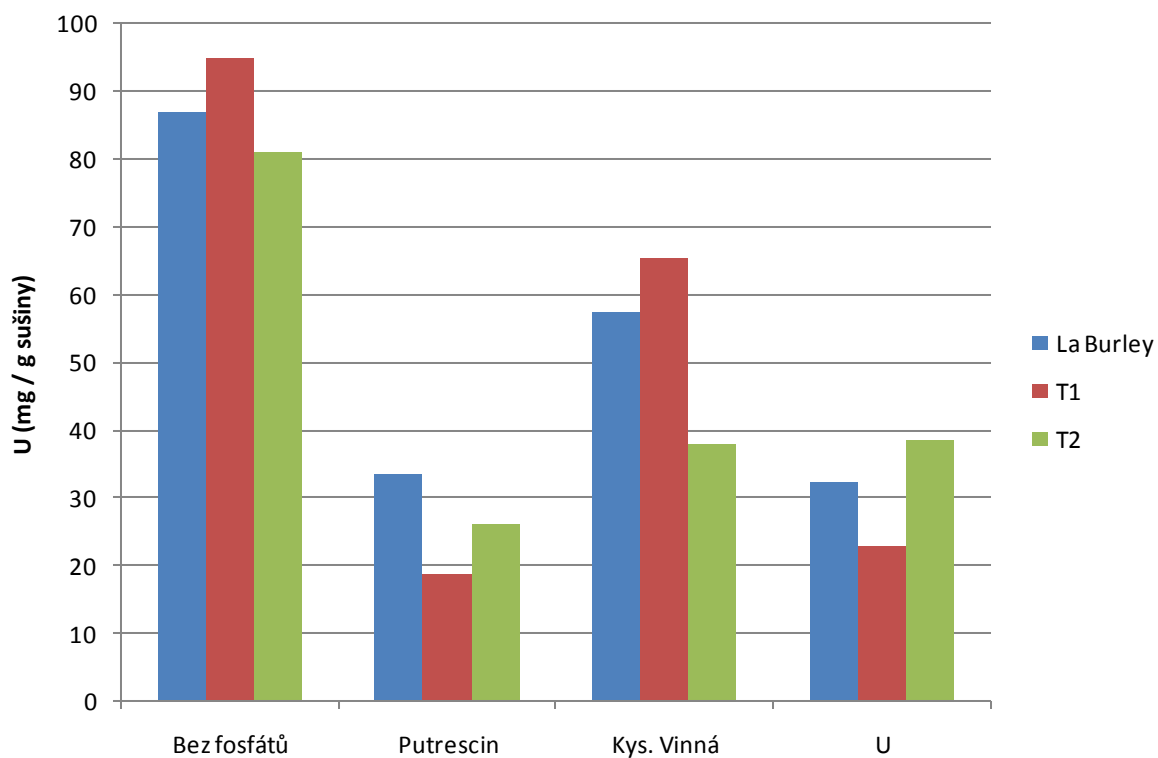
Ve stoncích (Graf 26) byla nejvyšší koncentrace uranu zjištěna u rostlin kultivovaných v bezfosfátovém médiu – 39 mg/g pro La Burley 21, 11,7 mg/g pro TRI2 – T1 a 31,3 mg/g pro TRI2 –T2. V ostatních médiích žádná koncentrace výrazně nepřesáhla 1 mg/g.

Nejvyšší koncentrace uranu v kořenech (Graf 27) byla zjištěna opět u rostlin kultivovaných v bezfosfátovém médiu - 86,9 mg/g pro La Burley 21, 94,9 mg/g pro TRI2 – T1 a 81,2 mg/g pro TRI2 –T2. Nejnižší koncentrace byla zjištěna u rostlin pěstovaných v médiu s přidavkem putrescinu – 33,4 mg/g pro La Burley 21, 18,8 mg/g pro TRI2 –T1 a 26 mg/g pro TRI2 – T2.



