

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

# Akumulace thoria a studium stresových odpovědí rostlin na jeho přítomnost

Thorium accumulation and study of stress responses of  
plants on thorium presence

Diplomová práce  
studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Praha 2011

Bc. Daniel Kufner

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857. Tato práce byla podporována grantem COST.FA0605OC9082.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr., Mgr.Petra Soudka, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. srpna 2011

## **Poděkování**

V úvodu této práce bych rád poděkoval RNDr., Mgr. Petru Soudkovi, Ph.D. za jeho odborné konzultace, připomínky a námět k diplomové práci. Děkuji rodičům za všestrannou podporu a velkou trpělivost během studia, panu Prof. RNDr. Martinu Mihaljeviči, CSc., za technické zázemí během potřebných měření a v neposlední řadě RNDr. Tomáši Vaňkovi CSc.

## Abstrakt

Schopnost akumulace thoria a studium stresových odpovědí na jeho přítomnost byla testována na vybraném kultivaru tabáku, La Burley 21. Rostliny byly kultivovány v Hoaglandově hydroponickém médiu pod umělým osvětlením. Kromě schopnosti akumulace a distribuce thoria v celé rostlině byl sledován vliv vybraných organických a anorganických přísad na akumulaci. Mezi organické látky patřila kyselina citronová, vinná a šťavelová, v jejichž přítomnosti byl pozorován zvýšený obsah thoria ve všech částech rostliny. Dále byly testovány látky ze skupiny diaminů a polyaminů (putrescin, kadaverin, spermin a spermidin). Tyto látky, známé též pro své antioxidační působení v rostlinách, měly vliv na snížení akumulace thoria zejména v kořenovém systému rostlin. Nejvýznamnějším činitelem ovlivňujícím akumulaci thoria byla však absence fosfátových iontů v hydroponickém médiu, která způsobila řádový vzestup koncentrace thoria ve všech částech rostlin. Významným se ukázalo počáteční snížení pH po přidání organických kyselin a vyšších koncentrací thoria a postupné zvýšení tohoto pH během kultivace. Byla také porovnávána schopnost akumulace a distribuce thoria kultivaru La Burley 21 s 5 dalšími kultivary a jejich 14 odvozenými GMO, přičemž bylo zjištěno, že studovaný kultivar vykazuje průměrnou akumulaci Th v jednotlivých částech, avšak má velmi dobrý distribuční poměr koncentrací kořen:stonek:list.

### Klíčová slova:

fytoremediace, thorium, polyaminy, hydroponie, akumulace, *Nicotiana tabaccum*

## **Abstract**

The ability of the accumulation of thorium and study of the stress responses on his presence was tested on a selected cultivar of tobacco, La Burley 21. Plants were cultivated in Hoagland's hydroponic medium under artificial light. Except to the ability of accumulation and distribution of thorium in the all parts of plant was investigated the effect of selected organic and inorganic additions on accumulation. Among organic substances included citric acid, tartaric and oxalic acid in their presence was observed the increase of thorium in all parts of the plant. Were also tested products from the diamine and polyamines (putrescine, cadaverine, spermine and spermidin). These substances, also known for their antioxidant activity in plants, had an impact on reducing the accumulation of thorium, especially in the root system of plants. The most important factor influencing the accumulation of thorium was the absence of phosphate ions in a hydroponic medium, which caused the rise of the concentration of thorium about several levels in all parts of the plants. The initial decrease of pH after additions of organic acids or addition of high concentrations of thorium and the gradual increase of pH during cultivation had proved significant. It was also compared the uptake of accumulation and distribution of thorium cultivar La Burley 21 with 5 other cultivars and their 14 derived GMOs, and it was found that the studied cultivar represented average accumulation of Th in individual parts, but with very good distribution ratio of root: stem: sheets.

### **Keywords:**

phytoremediation, thorium, polyamines, hydroponics, *Nicotiana tabaccum*

## Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Thorium.....	9
2.1.1	Základní chemicko-fyzikální vlastnosti.....	9
2.1.2	Radioaktivita a výskyt v rozpadových řadách.....	10
2.1.3	Těžba a zpracování thoriových rud .....	10
2.1.4	Průmyslové využití.....	11
2.1.5	Thorium v životním prostředí.....	12
2.2	Antropogenní znečištění životního prostředí thoriem.....	14
2.2.1	Kontaminace odpadem z těžby a zpracování thoriových rud.....	14
2.2.2	Další způsoby kontaminace .....	14
2.2.3	Nejznámější lokality znečištěné radionuklidy (nejen thoriem) .....	15
2.2.4	Toxicita.....	15
2.3	Možnosti remediacce thoria .....	16
2.3.1	Elektrokinetické metody.....	16
2.3.2	Bioremediační techniky.....	17
2.4	Fytoremediace .....	18
2.4.1	Akumulace (odstranění organického či anorganického polutantu).....	19
2.4.2	Degradace (odbourání či přeměna organických sloučenin) .....	20
2.4.3	Rozptýlení (odstranění organických nebo anorganických kontaminantů uvolněním do atmosféry).....	21
2.4.4	Imobilizace (snížení mobility organického nebo organického kontaminantu).....	21
2.4.5	Výhody a nevýhody fytoremediace.....	22
2.5	Příjem thoria rostlinami.....	23
2.5.1	Distribuce Th v různých částech rostliny .....	23

2.5.2	Faktory ovlivňující akumulaci.....	24
3	Cíl práce .....	26
4	Experimentální část.....	27
4.1	Materiál a metody.....	27
4.1.1	Rostlinný materiál .....	27
4.1.2	Použité chemikálie.....	28
4.1.3	Pre–experimentální kultivace rostlin .....	29
4.1.4	Experimentální kultivace.....	30
4.1.5	Zpracování rostlinného materiálu po ukončení experimentu .....	32
4.1.6	Stanovení koncentrace thoria ve vzorcích pomocí ICP–MS.....	33
5	Výsledky .....	34
5.1	Závislost akumulace thoria na čase .....	34
5.2	Vliv (ne)přítomnosti organických/anorganických látek na akumulaci .....	35
5.3	Vliv organických kyselin na akumulaci .....	37
5.4	Vliv (ne)přítomnosti fosfátové složky média na akumulaci .....	40
5.5	Vliv PA na akumulaci .....	42
5.6	Porovnání akumulace kultivaru La Burley 21 s ostatními kultivary a jejich GMO.....	44
6	Diskuze .....	46
7	Závěr.....	48
	Seznam použitých zdrojů .....	49

## Seznam zkratek

<b>REE</b>	prvky vzácných zemin
<b>BAF</b>	bioakumulační faktor
<b>RTG</b>	rentgenové záření
<b>PCB</b>	polychlorované bifenyly
<b>PAH</b>	polyaromatické uhlovodíky
<b>ROS</b>	reaktivní kyslíkové částice
<b>EDTA</b>	etylendiamin tetraoctová kyselina
<b>GMO</b>	geneticky modifikované organismy
<b>PA</b>	souhrnně v diplomové práci užíváno pro diaminy a polyaminy
<b>Put</b>	Putrescin
<b>Cad</b>	Cadaverin
<b>Spm</b>	Spermin
<b>Spd</b>	Spermidin
<b>RF</b>	radiofrekvenční generátor
<b>ICP-MS</b>	hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem



# 1 ÚVOD

Objevem rentgenového záření respektive radioaktivity francouzským fyzikem Antoine Henri Becquerelem roku 1895 započala dlouhá cesta vývoje v oblasti využívání radioaktivních látek. Jedním z nejdůležitějších využití radionuklidů, je jejich použití jako palivo do jaderných reaktorů. Tento způsob výroby elektrické energie se z pohledu dopadu na životní prostředí řadí mezi velmi šetrné zdroje elektrické energie a v současnosti i budoucnosti bude její využívání jedním z nejperspektivnějších způsobů zajištění energetických potřeb lidstva.

Cesta k takovému statutu, jak ukazuje historie, se však neobešla bez značných dopadů na životní prostředí. Znečištění ekosystému umělými radionuklidy byl výsledkem zejména testování jaderných zbraní, jaderných nehod a v celkově nedostatečném pochopení chování těchto látek v životním prostředí. Mezi nejznámější kontaminovaná místa patří oblast Sibiře, Uralu, okolí černobylského reaktoru nebo oblast pro testování jaderných zbraní Semipalatinsk v Kazachstánu. Celosvětově je radionuklidy kontaminováno více než tisíc přírodních oblastí.

Vedle klasických a finančně náročných fyzikálně-chemických metod remediace (sanace), se také využívá přirozenějších cest, a to pomocí bakterií či rostlin. Tyto remediační technologie se těší v současné době nebývalému zájmu a to především díky jejich nepoměrně nižší ceně oproti klasickým postupům a aplikaci *in situ* bez trvalé lidské obsluhy. Využití vyšších rostlin k dekontaminaci radionuklidy kontaminované půdy, tzv. fytoremediace, je jednou ze slibných nemediačních technik.

Tato práce je zaměřena na studium chování modelových rostlin v přítomnosti radionuklidů, konkrétně thoria v jeho tetravalentní iontové podobě -  $\text{Th}^{4+}$  s cílem přispět k vývoji účinných a přitom šetrných technik odstraňování škodlivých látek ze životního prostředí.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Thorium

#### 2.1.1 Základní chemicko-fyzikální vlastnosti

Thorium je radioaktivní prvek, v pořadí druhý v řadě aktinoidů, s elektronovou konfigurací [Rn]:  $7s^26d^25f^0$  a elektronegativitou 1,3 (dle Paulinga). Díky těmto a dalším fyzikálně-chemickým vlastnostem (Tab. I.), je schopen tvořit sloučeniny, zejména komplexní vzhledem k obsahu neobsazených  $d$  a  $f$  orbitalů, v nichž vystupuje výlučně jako čtyřmocný kationt. Nekomplexní rozpustné sloučeniny obsahující kationt  $\text{Th}^{4+}$  nevykazují ve VIS spektru žádnou absorpci<sup>1</sup> a tudíž jsou jeho roztoky bezbarvé, nerozpustné sloučeniny bývají naopak bílé. Z chemického hlediska se  $\text{Th}^{4+}$  svým chováním nejvíce blíží k Zr, Ce, Hf a U.

Elementární thorium (Obr. 1.) je stříbřitě bílý, lesklý, kujný a tažný kov, svým vzhledem připomínající platinu, nebo tvoří šedý prášek. Kovové thorium nevytváří žádné vodné roztoky ani s ní nereaguje, zahřátím na vzduchu se snadno vznítí a hoří bílým plamenem. V běžných minerálních kyselinách (HCl,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) jej lze omezeně rozpustit, koncentrovaná  $\text{HNO}_3$  jej pasivuje vytvořením inertní vrstvičky oxidu thoričitého na jeho povrchu.<sup>2</sup>



Obr. 1. *Elementární thorium*

<b>Protonové číslo</b>	90
<b>Relativní atomová hmotnost</b>	232,0386
<b>Hustota</b>	11,6 g·cm <sup>-3</sup>
<b>Teplota tání</b>	1750 °C (2023 K)
<b>Teplota varu</b>	4790 °C (5063 K)
<b>První ionizační energie</b>	1107,6 kJ·mol <sup>-1</sup>
<b>Druhá ionizační energie</b>	1962,4 kJ·mol <sup>-1</sup>
<b>Třetí ionizační energie</b>	2774 kJ·mol <sup>-1</sup>

Tab. I. *Základní fyzikálně-chemické vlastnosti thoria*<sup>3</sup>

### 2.1.2 Radioaktivita a výskyt v rozpadových řadách

V přírodě se běžně vyskytuje 6 radioaktivních izotopů thoria, jejichž poločas rozpadu je delší než jedna sekunda. Ve čtyřech případech se jedná o  $\alpha$ -zářiče, zbylé dva izotopy jsou  $\beta$ -zářiče. V zemské kůře je zastoupen téměř v100% izotop<sup>232</sup>Th, který se vyznačuje dlouhým poločasem rozpadu  $1,4 \cdot 10^{10}$  roku. Ostatní přírodní izotopy (Tab. II.), se vyskytují v zemské kůře v mizivém množství.