Graf 26: Akumulace uranu ve stoncích tabáku v závislosti na složení kultivačního média





Graf 27: Akumulace uranu v kořenech tabáku v závislosti na složení kultivačního média

Nejvíce ovlivnila akumulaci uranu deficiencie fosfátů v živném médiu. Důvodem je zřejmě tendence uranu formovat s fosfátovými anionty kyselé bifosfátové komplexy, které jsou pro kořeny rostlin nedostupné.<sup>14</sup> Fosfor je biogenní prvek důležitý pro rostliny, ovšem negativní dopad jeho absence byl zřejmě daleko nižší než zvýšená biodostupnost uranu. Výsledné koncentrace v listech rostlin byly až 25x, ve stoncích dokonce až 50x vyšší, než v jeho přítomnosti. Podobný efekt ve svých studiích popsali i Eapen et al.<sup>55</sup>, Deibold et al.<sup>51</sup> a Straczek et al.<sup>52</sup> Přídavek putrescinu do média měl za následek vzrůst koncentrace v listech, v případě La Burley 21 zejména v horních listech, a pokles koncentrace v kořenech. Lze se tedy domnívat, že putrescin nezvyšuje biodostupnost uranu, ale podporuje jeho transport v rostlině. Organické kyseliny by měly usnadňovat příjem a transport uranu jednak snižováním pH, jednak tvorbou rozpustných organických komplexů.<sup>50</sup> Po přidavku kyseliny vinné do média došlo ke zvýšení koncentrace uranu v kořenech a stoncích rostlin, koncentrace v listech se ovšem snížila. Zřejmě tedy došlo ke zvýšení biodostupnosti uranu, ale za cenu snížení jeho mobility v rostlinách.

## 5 ZÁVĚRY

- Hodnoty EC50 se pohybovaly v rozmezí 0,139 – 2,119 mM. Toxicita uranu vůči semenům vybraných rostlin se zvyšovala v řadě okurka < hořčice < řeřicha < salát.
- Nejvhodnějšími rostlinami pro další studium akumulace se jevíly *N. glauca*, *N. tabacum* cv. M 51 a GMO varieta M 51 Pro.
- U všech zkoumaných rostlin byla prokázána schopnost uranu akumulovat a transportovat do nadzemní části, převážně do horních listů. Koncentrace v rostlinách se snižovaly v pořadí kořen > stonk > listy pro *N. tabacum* cv. La burley 21 a kořen > listy > stonk pro GMO variety TRI2 – T1 a TRI2 – T2.
- Kultivace v médiu s přidavkem kyseliny vinné vedla ke zvýšení koncentrace uranu v kořenech a stoncích a k poklesu koncentrace v listech.
- Deficience fosfátové složky v médiu měla za následek výrazné zvýšení koncentrace uranu ve všech částech rostlin.
- Postřik rostlin putrescinem vedl k poklesu koncentrace uranu v kořenech a k jejímu nárůstu ve stoncích a listech.