<b>Izotop</b>	<b>druh záření</b>	<b>poločas rozpadu</b>	<b>výskyt v rozpadové řadě</b>
<sup>227</sup> Th	$\alpha$	18,7 dní	aktiniová
<sup>228</sup> Th	$\alpha$	1,9 roku	thoriová
<sup>230</sup> Th	$\alpha$	$8 \cdot 10^4$ let	uranová
<sup>231</sup> Th	$\beta$	1,06dní	aktiniová
<sup>232</sup> Th	$\alpha$	$1,4 \cdot 10^{10}$ let	thoriová
<sup>234</sup> Th	$\beta$	24,1 dní	uranová

Tab. II. *Izotopy thoria a jejich rozpadové vlastnosti*<sup>3</sup>

### 2.1.3 Těžba a zpracování thoriových rud

Nejdůležitějšími zdroji thoria jsou monazity, thorit a thorianit. Pro průmyslové využití jsou nejnáze zpracovatelné monazitové písky, při jejichž úpravě lze vedle thoria

získat také titan, zirkonium, lanthan, cerium a další.<sup>4</sup>

Z monazitových písků lze thorium izolovat metodou kyselého nebo zásaditého loužení, k němuž se používá  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$  nebo  $\text{NaOH}$ . Získané oxidy thoria jsou dále v průběhu zpracování sráženy při různém pH, krystalizovány a v konečné fázi separovány od REE, v případě alkalického loužení, jako šťavelan thoričitý.<sup>12</sup>

K výrobě kovového thoria se využívá elektrolýzy roztaveného podvojného fluoridu  $\text{ThF}_4 \cdot \text{KF}$  nebo redukce  $\text{ThO}_2$  vápníkem. Produktem je práškové thorium, které se převádí na kompaktní kov slinováním a tavením ve vakuu nebo atmosféře inertního plynu.

#### 2.1.4 Průmyslové využití

Jednou z nejdůležitějších vlastností thoria je jeho vysoká tepelná odolnost, které se využívá v automobilovém a leteckém průmyslu, kde s příměsí dalších kovů (Th-Mg, Th-Ni) zvyšuje odolnost kovových slitin vůči teplotě a korozi. Ve formě oxidu thoričitého se používá do plášťů plynových lamp, wolframových vláken, svařovacích elektrod typu TIG/WIG obsahujících thoriovaný wolfram, tavících kelímků a dalších žáruvzdorných materiálů. Pro zvýšení indexu lomu s malým rozptylem světla se přidávalo menší množství thoria do některých čoček a objektivů fotoaparátů.<sup>5, 12</sup>

Oxid thoričitého se využívá také jako katalyzátoru pro některé chemické reakce, jako je například při krakování ropy, výrobě kyseliny dusičné z amoniaku či přípravě kyseliny sírové.<sup>12</sup> Katalyzátor  $\text{Cu}/\text{ThO}_2$  lze využít k selektivní hydrogenaci nenasycených organických sloučenin nebo přeměně oxidu uhelnatého na metanol v přítomnosti vodíku.<sup>6</sup>

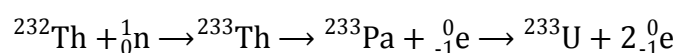
Ve 30. letech 20. století se v lékařství používal přibližně 25% injekční koloidní roztok oxidu thoričitého jako kontrastní látka při rentgenových procedurách. Vzhledem k negativnímu působení na zdraví pacientů, které se projevovalo vznikem granulomů v místě vpichu<sup>5</sup>, fibrózy<sup>7</sup> či poruchy krvevotvorby<sup>8</sup>, se od roku 1950 nepoužívá.

Dalším, dnes velmi diskutovaným, aspektem využití thoria je energetický průmysl. Jeho využití jako jaderného paliva je z mnoha hledisek oproti uranu výhodnější<sup>9,10</sup>:

- i) použití thoriového paliva vede k produkci jen velmi malého množství plutonia, které je prakticky nevyužitelné pro zbrojení;

- ii) lze ho využít k bezpečné likvidaci nežádoucích zásob plutoniového odpadu;
- iii) thoria je 4x více než uranu a je široce distribuován v zemské kůře;
- iv) spotřeba thoriového paliva by byla v různých ohledech nižší, přičemž výtěžek energie na jednotku hmotnosti naopak větší než u uranu;
- v) thoriové palivo se rozpadne na úroveň radioaktivity pozadí zhruba za 100 let;
- vi) náklady spojené s těžbou thoria jsou na rozdíl od uranu relativně nízké a více šetrné k životnímu prostředí;

Vzhledem k faktu, že běžně dostupný izotop  $^{232}\text{Th}$  má dlouhý poločas rozpadu a sám je neštěpitelný, je nutné jej převést na radioaktivnější a štěpitelnou formu  $^{233}\text{U}$ . Konverzní mechanismus lze zjednodušeně popsat následující reakcí:



kde  $^{232}\text{Th}$  je přirozeně se vyskytující izotop thoria,  ${}^1_0\text{n}$  jsou pomalé neutrony,  $^{233}\text{Th}$  je přechodný stav před vyzářením elektronu,  $^{233}\text{Pa}$  je přechodný stav před vyzářením dalšího elektronu,  $^{233}\text{U}$  je produkt přeměny a přirozeně se nevyskytující izotop, který je již snadno štěpitelný pomalými neutrony za vzniku štěpných produktů reakce.<sup>11</sup>

## 2.1.5 Thorium v životním prostředí

### 2.1.5.1 Výskyt v půdě, vodě a ovzduší

Thorium se přirozeně vyskytuje převážně v kontinentální kůře, kde jeho průměrný obsah činí  $10,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Koncentrace v půdě je silně závislá na typu podloží a umělé kontaminaci, běžně se však vyskytuje v rozmezí  $3,4$  až  $10,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Nejvýznamnějšími zdroji thoria jsou minerály, zejména pak monazitové píský, jež obsahují  $3,2$ – $10,6 \%$   $\text{ThO}_2$ , thority s obsahem  $21,97$ – $55,36 \%$   $\text{ThSiO}_4$  nebo thorianity, které obsahují přibližně  $87,88 \%$   $\text{ThO}_2\cdot\text{UO}_2$ .<sup>12,13</sup>

Vlivem sopečné a antropogenní činnosti, zdrojů bohatých na radionuklidy, se v ovzduší může přechodně vyskytovat thorium vázané na povrchu prachových částic. Nejčastěji se jedná o částice  $\text{PM}_{2,5}$  nebo částice  $\text{PM}_{1,6}$ , které jsou schopny adsorpce vzájemně odlišných izotopů a ovlivňují tak dobu setrvání thoria v ovzduší.<sup>14</sup>

Koncentrace thoria ve vodách je obecně poměrně nízká a to zejména kvůli jeho

schopnosti adsorpce na pevné částice v půdě a tvorby komplexů s organickými, anorganickými a huminovými sloučeninami.<sup>15,16</sup> Pokud se již thorium ve vodě vyskytuje, tak pouze jako hydrolyzovaný čtyřmocný kationt  $\text{Th}^{4+}$ , jež tvoří komplexní částice  $[\text{Th}(\text{OH})_n]^{4-n}$ , které v závislosti na obsahu a koncentraci dalších aniontů a pH, vytvářejí složitější kationtové  $[\text{ThX}]^{3+}$ ,  $[\text{ThX}_2]^{2+}$ ,  $[\text{ThX}_3]^+$  nebo neutrální  $[\text{ThX}_4]$  komplexy a řetězcové struktury<sup>17</sup>.

#### 2.1.5.2 Výskyt v živých organismech

Obsah thoria v živých systémech je veličinou, jejíž hodnota je závislá na velkém množství faktorů, od fyzikálně-chemických vlastností prostředí, v němž organismus žije (pH, teplota, koncentrace iontů, různé interakce, přítomnost dalších látek, povětrnostní vlivy, atd.), druhu organismu, až po jeho stavbu a biochemickou výbavu.

V živých systémech bývá koncentrace thoria obecně o několik řádů nižší než v jejich okolí a jednou z veličin charakterizující akumulční schopnost je tzv. bioakumulační faktor (BAF), který se vypočítá jako poměr koncentrace/aktivity látky v organismu a v okolí. U jednoduchých organismů, jako jsou řasy či zooplankton, byl zjištěn vůbec nejvyšší BAF, v řádech  $10^6$ .<sup>18</sup>

Zvýšená akumulace byla prokázána u bakterií rodu *Pseudomonas sp.*, které díky vysokému obsahu fosfátových, karboxylových a amidových skupin v buněčné stěně, obsahují v biomase až  $430 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  thoria.<sup>19</sup> Schopnost akumulace vykazují také některé houby, jako například *Rhizopus arrhizus* či *Hypoloma fasciculare*, u nichž je zvýšený obsah v buněčné stěně podporován přítomností polysacharidových sloučenin, především chitinu.<sup>20</sup>

U vyšších rostlin je thorium lokalizováno především v kořenovém systému, méně pak v nadzemní části. Některé druhy rostlin, například mechorosty, jsou pro svou rozšířenost a vysokou schopnost akumulace používány jako bioindikátory k monitorování obsahu radioaktivních a dalších látek v atmosféře, zejména v blízkosti dálnic, těžebních dolů, jaderných elektráren a oblastí pro testování jaderných zbraní.<sup>21</sup>

Koncentrace thoria v živočiších a člověku je závislá jednak na geografických podmínkách, tak na pravděpodobnosti expozice v daném místě. Největší expozici jsou vystaveni lidé, resp. zvířata, v oblastech výskytu thoriového podloží a v místech, kde je uložen odpad ze zpracování uranových/thoriových rud či jaderných elektráren. Dále

jsou jeho působení vystaveni ti, jež konzumují potraviny z oblastí se zvýšeným obsahem thoria nebo lidé žijící ve starších budovách postavených z materiálu obsahující radioaktivní látky (písek, štěrk, beton, škvára, stavební kámen, atd.).<sup>5</sup>

## 2.2 Antropogenní znečištění životního prostředí thoriem

Téměř na každou složku životního prostředí, jak již bylo uvedeno výše, je vázána přirozeně se vyskytující nízká koncentrace thoria. Znečištění nastává ve chvíli, kdy tato koncentrace výrazně vzroste nad úroveň přirozeného pozadí.

Významnými zdroji znečištění jsou zejména těžba uranu, úprava uranových rud, při jejichž zpracování se společně s uranem do životního prostředí dostává také thorium. Dále sem patří těžba a zpracování thoriových rud<sup>22</sup> (monazitu, thoritu, thorianitu a dalších), jaderné havárie, výroba fosfátových hnojiv a staré zátěže po testování jaderných zbraní.

### 2.2.1 Kontaminace odpadem z těžby a zpracování thoriových rud

Během těžby a zpracování uranových/thoriových rud vzniká, jako odpadní produkt, hlušina, která je hromaděna na hlušinových haldách, a odpadové kaly ze zpracování, které jsou uloženy v odkalovacích nádržích. V obou případech obsahují tyto odpady zbytková množství thoria, uranu a dalších, životnímu prostředí a člověku, toxických látek.

Největší ložiska monazitových písků se nacházejí v Indii, Brazílii, Kanadě, Austrálii a JAR, kde byly v souvislosti s těžbou a zpracováním také potvrzeny zvýšené koncentrace thoria ve vodních zdrojích<sup>22</sup> a v tkáních místních obyvatel<sup>23</sup>.

### 2.2.2 Další způsoby kontaminace

Jak již bylo napsáno v úvodu této kapitoly, izotopy thoria doprovází odpadní produkty vzniklé především při těžbě a zpracování uranu, při výrobě fosfátových hnojiv a dalších antropogenních činnostech (jaderné elektrárny, spalování fosilních paliv, atd.), a tedy se významně podílí na kontaminaci životního prostředí.

### 2.2.3 Nejznámější lokality znečištěné radionuklidy (nejen thoriem)

Mezi světově nejvýznamnější kontaminovaná místa patří jaderné komplexy na Sibíři (Tomsk–7 a Krasnojarsk–26), řeka Techa na Uralu, oblast jaderných zkoušek Semipalatinsk v Kazachstánu, okolí černobylského reaktoru a okolí jaderné elektrárny Fukušima.

V České republice je kontaminace thoriem spojena s úpravami uranových rud nedaleko obce Mydlovary, kde se nachází 286 ha uranových odkališť a bývalá chemická úpravná uranové rudy. Během 29letého provozu zde bylo zpracováno přes 17 milionů tun uranových rud a vyprodukováno přibližně 36 milionů tun odpadních kalů.<sup>24</sup>

### 2.2.4 Toxicita

Toxickému působení thoria a jeho sloučenin byla v minulosti věnována poměrně malá pozornost. Publikované studie zaměřené na studium toxicity, zejména u člověka, jsou spíše nejednoznačné, tedy nelze spolehlivě určit, zda byla toxicita způsobena právě thoriovými sloučeninami. V souvislosti s tímto působením byla navíc pozorována spíše toxicita chemického charakteru, nežli radiotoxicita.

Nejvíce studovanou sloučeninou v souvislosti s jejím toxickým působením je  $\text{ThO}_2$ , který byl v lékařství pod obchodním názvem *Thorotrast* podáván intravaskulárně jako kontrastní látka při RTG vyšetřeních.<sup>7</sup> Nemoci spojené s touto látkou jsou zejména aplastická anémie, myelofibróza, akutní myeloidní leukémie či chromozomální aberace lymfocytů.<sup>25,26,27</sup>

Při experimentech prováděných na myších a krysách bylo pozorováno, že podávané jednorázové dávky  $\text{ThO}_2$  vedou po 15 měsících k degenerativním změnám jater, jako jsou cirhóza, nekróza či fibróza a končí vznikem jaterních nádorů.<sup>28</sup>

Jiné experimenty dokazovaly změny a snížení cholinergních funkcí mozkové tkáně u myši po intraperitoneální aplikaci roztoku  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ , který způsobil nárůst aktivity acetylcholin esterasy (EC 3.1.1.7), pokles aktivity superoxiddismutasy (EC 1.15.1.1) a katalasy (EC 1.11.1.6), což mělo za následek zvýšenou peroxidaci lipidů a obecně větší riziko oxidativního stresu.<sup>29</sup>



Některé studie<sup>30,31,32</sup> dokumentují zvýšený výskyt rakoviny plic, slinivky, rekta, chronické onemocnění dýchacích cest a poškození jater, u lidí pracujících v hutním a těžebním průmyslu.

Nejčastějšími izotopy distribuujícími se v lidské tkáni jsou  $^{228}\text{Th}$ ,  $^{230}\text{Th}$  a  $^{232}\text{Th}$ . Vysoká aktivita  $^{230}\text{Th}$  a  $^{232}\text{Th}$  byla nalezena nejvíce v kostech, kde činila 55–70 % a dále v plicích, v rozmezí 11 až 27 %. Aktivita izotopu  $^{228}\text{Th}$  v kostech a v plicích byla přibližně 80 % a 5 %. Vysoký obsah izotopu  $^{228}\text{Th}$  v kostech je výsledkem radioaktivního rozpadu  $^{232}\text{Th}$  a zejména rozpadu  $^{228}\text{Ra}$ , který se do kostí dostává skrze trávicí trakt a intravaskulární systém.<sup>33</sup> Dalšími běžnými místy ukládání jsou zejména játra a plicní lymfatické uzliny.<sup>34</sup>

V souvislosti s ukládáním do plicních lymfatických uzlin a plic je spojeno také chemické i radiotoxické působení produktů radioaktivních přeměn thoria a uranu, které jsou obsaženy ve stavebním materiálu jako je písek, štěrk, škvára a další. Tyto radionuklidy se přes  $^{222}\text{Rn}$  a  $^{220}\text{Rn}$  postupně přeměňují na nebezpečné produkty  $^{218}\text{Po}$ ,  $^{214}\text{Pb}$ ,  $^{214}\text{Bi}$  a  $^{214}\text{Po}$ , které se zachycují na prachových částicích a vytváří radioaktivní aerosol usazující se v plicích a kde jako  $\alpha$  i  $\beta$  zářiče poškozují okolní bronchiální tkáň.<sup>35</sup>

## 2.3 Možnosti remediace thoria

Remediační techniky lze obecně charakterizovat jako fyzikálně-chemicko-biologické metody sloužící především ke snížení kontaminace nebo úplné dekontaminace škodlivých látek (revitalizace) v životním prostředí, čehož lze dosáhnout odstraněním, rozkladem, snížením jejich nebezpečnosti či izolací od okolního prostředí.

V případě remediace thoria byly dosud provedeny experimenty využívající elektrokinetických metod<sup>36</sup> a bioremediace<sup>37</sup>.

### 2.3.1 Elektrokinetické metody

Metody jsou založeny (i) na pohybu solubilizovaných nabitých částic, které se na principu elektroforézy pohybují v elektrickém poli k opačně nabitým elektrodám, a/nebo v menší míře (ii) na pohybu částic na principu elektroosmózy<sup>38</sup>, kde jsou

vytvořením elektroosmotického toku, unášeny i neiontové formy. Cílem obou technik je zkoncentrování a precipitace sloučenin, např. ve formě hydroxidu, v okolí elektrody. Metoda je ve velké míře závislá na elektrické vodivosti substrátu, jež je funkcí distribuce vody, a v rámci dané lokality může dosahovat vysoké heterogenity. Vhodným substrátem pro obě techniky jsou různé kaly, sedimenty či vlhké zeminy.

Elektrokinetická remediace byla experimentálně použita k extrakci přibližně  $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  thoria z jílovité půdy, avšak bez většího úspěchu. Příčinou je výrazně zpomalený nebo zastavený transport iontů  $\text{Th}^{4+}$  v elektrickém poli, způsobený vysokou adsorpcí thoria na pevné částice v půdě (kaolinit), tvorba rozmanitých komplexů s organickými nebo anorganickými sloučeninami (nerozpustné soli).<sup>39</sup>

### 2.3.2 Bioremediační techniky

Čištění půdy, vody, různých sedimentů a dalších využitím biologických technik je z velké části zaměřeno na organické polutanty, ale lze je v omezeném rozsahu použít také k remediaci radionuklidů, těžkých kovů, nitrosloučenin anebo kyanidů. Bioremediační proces spočívá v urychlení přirozených biodegradačních procesů nebo v přesně cílené biodegradaci, které snižují riziko nežádoucích přírodních transformací polutantů a pravděpodobnost perzistence neznámých degradačních produktů v životním prostředí.<sup>40</sup>

Bioremediace anorganických látek je vzhledem k jejich neštěpitelnosti, založena na změně jejich transportních vlastností pomocí biotransformačních procesů (oxido-redukční reakce, (de)methylace, komplexační reakce a dalších), imobilizace či mobilizace.<sup>41</sup>

Nejčastěji jsou k bioremediaci anorganických látek využívány mikroorganismy nebo vyšší rostliny, často v kombinaci obojího současně, jelikož kořenový systém rostliny (rhizosféra) je místem značné mikrobiální aktivity s množstvím vzájemných interakcí.

Schopnost biosorpce thoria ( $\text{Th}^{4+}$ ) byla zkoumána na několika druzích bakterií a hub, mezi něž patřily *Mycobacterium smegmatis*<sup>42</sup>, kde nalezená kapacita sorpce činila  $23,7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  sušiny, dále pak *Penicillium chrysogenum*<sup>43</sup> se sorpcí  $388 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  sušiny a *Rhizopus arrhizus*<sup>44</sup> nebo *Aspergillus niger*<sup>44</sup> s kapacitou 116 a  $138 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . Ve všech případech byla schopnost sorpce uranu a thoria zkoumána za účelem využití jako

vysoce efektivních biosorbentů a bioakumulátorů navázaných na pevných nosičích.<sup>45</sup>

Bioremediace životního prostředí použitím rostlin je vzhledem k charakteru diplomové práce věnována nová kapitola (viz dále).

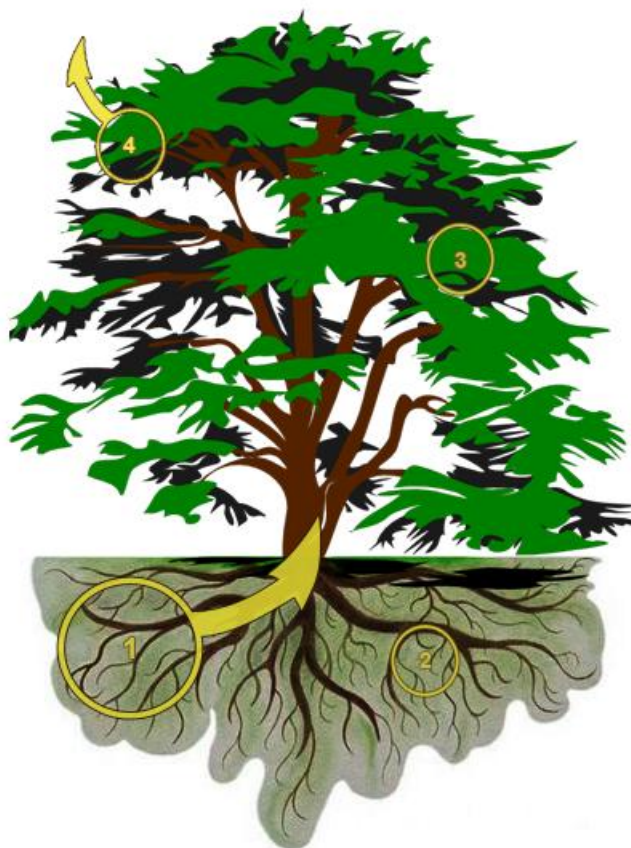
## 2.4 Fytoremediace

Dekontaminace znečištěných ploch představující různé kaly, sedimenty, půdy či podzemní vody je základním cílem všech remediačních technik. Čím se však tyto techniky vzájemně liší je přístup a použitý materiál. Tato práce je zaměřena na využití zelených rostlin za účelem snížení rizika kontaminace širších ploch pomocí akumulace, degradace, imobilizace, inkorporace nebo stabilizace kontaminantů, tzv. fytoremediace.

Fytoremediační techniky využívají přírodních procesů probíhajících za normálních podmínek v rostlinách a jejich bezprostředním okolí. Díky těmto procesům, zahrnující příjem vody a chemických látek v ní rozpuštěných, vnitřní metabolismus rostlin a uvolňování produktů jejich metabolismu do okolí kořenového systému, mohou být látky organické nebo anorganické povahy odstraněny či jinak transformovány<sup>46</sup>. Významnou roli při těchto dějích tvoří enzymatická výbava rostliny. Enzymy jsou schopny degradace organických polutantů s možností zabudování zbylých fragmentů do nově vzniklé rostlinné biomasy<sup>47</sup> nebo modifikace organických látek za účelem zvýšení jejich rozpustnosti a možnosti konjugace s dalšími látkami. Mezi nejdůležitější enzymy podílející se na fytoremediačních procesech patří dehalogenasy, fosfatasy, nitroreduktasy, nitrilasy, karboxylesterasy, mono a dioxygenasy, peroxidasy a peroxygenasy.<sup>48</sup>

Fytoremediace jsou využívány zejména k dekontaminaci organických látek (PAH, PCB, detergenty, výbušniny) a extrakci těžkých kovů (Pb, Cd, Hg, As) a radionuklidů z půdy.

Stejně jako ostatní remediační techniky, lze fytoremediace rozdělit do několika skupin a podskupin dle způsobu zacházení s kontaminantem (Obr. 2.).<sup>49</sup>



Obr. 2. Schematické znázornění fytořediačních procesů v rostlině zahrnujícím fytoextrakci (1), rhizodegradaci, rhizofiltraci, imobilizaci (2), fytodegradaci a fytoakumulaci (3) a v poslední řadě fytovolatilizaci (4) polutantu.