## POUŽITÁ LITERATURA

- <sup>1</sup> Mička, Z, Lukeš, I.: Anorganická chemie II: Systematická část, Karolinum 1999
- <sup>2</sup> <http://en.wikipedia.org/wiki/Uranium> (Navštíveno 3.9.2009)
- <sup>3</sup> Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A. B.: Trace elements from soil to human, Springer 2007
- <sup>4</sup> Echevarria, G., Sheppard, M.I., Morel, J.: J. Environ. Radioactivity 53 (2001) 257-264
- <sup>5</sup> World uranium mining: <http://www.world-nuclear.org/info/inf23.html> (Navštíveno 15.7.2010)
- <sup>6</sup> [http://www.sujb.cz/?c\\_id=159](http://www.sujb.cz/?c_id=159) (Navštíveno 3.9.2009)
- <sup>7</sup> Meriwether I.R., Beck J.N., Keeley D.F., Langley M.P., Thompson R.H., Young Y.C.: J. Environ. Qual 17 (1988) 562 - 569
- <sup>8</sup> Takeda A., Tsukada H., Nazyo M., Takaku Y., Uemura T., Hisamatsu S., Inaba J.: Soil Sci. Plant Nutr. 51 (2005) 251 - 260
- <sup>9</sup> Fendorf S., Hansel C.M., Wielinga B.: Operative pathways of chromate and uranyl reduction within soils and sediments. In: Geochemistry of soil radionuclides (2002) 111 - 129
- <sup>10</sup> Schulz R.K.: Health. Phys. 11 (1965) 1317 - 1324
- <sup>11</sup> Gaillardet J., Viers J., Dupré B.: Trace elements in river waters, Elsevier 2003
- <sup>12</sup> Birke M., Rauch U.: Geochemical mapping in the Federal States of Germany. In: 4<sup>th</sup> Inter Symp. Environ. Geochem (1997) 11 - 12
- <sup>13</sup> Charles A.L., Markich S. J., Stauber J. L., De Filippis L.F.: Aquatic Toxicology 60 (2002) 61 -73
- <sup>14</sup> Langmuir D.: Geochim. Cosmochim. Acta 26 (1978) 547 - 569
- <sup>15</sup> Nozaki Y.: A Fresh look at element distribution in the North Pacific, AGU <http://www.agu.org/eos.elec/97025e.html> (Navštíveno 3.9.2009)
- <sup>16</sup> Llorens J.F., Fernández J.L., Querol X.: Environ. Geology 40 (2000) 409 - 416
- <sup>17</sup> Reimann C., de Caritat P.: Chemical elements in the environment, Springer 1998
- <sup>18</sup> Franklin N.M., Stauber, J.L., Mrkich S.J., Lim R.P.: Aquatic toxicology 48 (2000) 275 -289
- <sup>19</sup> Toxicological Profile for Uranium: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp150.html> (Navštíveno 3.9.2009)
- <sup>20</sup> Uranium toxicity: <http://www.wise-uranium.org/utox.html> (Navštíveno 3.9.2009)
- <sup>21</sup> Diehl P.: Uranium mining and milling wastes: an introduction <http://www.wise-uranium.org/uwai.html> (Navštíveno 3.9.2009)
- <sup>22</sup> Vera Tomé F., Blanco Rodríguez P., Lozano J.C.: J. Environ. Radioactivity 59(2002) 41-60
- <sup>23</sup> Weiske A., Rotsche J.: Distribution of heavy elements and radionuclides on small uranium mining dumps after decades of soil development In: Uranium in the Aquatic Environment, Springer 2002
- <sup>24</sup> <http://www.diamo.cz/tezba> (Navštíveno 15.7.2010)
- <sup>25</sup> <http://www.diamo.cz/rozna> (Navštíveno 15.7.2010)

- 
- <sup>26</sup> <http://www.diamo.cz/pribram-uran> (Navštíveno 15.7.2010)
- <sup>27</sup> Poválečná historie jáchymovského uranu: <http://www.hornictvi.info/histor/lokality/jachym/JACHYM2.htm> (Navštíveno 15.7.2010)
- <sup>28</sup> <http://www.diamo.cz/jachymov> (Navštíveno 15.7.2010)
- <sup>29</sup> <http://www.diamo.cz/hamr> (Navštíveno 15.7.2010)
- <sup>30</sup> <http://www.diamo.cz/horni-slavkov-uran> (Navštíveno 15.7.2010)
- <sup>31</sup> <http://www.diamo.cz/zadni-chodov> (Navštíveno 15.7.2010)
- <sup>32</sup> Impacts of uranium in-situ leaching: <http://www.wise-uranium.org/uisl.html> (Navštíveno 3.9.2009)
- <sup>33</sup> <http://www.diamo.cz/straz-pod-ralskem> (Navštíveno 15.7.2010)
- <sup>34</sup> Rumble M.A., Bjugstad A. J.: Reclamation and Revegetation research 4 (1986) 271 - 277
- <sup>35</sup> Fernandes H.M., Franklin M. R., Veiga L.H.S., Freitas P., Gomiero L.A.: J. Environ. Radioactivity 30 (1996) 69 - 95
- <sup>36</sup> Švehla J.: Následky hydrometalurgického zpracování uranových rud v oblasti bývalé úpravny MAPE – Mydlovary u Vodňan <http://www.wise-uranium.org/pdf/ujsmapee.pdf> (Navštíveno 15.7.2010)
- <sup>37</sup> Lusk K., Veselý P., Gombos L.: Hydrogeologická problematika sanace odkališť MAPE Mydlovary: <http://slon.diamo.cz/hpvt/2001/sekce/sanace/15/S15.htm> (Navštíveno 15.7.2010)
- <sup>38</sup> Hanus P., Horáková E., Lundáková I., Tomášek J.: Ekonomická náročnost odstranění ekologické zátěže v souvislosti s ukončením uranové činnosti DIAMO s.p., odštěpný závod GEAM Dolní Rožínka (1995) <http://www.czp.cuni.cz/knihovna/undp/studie/S22.htm> (Navštíveno 15.7.2010)
- <sup>39</sup> Hanson F.R., Miera F.R.: Continued studies of long-term ecological effects of exposure to uranium. NTIS Springfield (1977)
- <sup>40</sup> Priest N.D.: Toxicity of depleted uranium (2001)
- <sup>41</sup> Mortvedt J.J.: J. Environ. Qual. 23 (1994) 643 - 650
- <sup>42</sup> Yanagisawa K., Muramatsu Y., Kamada H.: Radioisotopes 41 (1992) 397 - 402
- <sup>43</sup> Vandenhove H., Van Hees M., Van Winckel S.: Int. J. Of Phytoremediation 3 (2001) 301 - 320
- <sup>44</sup> Brackhage C., Dudel E. G.: Long-term differences in transfer and accumulation of potentially toxic trace elements and radionuclides in trees on uranium mining dumps (Erzgebirge, Germany) In: Uranium in the Aquatic Environment, Springer 2002
- <sup>45</sup> Bhatti T. M., Mahmood K., Malik K. A.: Pak. J. Bot. 31 (1999) 343 - 346
- <sup>46</sup> Saric M., Stojanovic M., Babic M.: J. Plant Nutr. 18 (1995) 1509 - 1518
- <sup>47</sup> Saric M., Stojanovic M., Babic M., Ileš D.: BIOS (Macedonia, Greece) 5 (2000) 51 -59
- <sup>48</sup> Chen S.B., Zhu Y.G., Hu Q.H.: J. Environ. Radioactivity 82 (2005) 223 - 236
- <sup>49</sup> Gramss G., Voigt K., Bergmann H.: J. Plant Nutr. Soil Sci. 167 (2004) 417 - 427
- <sup>50</sup> Huang J.W., Blaylock M.J., Kapulnik Y., Ensley B.D.: Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 2004 - 2008