#### 2.4.1 Akumulace (odstranění organického či anorganického polutantu)

##### 2.4.1.1 Fytoextrakce

Fytoextrakce, zejména těžkých kovů a radionuklidů, je založena na vlastnostech rostlin absorbovat, transportovat a ukládat některé z těchto sloučenin do kořenového systému, lépe pak do jejich nadzemní části. V případě některých rostlin je absorpční a akumulací schopnost pro některé látky značná. Tyto rostliny jsou označovány jako tzv. hyperakumulátory. Základním předpokladem pro využití fytoextrakce k dekontaminaci zasažených ploch, je sklizeň nadzemní části rostliny se zkoncentrovaným polutantem po odpovídající době kultivace a jeho další zpracování. Získaný rostlinný materiál je

usušen nebo spálen a bezpečně uskladněn anebo komerčně zpracován pro extrakci („fytomining“), pokud by akumulovanou látkou byl například nikl či měď.<sup>50</sup>

#### 2.4.1.2 Rhizofiltrace (fytofiltrace)

Rhizofiltrace se uplatňuje při odstraňování nízkých koncentrací kontaminantu z velkých objemů znečištěných povrchových, splaškových nebo vyčerpaných podzemních vod využitím kořenového systému rostlin. Primárním cílem zde není přenos kontaminantu do nadzemní části rostliny, jako je tomu v případě fytoextrakce, ale využití kořenového systému k precipitaci na kořenech nebo k absorpci do kořene. Metoda je vhodná pro odstraňování těžkých kovů a radionuklidů.

#### 2.4.2 Degradace (odbourání či přeměna organických sloučenin)

##### 2.4.2.1 Rhizodegradace

Technika rhizodegradace využívá k odstranění či modifikaci organických sloučenin půdních bakterií, které jsou výrazně zmnoženy v důsledku zvýšeného obsahu živin (např. alkoholy, cukry) vylučovaných rostlinou do okolí kořenového systému. Pomnožené mikroorganismy z důvodu dostatku živin značně stimulují svou aktivitu, což je klíčový proces pro efektivní snížení množství kontaminantů v půdě.<sup>51</sup>

##### 2.4.2.2 Fytodegradace

Fytodegradace, někdy též označována jako fytotransformace, je proces, při němž dochází ke snížení množství kontaminantu v okolí kořenového systému rostliny. Proces zahrnuje absorpci, přeměnu a odbourávání kontaminantu jeho včleněním do metabolických procesů rostliny nebo působení enzymů uvolněných kořenovým systémem do půdy, které vede ke snížení koncentrace kontaminantu.

Fytodegradací proces je využíván zejména k odstraňování organických polutantů<sup>52</sup> (PCB, detergenty, PAH, výbušniny), přičemž je nutné zajistit, aby nedocházelo k přeměně na látky toxičtější, nežli byl původní kontaminant.

### 2.4.3 Rozptýlení (odstranění organických nebo anorganických kontaminantů uvolněním do atmosféry)

#### 2.4.3.1 Fytovolatilizace

Fytovolatilizace je děj, při kterém jsou některé kontaminanty přijímané kořenovým systémem rostliny transportovány do nadzemní části a poté transpirovány v plynném stavu do atmosféry. V závislosti na vlastnostech sloučeniny může vlastní transpiraci předcházet biotransformace kontaminantu, kdy z původně netěkavé sloučeniny vznikne těkavá. Tímto mechanismem mohou být extrahovány a uvolněny do atmosféry některé prvky<sup>53</sup> (Hg, Se) nebo organické složky benzínu a dalších látek. Efektivní využití fytovolatilizace v praxi je nicméně diskutabilní, jelikož nedochází k odstranění kontaminace z vody nebo půdy, ale pouze k jejímu přesunu do ovzduší.

### 2.4.4 Imobilizace (snížení mobility organického nebo organického kontaminantu)

#### 2.4.4.1 Fytostabilizace

Kořenový systém rostlin je schopen v závislosti na chemicko-fyzikálních vlastnostech kontaminantu absorpce, adsorpce, komplexace či precipitace polutantu. Díky těmto aspektům se snižuje nebezpečí vymývání rozpustných kontaminantů z půdy, kalů či sedimentů. Fytostabilizace může být také použita k obnovení vegetace kontaminované plochy, kde pro vysokou koncentraci kontaminantů nelze nasadit běžnou vegetaci.

Aplikace každé z jednotlivých fytořediačních technik má svá omezení, která je nutno pečlivě zvážit podle stávající situace a na základě tohoto zhodnocení vybrat nejvhodnější způsob dekontaminace. Tato omezení vycházejí zejména

- i) ze schopnosti většiny rostlin pracovat pouze s určitým typem kontaminantu, což je nedostačující, z důvodu znečištění celou řadou sloučenin,
- ii) schopnost efektivní fytořediace mají rostliny s malým a pomalým nárůstem biomasy; naopak u rychle rostoucích rostlin je fytořediační efekt spíše nízký,

iii) absence údajů o fyziologii, podmínkách růstu rostlin potenciálně vhodných pro fytoremediace či jejich odolnosti vůči patogenům. Tyto faktory značně ztěžují rozhodování pro konkrétní aplikaci.

## 2.4.5 Výhody a nevýhody fytoremediace

### 2.4.5.1 Výhody

Největší výhodou fytoremediačních technik je množství kontaminovaného materiálu určeného k následné likvidaci v porovnání s klasickým vytěžením kontaminované půdy. Mezi další výhody patří<sup>54</sup>:

- *in situ* aplikace – nedochází k transportu kontaminované půdy
- k fytoremediačnímu procesu využita pouze sluneční energie
- nízké náklady – v porovnání s „klasickými“ dekontaminačními technologiemi
- vysoce akceptovatelné veřejností – využití „zelených“ technologií
- dekontaminovaná půda je využitelná k dalším účelům – pěstování technických či energetických plodin
- množství odpadního materiálu (biomasy) – vytěžené biomasy je méně než v případě vytěžené kontaminované půdy

### 2.4.5.2 Nevýhody

Stejně jako ostatní remediační techniky mají i fytoremediace mnoho nevýhod a omezení, mezi které patří<sup>55</sup>:

- nízká tolerance rostlin vůči kontaminantům – koncentrace polutantu v postiženém místě je pro rostlinu toxická a tím fytoremediace neefektivní
- často nízký transport polutantů z kořenového systému do nadzemní části – snadnější a cenově i výhodnější je sklízet pouze nadzemní část
- malý vzrůst a pomalý nárůst biomasy u rostlin vhodných k fytoremediaci
- dlouhodobý proces dekontaminace – až desítky let
- nízká účinnost v porovnání s fyzikálně-chemickými metodami
- afinita rostlin většinou pouze k jednomu druhu polutantu

- nebezpečí kontaminace potravinového řetězce-spásání nasazených rostlin živočichy
- nedostatek rostlinných druhů vhodných k remediaci

## 2.5 Příjem thoria rostlinami

Během přirozeného růstu rostlin dochází k příjmu živin ve formě různých iontů, které se vyskytují v okolí kořenového systému. Tento příjem je řízen transportními mechanismy rostlinných membrán (nespecifický a zprostředkovaný transport)<sup>56</sup> v závislosti na povaze iontu a řadě fyzikálně-chemických faktorů vnějšího prostředí, které rostlinu či chování iontu v kořenovém substrátu ovlivňují.

Pohyb všech iontů uvnitř rostliny je na velké vzdálenosti zprostředkován pohybem vody v xylému (jednosměrný pohyb z kořene do listů) nebo proti směru transpiračního proudu, z listů do kořene, využitím floému. Transport do jednotlivých buněk je již specifický, zprostředkovaný membránovými přenašeči, které umožňují selektivní výběr iontů a jejich případné hromadění.

Podstata toxicity těžkých kovů a radionuklidů spočívá:

- a) v produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), iniciaci Fentonovy reakce a autooxidace,<sup>57</sup>
- b) v záměně esenciálních prvků za těžké kovy v klíčových biomolekulách,
- c) v blokaci biologicky významných funkčních skupin.

Antropogennímu znečištění životního prostředí thoriem a jeho mechanismu působení na rostliny, byla do této doby věnována velmi malá pozornost, přesto z jeho fyzikálně-chemických vlastností je patrné, že toxicita je spíše chemického charakteru, nežli radiologického, přičemž platí předpoklad, že toxičtější jsou pro rostliny rozpustné formy thoria.

### 2.5.1 Distribuce Th v různých částech rostliny

Schopnost akumulace thoria rostlinami byla experimentálně ověřena na pšenici *Triticum vulgare*, kde byly působení dusičnanu thoričitého vystaveny semena a sazenice této rostliny. Bylo zjištěno, že k největší akumulaci dochází při klíčení semen



(2,0 mg·kg<sup>-1</sup> sušiny), přičemž po přesazení (6 dnů po vyklíčení) do čisté půdy, dochází během dalšího 6denního růstu, k významnému poklesu počáteční koncentrace thoria v listech (0,17 mg·kg<sup>-1</sup> sušiny) až na úroveň kontrolního vzorku (<0,02 mg·kg<sup>-1</sup> sušiny). Koncentrace thoria v kořeni (0,87 mg·kg<sup>-1</sup> sušiny) poklesla během další kultivace v půdě 2,7krát a koncentrace v semenech zůstala téměř zachována. Při opačném postupu kultivace, tedy klíčení v čistém médiu a přesazení do kontaminované půdy, byla nalezena nejvyšší koncentrace v kořenech (0,81 mg·kg<sup>-1</sup> sušiny), méně pak v semenech (0,19 mg·kg<sup>-1</sup> sušiny) a listech (0,02 mg·kg<sup>-1</sup> sušiny).<sup>58</sup>

### 2.5.2 Faktory ovlivňující akumulaci

Vstřebávání thoria kořenovým systémem rostliny je značně závislé na prostředí, ve kterém se rostlina nachází, resp. roste. Nejvyšší koncentrace Th byla prokázána v listech (2,02 μg·kg<sup>-1</sup>sušiny) a kořenech (2248 μg·kg<sup>-1</sup>sušiny), při kultivaci v redestilované vodě, nejnižší pak v listech (1,45 mg·kg<sup>-1</sup> sušiny) a kořenech (49,3 mg·kg<sup>-1</sup> sušiny), při kultivaci v půdě. Důvodem je zřejmě tvorba komplexů Th<sup>4+</sup> s různými organickými i anorganickými sloučeninami obsaženými v půdě či hydroponickém médiu a adsorpce na pevné částice. V závislosti na velikosti přídavku thoria a typu růstového média, dochází také k ovlivnění absorpce (snížení) jiných prvků, zejména Sc, Zn a Cs v listech a Fe, Co, Rb, Cs v kořeni.<sup>59</sup>

Pravděpodobnost Th<sup>4+</sup> vytvářet komplexní sloučeniny ve vodních roztocích roste s počtem potencionálních vazebných partnerů, přičemž se zdá, že tato vaznost je závislá na pH a poměru organické/anorganické složky. Bylo prokázáno, že v podzemních vodách se thorium vyskytuje při pH<4,5 ve formě Th(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> či Th(HPO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, v rozmezí pH 4,5–7,5 jako Th(HPO<sub>4</sub>)<sub>3</sub><sup>2-</sup>, při pH>7,5 jako Th(OH)<sub>4</sub>. Na základě porovnání konstant stability pro thorium citrát, oxalát a EDTA, se navíc zdá pravděpodobné, že v organicky bohatých vodách, bažinách, půdních substrátech a sedimentech, organické komplexy převažují nad anorganickými.<sup>60,63</sup>

V souvislosti s akumulací prvků včetně thoria bylo dokázáno, že koncentrace prvků v jednotlivých částech rostliny (kořen, stonek, list) není konstantní veličinou a může se v průběhu vegetačního období měnit. Tyto změny mohou nastat dokonce v průběhu několika hodin, což je nejspíše dáno cirkadiálním rytmem rostliny, jehož průběh je

ovlivňován jednak externími podněty (světlo), tak biologickými hodinami rostliny, které jsou nezávislé na denní/roční periodě. Obě tyto složky ovlivňující rostlinnou transpiraci jsou druhově specifické, a proto lze u různých rostlin nalézt odchylky v citlivosti na teplotu a fotoperiodu.<sup>61,62</sup> Experimenty s pýrem plazivým (*Elytrigia repens*) a jitrocelem větším (*Plantago major*) prokázaly, že v průběhu dne se koncentrace thoria v listech výrazně mění. Tyto změny byly pravidelné s výrazným maximem koncentrace ve 14 hodin.<sup>63</sup>

Během posledních let je ve spojitosti s akumulací látek rostlinami věnována pozornost sloučeninám ze skupiny aminů, konkrétně diaminy (putrescin a kadaverin) a polyaminy (spermin a spermidin), které se nacházejí přirozeně ve volné a/nebo vázané formě, ve všech rostlinných buňkách, kde plní různé funkce. Účastní se buněčného růstu, dělení, apoptózy a pro svoji schopnost ovlivňovat zrání rostlinných pletiv, zasahovat do replikace a translace DNA, jsou považovány za rostlinné hormony.<sup>64</sup>

Z experimentálních pozorování u slunečnice roční (*Helianthus annuus*), u níž v důsledku oxidativního působení kovů  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cd}^{2+}$ , docházelo ke zvýšení peroxidace lipidů a snížení aktivity antioxidantních enzymů askorbát peroxidázy (EC 1.11.1.11), glutathion reduktázy (EC 1.11.1.9) a superoxiddismutázy (EC 1.15.1.1), bylo prokázáno, že přídavek polyaminů do růstového média snižuje peroxidaci a zachovává původní aktivitu antioxidantních enzymů, a tím zvyšují odolnost rostliny proti negativním vlivům oxidativního stresu.<sup>65,66</sup>

### 3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo studium akumulace thoria rostlinami a stresových odpovědí rostlin na jeho přítomnost.

Dílčí cíle:

- 1) Studovat akumulaci thoria v různých částech testovaných rostlin
- 2) Sledovat vliv polyaminů, jakožto potenciálních antioxidantů na příjem thoria
- 3) Stanovit vliv (ne)přítomnosti chelatačních látek na akumulaci thoria
- 4) Ověřit vliv organických kyselin na příjem uranu a stanovit vliv pH
- 5) Porovnat schopnost akumulace thoria s jinými typy tabákových rostlin

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál a metody

#### 4.1.1 Rostlinný materiál

Pro studium akumulace thoria byl vybrán přírodní kultivar tabáku *Nicotiana tabaccum*, La Burley21 (Tab. III.), jehož semena byla získána od Danuty M. Antosiewicz z Fakulty Biologie na Varšavské Univerzitě.

Tato modelová rostlina z čeledi lilkovitých je nejběžnějším druhem tabáku. Jedná se o rychle rostoucí rostlinu s hlubokými kořeny, vysokou produkcí biomasy, dorůstající výšky 1–2 metry, snadným rozrůstáním a množením. Pro tyto své vlastnosti byla nejvhodnějším kandidátem pro studium fytoakumulace.

V rámci experimentů byla schopnost akumulace, za účelem porovnání s jinými typy tabáků, testována na dalších přírodních kultivarech (M 51, Samsun, Xanthi, W 38 a SR 1), GMO z nich získaných (Tab. III.) a tabáku *Nicotiana glauca* (NG).

<b>Kultivar</b>	<b>GMO<sup>67,68,69</sup></b>	<b>Kultivar</b>	<b>GMO<sup>70,71</sup></b>
M 51	M 51 Pro	La Burley 21	TRI 2 – T1 TRI 2 – T1
Xanthi	M II 6 M II 7 PC II 3 PC II 4 PA II 4 PA II 12	Samsun	A C
SR 1	Zm-p60-1-T4 Zm-p60-1-T5		

Tab. III. Přírodní kultivary *Nicotiana tabaccum* s jednotlivými GMO

#### 4.1.2 Použité chemikálie

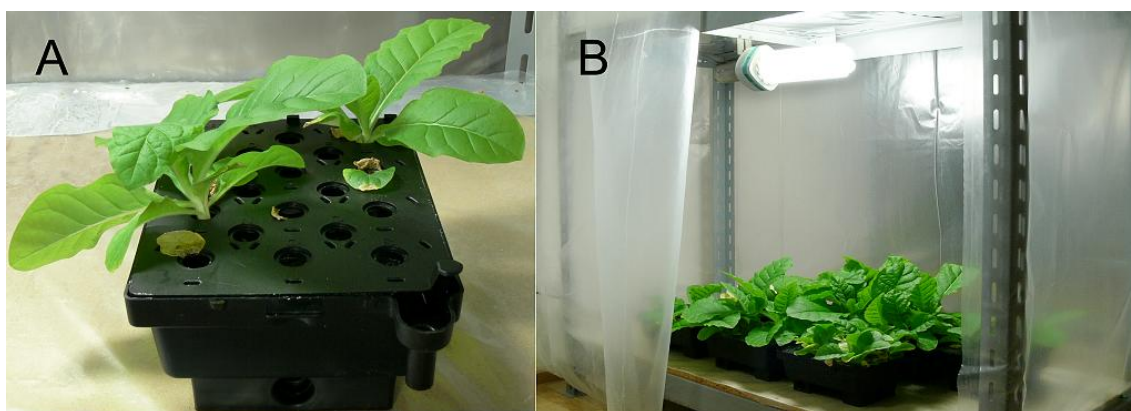
<b>Chemikálie</b>	<b>Výrobce</b>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (p. a.)	Penta
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (p. a.)	Penta
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (p. a.)	Penta
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (p. a.)	Penta
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O (p. a.)	Penta
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (p. a.)	Penta
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O (p. a.)	Penta
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (p. a.)	Penta
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (p. a.)	Penta
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (p. a.)	Penta
NaNO <sub>3</sub> (p. a.)	Penta
HNO <sub>3</sub> 65% (p. a.)	Penta
Kalibrátory Th (5, 10, 20 µg/kg)	Analytika cz
HClO <sub>4</sub> 65% (p. a.)	Penta
NH <sub>4</sub> Cl (p. a.)	Penta
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (p. a.)	Penta
Kyselina šťavelová dihydrát (p. a.)	Lach:Ner
Kyselina L-(+)vinná (p. a.)	Lach:Ner
Kyselina citronová (p. a.)	Lach:Ner
Putrescin (Put) (p. a.)	Fluka
Spermidin (Spd) (p. a.)	Fluka
Spermin (Spm) (p. a.)	Fluka
Kadaverin (Cad) (p. a.)	Sigma–Aldrich
Th(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O (p. a.)	Lachema
deionizovanáH <sub>2</sub> O MilliQAcad.	Millipore
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (p. a.)	Penta
HNO <sub>3</sub> (p. a.) podvarově destilovaná v křemenné aparatuře	Lach:ner

#### 4.1.3 Pre-experimentální kultivace rostlin

Klíčení semen tabáku a primární nárůst do požadované velikosti probíhal v kultivačních krabičkách obsahujících perlit a udržovaných při dostatečné vlhkosti a teplotě ve skleníku. Po dosažení optimální velikosti byly tabáky přesazeny do speciálních kultivačních/experimentálních boxů Araponics (Obr. 4.), kde pokračoval růst již v Hoaglandově hydroponickém médiu (Tab. IV.), který byl připraven míšením nesterilních zásobních roztoků jednotlivých složek a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem a koncentraci. Kultivace probíhala v krytých kultivačních stojanech za stálé teploty 20 °C a světelném režimu 16 hodin světlo/8 hodin tma. Zdrojem světla byly výbojky Plug and Row o výkonu 250 W, které byly umístěny tak, aby světlo dopadalo rovnoměrně na všechny kultivační boxy (Obr. 4).

složka	látka	množství v mg·dm <sup>-3</sup> média
Makroživiny	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	369,70
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	348,51
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	588,07
Fosfátový pufr o pH 5,5	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	291,73
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	46,56
Mikroživiny	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	8,58
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,06
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4,64
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,66
	CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,82
Železnaté ionty	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	17,92
Dusičnany	NaNO <sub>3</sub>	339,98
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	160,09
	NH <sub>4</sub> Cl	213,97

Tab. IV. Složení Hoaglandova hydroponického média



Obr. 4. Kultivační box s rostoucími rostlinami tabáku v hydroponickém médiu (A) a krytý kultivační stojan se zdrojem světla (B).

#### 4.1.4 Experimentální kultivace

Po dostatečném nárůstu biomasy v prekulivaci, byly rostliny tabáku přesazeny do čistých kultivačních boxů v množství 4nebo8 kusů/box, dle typu experimentu, z důvodu statistického vyhodnocení, reprodukovatelnosti a prezentace výsledků.

Thorium a další látky byly do kultivačního boxu přidávány z čerstvě připravených koncentrovaných zásobních roztoků a až jejich naředěním v hydroponickém médiu vznikla požadovaná koncentrace. Výjimku tvořil pouze putrescin aplikovaný ve formě spreje na povrch listů tabáku.

Pokud není uvedeno jinak, byl ve všech experimentech použit kultivar La Burley 21.

##### 4.1.4.1 Akumulace thoria v čase

Pro stanovení akumulace thoria v čase byla zvolena koncentrace Th ve všech kultivačních boxech  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Rostliny byly kultivovány v hydroponickém médiu v množství 4 kusů/box a sklizeny v průběhu 0 (negativní kontrola), 1, 2, 4, 8 a 16 dnů od nasazení experimentu.

##### 4.1.4.2 Vliv různých přísadků na akumulaci

Pro experiment byly zvoleny dvě základní koncentrace thoria 100 a  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Kultivace, resp. kultivační boxy, byly rozděleny do dvou skupin vždy po 7 boxech pro každou koncentraci, přičemž každý box obsahoval 8 rostlin.

Hydroponická média obsahovala přídavky kyseliny vinné, citronové, šťavelové v koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , dále pak média postrádala přítomnost železnatých iontů a fosfátové složky a v poslední řadě byl aplikován postřik roztokem putrescinu o koncentraci  $75 \text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Sklizení probíhalo v časových úsecích 7 a 14 dnů, vždy po 4 rostlinách/box.

#### *4.1.4.3 Akumulace v přítomnosti organických kyselin*

V experimentu byla ve všech kultivačních boxech zvolena stejná koncentrace thoria  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Pro kultivaci bylo použito 40 rostlin tabáku rozdělených do 10 boxů po 4 rostlinách. Hydroponická média obsahovala přídavky kyselin vinné, citronové, šťavelové v koncentraci 100, 250 a  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Poslední kultivační box bez přídavku kyseliny sloužil jako kontrola. V průběhu experimentu bylo měřeno pH všech boxů v časových intervalech 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 a 168 hodin a všechny rostliny byly sklizeny 7 dní po nasazení experimentu.

#### *4.1.4.4 Ovlivnění akumulace přítomností PA*

Na stanovení akumulace bylo použito 40 rostlin tabáku, které byly rozděleny do 5 kultivačních boxů po 8 rostlinách. Jednotlivé boxy obsahovaly kromě thoria v koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , přídavky kadaverinu, putrescinu, sperminu a spermidinu v koncentraci  $750 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , poslední box neobsahující žádné PA, byl použit jako kontrola. Rostliny byly sklizeny v průběhu 7 a 14 dnů po 4 rostlinách z každého boxu.

#### *4.1.4.5 Schopnost akumulace v (ne)přítomnosti fosfátové složky*

Pro experiment bylo vybráno 40 rostlin tabáku rozříděných do 8 kultivačních boxů po 4 rostlinách. Boxy byly rozděleny na dvě skupiny po 4 boxech, přičemž první z nich obsahovala klasické hydroponické médium s přidaným thoriem o vzrůstající koncentraci 50 až  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a druhá médium ochuzené o fosfátovou složku, taktéž s rostoucí koncentrací Th. Během kultivace bylo měřeno pH ve všech boxech v časových intervalech 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 a 168 hodin a všechny rostliny byly sklizeny 7 dní po nasazení experimentu.



#### 4.1.4.6 Porovnání akumulace kultivaru *La Burley 21* s ostatními kultivary a jejich GMO

Pro porovnání akumulace mezi jednotlivými kultivary a jejich GMO (Tab. III) byly vzaty od každého kultivaru a GMO 4 rostliny, celkem tedy 80 rostlin, rozdělených do 20 kultivačních boxů. Každé hydroponické médium obsahovalo thorium v koncentraci 200  $\mu\text{mol/l}$ . Všechny rostliny byly sklizeny po 14denní kultivaci.

#### 4.1.5 Zpracování rostlinného materiálu po ukončení experimentu

Rostlinný materiál získaný během experimentu byl během sklizně rozdělen na 3 samostatné části – kořen, stonk a list. Kořeny byly důkladně omyty v destilované vodě, aby došlo k vymytí nenavázaného thoria, a společně se stonkem a listy, byly jednotlivě dány do vzorkovacích pytlíků a skladovány při teplotě  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  v mrazicím boxu.