- 
- <sup>51</sup> Diebold F.E., McGrath S.: *J. Geochem. Explor.* 23 (1985) 1 - 12
- <sup>52</sup> Straczek A., Dams J., Vandenhove H.: Localisation of uranium roots by chemical extractions and by a short term uptake study. Influence of phosphate. in: *Uranium in the Environment*, Springer 2006
- <sup>53</sup> Viehweger K., Geipel G.: *Env. Exp. Botany* 69 (2010) 39 - 46
- <sup>54</sup> Haas J.R., Bailey E. H., Purvis W. O.: *American Mineralogist* 83 (1998) 1494 - 1502
- <sup>55</sup> Eapen S., Suseelan K.N., Tivarekar S., Kotwal S.A., Mitra R.: *Environmental Research* 91 (2003) 127 - 133
- <sup>56</sup> Ruffykiri G., Thiry Y., Wang L., Delvaux B., Declerck S.: *New Phytologist* 156 (2002) 275 - 281
- <sup>57</sup> UNEP – phytoremediation process: <http://www.unep.or.jp/ietc/Publications/Freshwater/FMS2/2.asp> (Navštíveno 3.9.2009)
- <sup>58</sup> Pazdera Z.: Botanický herbář: <http://botanika.wendys.cz/kytky/K387.php> (Navštíveno 13.8.2010)
- <sup>59</sup> Gubiš J., Vaňková R., Červená V., Dragúňová M., Hudcovicová M., Lichtnerová H., Dokoupil T., Jureková Z.: *South African Journal of Botany* 73 (2007) 505 - 511
- <sup>60</sup> Wawrzynski A., Kopera E., Wawrzynska A., kominska J., Bal W., Sirko A.: *J. Exp. Botany* 57 (2006) 2173 - 2182
- <sup>61</sup> Wojas S., Hennig J., Plaza S., Geisler M., Siemanowski O., Sklodowska A., Ruszczynska A., Bulska E., Antosiewicz D.M.: *Environ. Pollut.* (2009) v tisku
- <sup>62</sup> Tichamnová M., Mašková P., Vojvodová P., Krekule J., Francis D., Lipavská H.: *New Phytologist* 176 (2007) 804 - 812
- <sup>63</sup> Wojas S., Clemens S., Hennig J., Sklodowska A., Kopera E., Schat H., Bal W., Antosiewicz D.M.: *J. Exp. Botany* 59 (2008) 2205 - 2219
- <sup>64</sup> <http://botany.cz/cs/nicotiana-glauca/> (Navštíveno 13.8.2010)
- <sup>65</sup> Hoagland D.R.: *Science* 52 (1920) 562 - 564