##### 4.1.5.1 Lyofilizace

Zamražené vzorky byly lyofilizovány do úplného vysušení na přístroji FreeZone 2,5 firmy Labconco při teplotě  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a tlaku přibližně 16 Pa.

##### 4.1.5.2 Mineralizace

Vysušené vzorky byly jednotlivě váženy na analytických vahách, přičemž každý vzorek nad 0,25 g byl drcen a promíchán, a pro mineralizaci byla odebrána jeho reprezentativní část nepřesahující hranici 0,25 g. Zvážené vzorky byly přesypány do jednotlivých varných zkumavek a zality 5ml mineralizační směsí (65%  $\text{HNO}_3$  a 65%  $\text{HClO}_4$  smíchané v poměru 85:15). Takto byly vzorky ponechány po dobu minimálně 24 hodin při laboratorní teplotě. Po uběhnutí této doby byly vzorky promíchány, umístěny do vyhřívaných komor mineralizačního bloku a postupným zahříváním až na teplotu  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  rozloženy. Po úplném rozpuštění rostlinného materiálu, ne však dříve než po 4 hodinách, byla teplota postupně zvýšena až na  $190\text{ }^{\circ}\text{C}$  a přibližně po dobu 2 hodin byl odpařován přebytek mineralizační směsi.

Po vyhladnutí bylo ke všem vzorkům přidáno 2,5 ml 20% v/v  $\text{HNO}_3$  a zkumavky zahřány na  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 30 minut.

Po vychladnutí byly vzorky kvantitativně převedeny do plastových vzorkovnic, doplněny destilovanou vodou do celkového objemu 10 ml a až do doby kvalitativního a kvantitativního stanovení thoria ponechány při laboratorní teplotě.

#### 4.1.6 Stanovení koncentrace thoria ve vzorcích pomocí ICP–MS

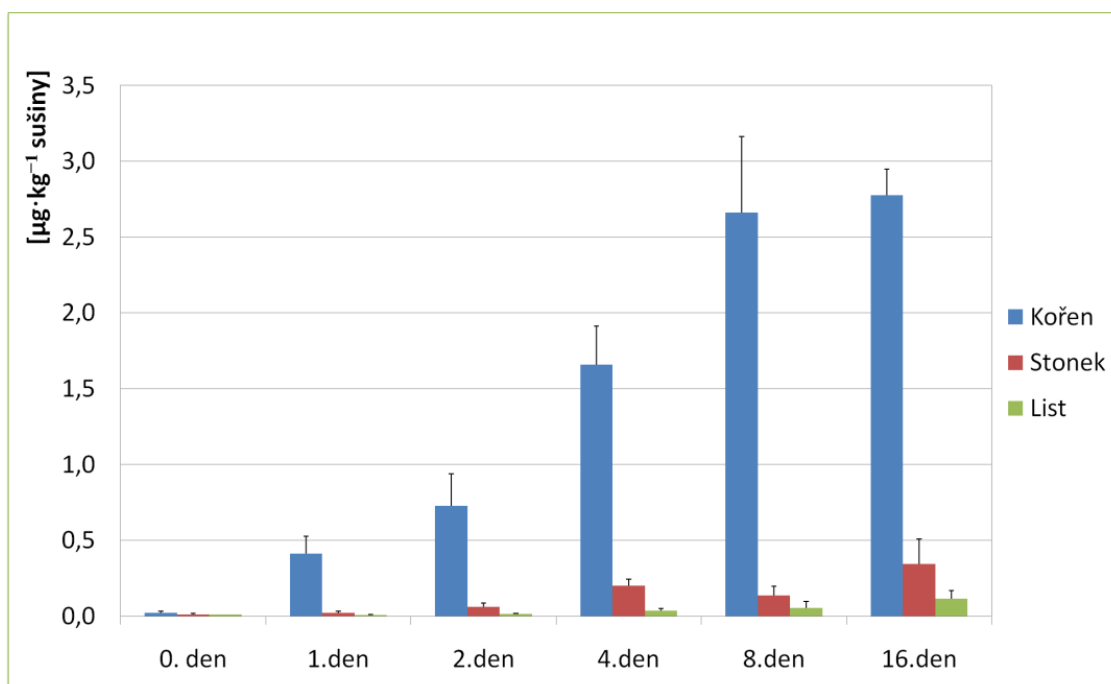
Obsah Th v mineralizovaných vzorcích byl vzhledem k nízkým koncentracím a možným interferencím stanoven na hmotnostním spektrometru ICP-MS X Series 2 Thermoanalytical s indukčně vázaným plazmatem. Dávkování vzorku probíhalo pomocí automatického dávkovače, přičemž musely být některé vzorky 100krát ředěny do 2% HNO<sub>3</sub> (v/v). Převedení vzorku na aerosol probíhalo pomocí skleněného koncentrického nebulizéru (zmlžovače), při průtocích nosného plynu argonu 0,9 L·ml<sup>-1</sup>, chladicího plynu Ar 13 L·ml<sup>-1</sup> a přídatného Ar 1,3 L·ml<sup>-1</sup>. Ionizace vzorků probíhala v prostředí indukčně vázaného plazmatu buzeného radiofrekvenčním generátorem (RF) o výkonu 1400W. Před vlastním měřením vzorků byla optimalizována iontová optika pomocí základního roztoku Th o koncentraci 10 µg·kg<sup>-1</sup> se zaměřením na izotop <sup>232</sup>Th. Jako interní standard byl použit izotop <sup>209</sup>Bi (roztok 10 µg·kg<sup>-1</sup> Bi v 2% v/v HNO<sub>3</sub>) s výstupními parametry citlivosti > 400 000 cps a tvorbou oxidů Me/MeO < 0,5 %. Koncentrace thoria ve vzorku byla stanovena metodou kalibrační přímky použitím kalibračních roztoků o vzestupné koncentraci 5, 10, 20 µg·kg<sup>-1</sup> Th, přičemž hodnoty koncentrací byly aritmetickým průměrem třech opakování.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Závislost akumulace thoria na čase

Vzhledem k použitému kultivaru La Burley 21, o kterém v souvislosti s akumulací thoria není mnoho známo, bylo potřeba zjistit, zdali dochází k akumulaci a jaká je rychlost této akumulace. Z tohoto důvodu byl nasazen základní experiment probíhající v hydroponickém médiu pouze s obsahem thoria o koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (Obr. 5.).

Z Obr. 5. je patrné, že k akumulaci thoria v rostlinách tabáku dochází již v prvním dni od započetí kultivace, přičemž koncentrace v rostlinách během 14 dnů stále roste. Dále je zřejmé, že koncentrace Th se postupně zvyšuje ve všech částech rostliny (kořen, stonek, list), přičemž nejvyšší koncentrace (téměř  $3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) byla detekována v kořeni 8. a 16. den od začátku kultivace.



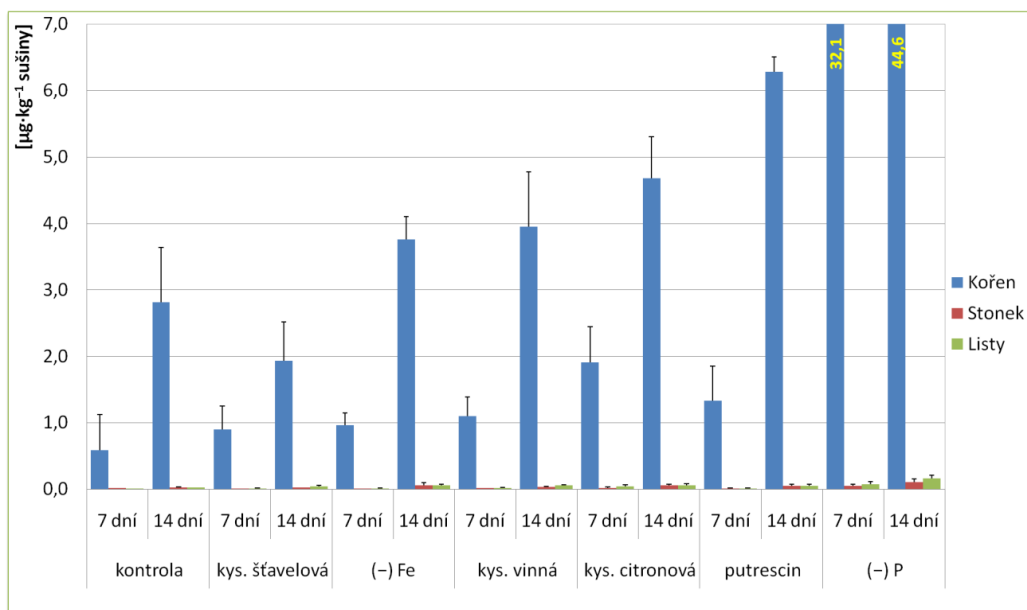
Obr. 5. Obsah thoria v jednotlivých částech rostliny (kořen, stonek, listy) v průběhu 16 denní kultivace při koncentraci Th v Hoaglandově hydroponickém médiu,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

## 5.2 Vliv (ne)přítomnosti organických/anorganických látek na akumulaci

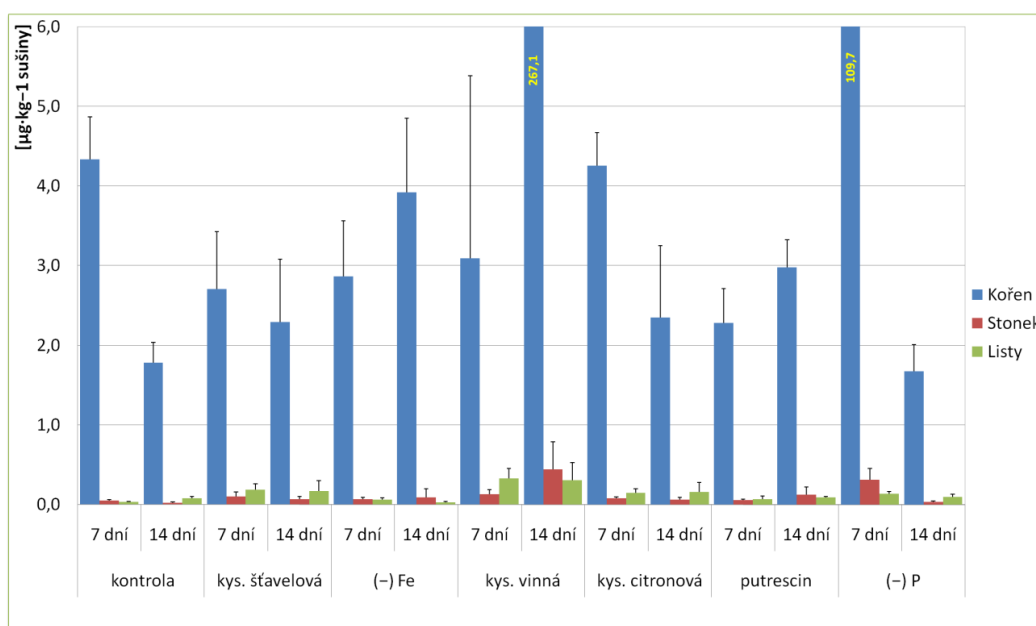
Rostliny tabáku La Burley 21 byly kultivovány v klasickém Hoaglandově hydroponickém médiu a ve dvou případech v médiu ochuzeném o fosfáty anebo železnaté ionty. Média obsahovala na základě uspořádání experimentu thorium ve dvojí koncentraci, a to 100 nebo 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , dále pak jednotlivé přídavky organických kyselin šťavelové, citronové anebo vinné o koncentraci 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Ochuzená média obsahovala pouze výše popsané thorium bez dalšího přídavku (Obr. 6., 7.).

Bylo zjištěno, že ve všech případech dochází k akumulaci thoria z média, přičemž v případě kyseliny vinné, citronové, postřiku putrescinem a při nedostatku železa je koncentrace v kořeni v období mezi 7 a 14 dnem zvýšena 2 až 4krát (Obr. 6.). V případě absence fosfátů, obsah thoria v kořeni činí po 7 dnech kultivace dokonce až 32,1  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Z Obr. 6. je dále patrné, že translokace do stonku a listů je opět nejvyšší v nepřítomnosti fosfátů v médiu, méně pak v případě absence železnatých iontů a přídavků organických kyselin, z nichž největší vliv na akumulaci má kyselina citronová. Koncentrace thoria je ve všech částech rostliny až na výjimku v podobě kyseliny šťavelové (14 dní) vždy vyšší oproti kontrole.

V případě kultivace ve stejných typech médií, avšak s obsahem thoria o koncentraci 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (Obr. 7.), dochází k výrazným změnám oproti předchozímu experimentu. Akumulace je ve všech případech větší oproti předcházející kultivaci, již po 7 dnech kultivace, přičemž největší koncentraci lze vidět v kořeni (109,7  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) při použití bezfosfátového média. V případě ostatních médií je nejvíce patrná akumulace v kořeni, stoncích a listech v přídavku kyseliny vinné, citronové a šťavelové, méně pak u postřiku putrescinem a absence železnatých iontů. Během dalších 7 dnů, dochází k výrazným posunům v absorpci thoria k nižším koncentracím a to ve všech částech rostliny, viditelné zejména u bezfosfátového média, dále u přídavku kyseliny citronové, šťavelové i kontroly. Výrazně opačný trend je naopak u kyseliny vinné, kde koncentrace výrazně vzrostla v poměru kořen:stonek:list 90:13:5krát, oproti sedmému dni.



Obr. 6. Obsah thoria v jednotlivých částech rostliny (kořen, stoněk, listy) po 7 a 14 dnech kultivace při koncentraci Th  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v Hoaglandově hydroponickém médiu bez přídavku (kontrola) a s přídavky  $100 \mu\text{M}$  kyseliny vinné, citronové, šťavelové,  $75 \text{mM}$  putrescinu (postřik), absence fosfátů (-P) a železnatých iontů (-Fe).



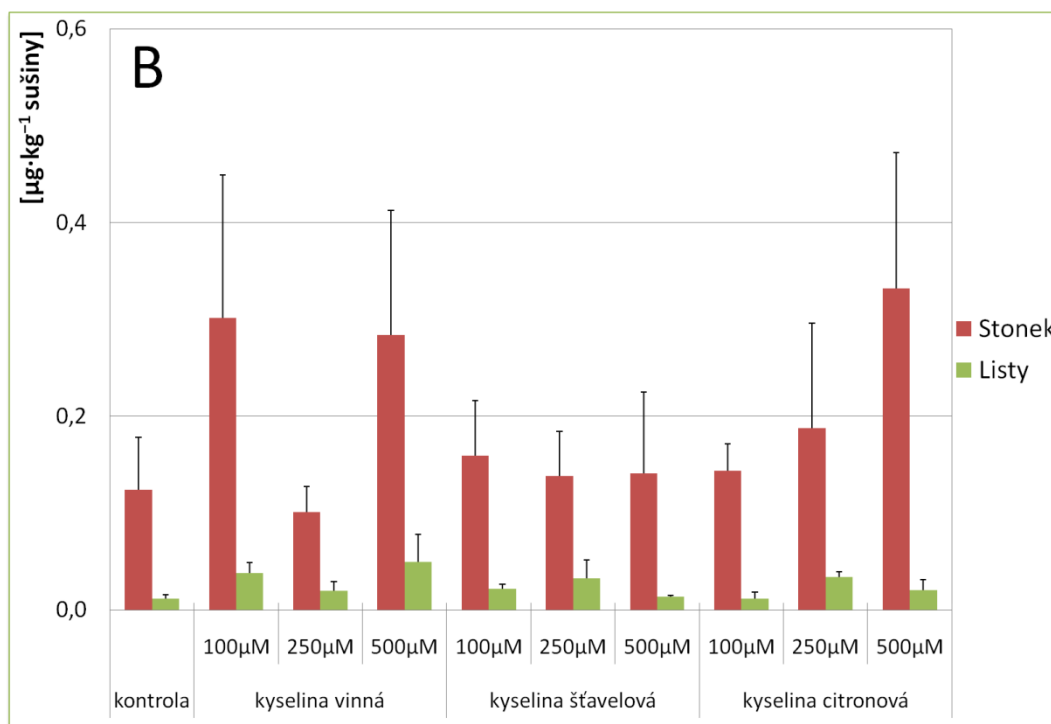
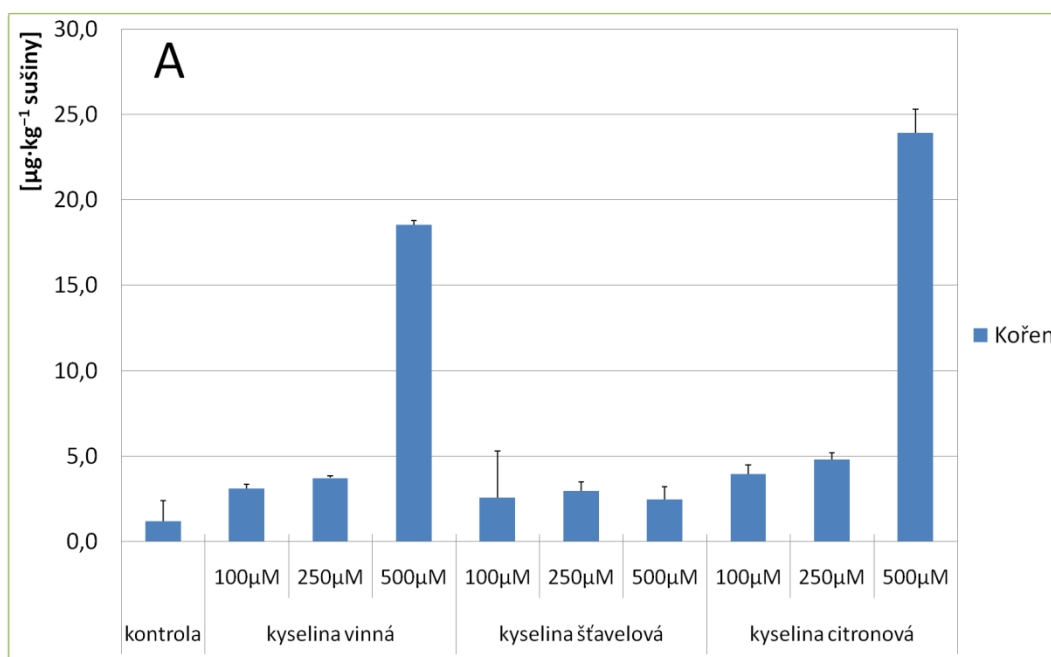
Obr. 7. Obsah thoria v jednotlivých částech rostliny (kořen, stoněk, listy) po 7 a 14 dnech kultivace při koncentraci Th  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v Hoaglandově hydroponickém médiu bez přídavku (kontrola) a s přídavky  $100 \mu\text{M}$  kyseliny vinné, citronové, šťavelové,  $75 \text{mM}$  putrescinu (postřik), absence fosfátů (-P) a železnatých iontů (-Fe).

### 5.3 Vliv organických kyselin na akumulaci

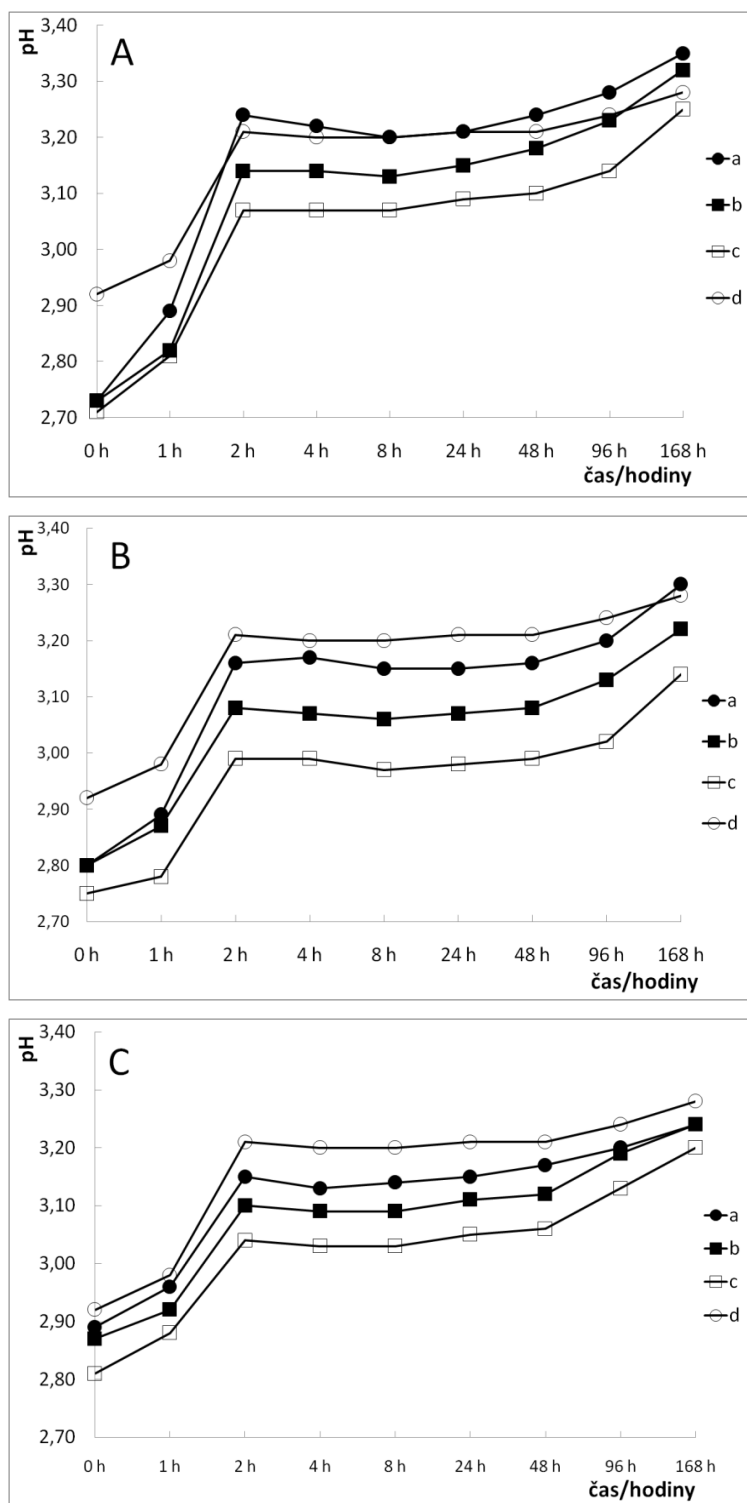
Na základě výsledků experimentu s ovlivněním akumulace různými přísadkami či naopak absencí složek média, byla provedena kultivace tabáku při konstantní koncentraci thoria,  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , v hydroponickém médiu a jednotlivých přísadkách kyseliny citronové, vinné, šťavelové o vrůstající koncentraci 100, 250, 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (Obr. 8.). Průběžně bylo měřeno pH média v časových intervalech 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 a 168 hodin od začátku kultivace (Obr. 9.).

Na Obr. 8. lze pozorovat u jednotlivých přísadků zvýšenou koncentraci thoria ve všech částech rostliny oproti kontrole, přičemž nejvyšší množství thoria je akumulováno v kořeni. Trend akumulace thoria není s rostoucí koncentrací kyseliny v hydroponickém médiu stejný ve všech rostlinách tabáku. Distribuce thoria v rostlině v přítomnosti kyseliny šťavelové je značně různorodá. V rámci zvyšování koncentrace kyseliny v médiu, dochází k různému nárůstu/poklesu koncentrace v kořeni i listech, obsah ve stonku zůstává konstantní. Zvyšující se koncentrace kyselin vinné a citronové má vliv na zvýšenou akumulaci thoria v kořenech, obsah ve stonku a listech je opět nerovnoměrný, dochází k vzájemně protichůdným zvýšením a snížením koncentrací.

Během experimentu byl u jednotlivých médií zjištěn patrný vliv koncentrace kyselin na počáteční hodnotu pH, která je nižší vůči kontrole a dále klesá s jejich rostoucí koncentrací (Obr. 9.). V průběhu 7 denní kultivace se pH zvyšuje směrem k hodnotě pH kontroly.



Obr. 8. Obsah thoria v kořeni (A), stonku a listech (B), po 7 dnech kultivace při koncentraci  $\text{Th}$ ,  $250\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , v Hoaglandově hydroponickém médiu bez přídavku (kontrola) a s přídavky 100, 250 a  $500\mu\text{M}$  kyseliny vinné, citronové a šťavelové.



Obr. 9. Změny pH hydroponického média v průběhu 7 denní kultivace, při koncentraci,  $Th\ 250\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , v Hoaglandově hydroponickém médiu bez přídavku (kontrola (d)) a s přídavky: (A) kyseliny vinné; (B) šřavelové; (C) citronové; v koncentracích  $100$  (a),  $250$  (b) a  $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (c).

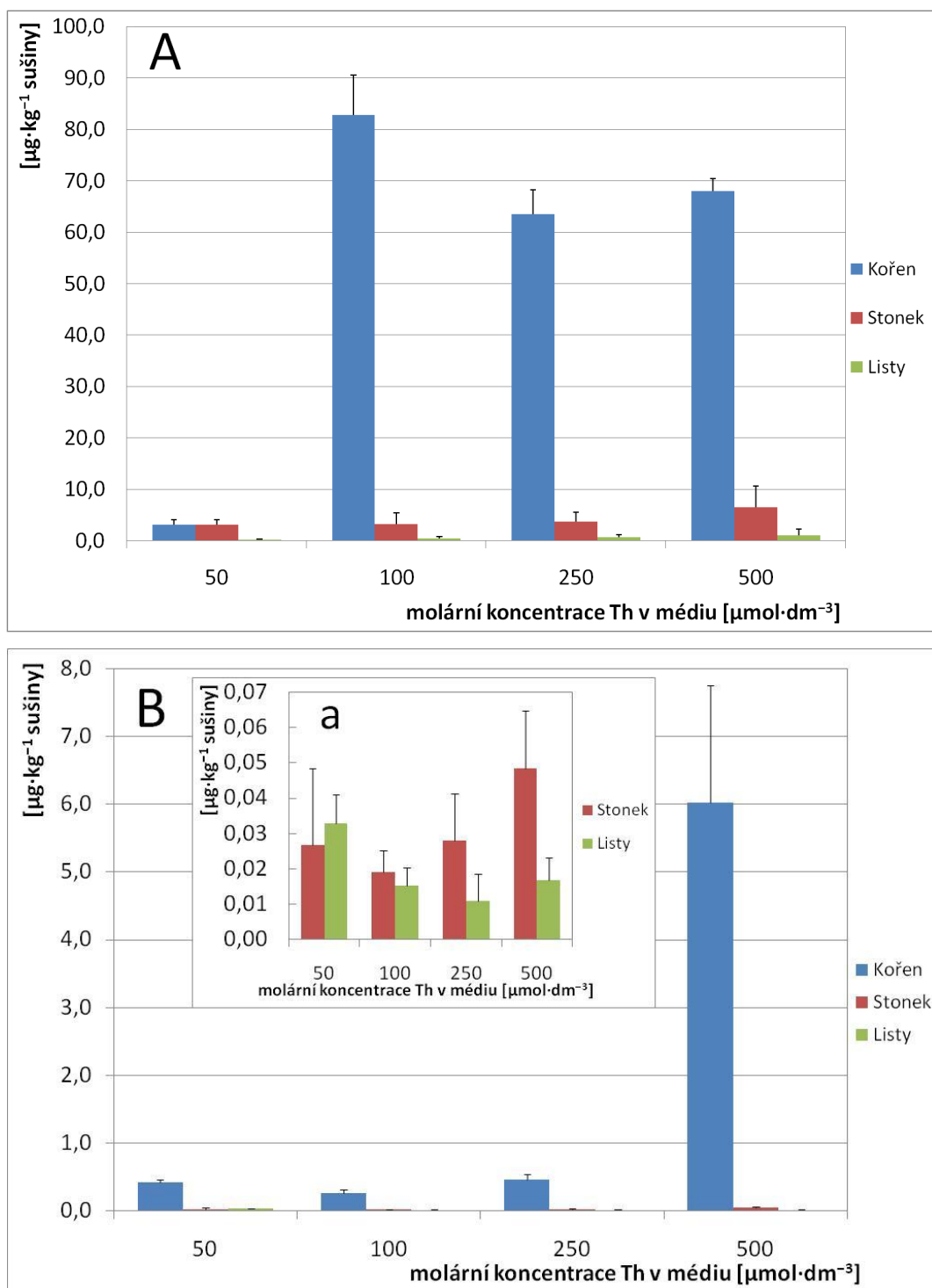


## 5.4 Vliv (ne)přítomnosti fosfátové složky média na akumulaci

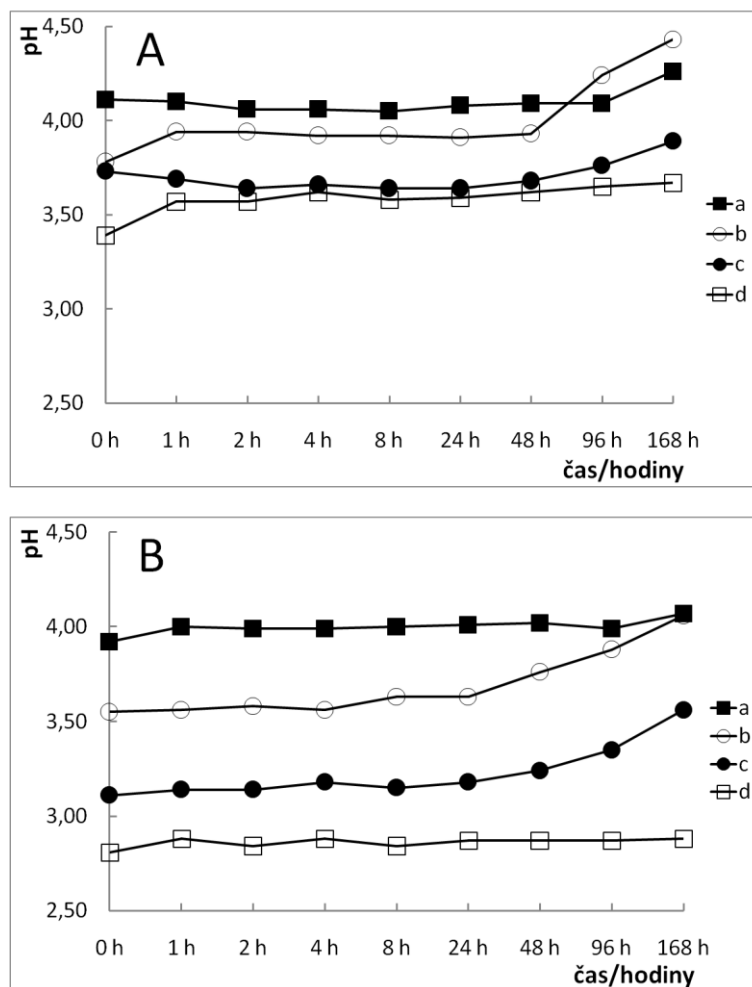
Z primárního experimentu s ovlivněním akumulace různými přísadami či naopak absencí složek média, byla na základě získaných výsledků provedena kultivace rostlin tabáku v klasickém Hoaglandově hydroponickém médiu (fosfátové) a stejném médiu, avšak ochuzeném o fosfáty (bezfosfátové). Jednotlivá média obsahovala dále thorium o zvyšující se koncentraci 50, 100, 250 a 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (Obr. 10.). Během kultivace bylo měřeno pH média v časových intervalech 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 a 168 hodin od začátku kultivace (Obr. 11.).

V průběhu 7 denní kultivace dochází k nárůstu koncentrace thoria ve všech částech rostliny u obou použitých médií (Obr. 10.), nicméně zvýšení je u bezfosfátového média v porovnání s fosfátovým výrazně vyšší. Akumulace thoria rostlinou významně roste s jeho zvyšující se koncentrací v médiu, přičemž jeho nejvyšší obsah byl pozorován v kořenech v obou případech použitých médií, výrazně méně pak ve stonku a listech.

V průběhu experimentu byl u jednotlivých médií zjištěn patrný vliv koncentrace thoria na počáteční hodnotu pH, která se s rostoucí koncentrací snižuje u obou typů použitých médií (Obr. 11.). V případě fosfátového média je počáteční pokles pH u koncentrací thoria 250 a 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  výrazně větší než u bezfosfátového. Z Obr. 11 je patrné, že v průběhu 7 denní kultivace hodnota pH téměř ve všech médiích roste až na hranici hodnoty pH=4.



Obr. 10. Obsah thoria v jednotlivých částech rostliny (kořen, stonek, listy) po 7 dnech kultivace při koncentraci Th 50, 100, 250, 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v Hoaglandově hydroponickém médiu ochuzeném o fosfáty (A) a klasickém médiu s obsahem fosfátů (B). Doplňující obrázek (a) zvětšuje oblast obsahu thoria ve stonku a listech obrázku B.

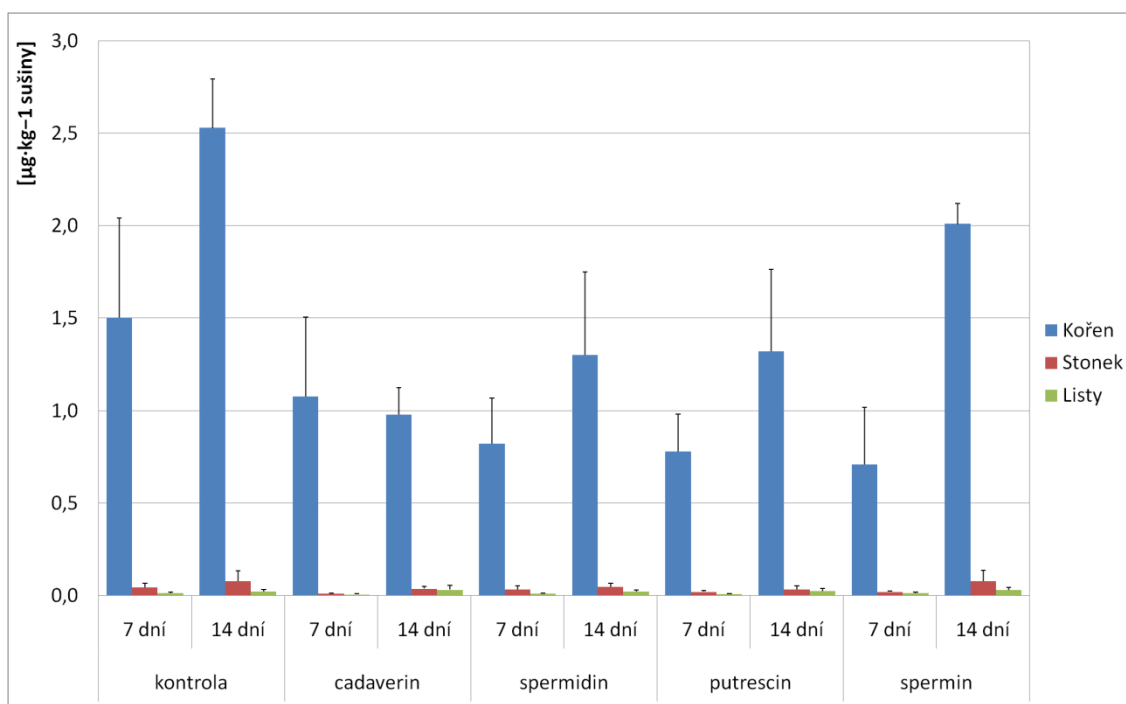


Obr. 11. Změny pH média v průběhu 7 denní kultivace, při koncentraci Th 50 (a), 100 (b), 250 (c) a  $500\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (d), v Hoaglandově hydroponickém médiu ochuzeném o fosfáty (A) a klasickém médiu s obsahem fosfátů (B).

## 5.5 Vliv PA na akumulaci

V primárním experimentu s ovlivněním akumulace různými přísadky či naopak absencí esenciálních složek média, byla pozorována zvýšená akumulace v přítomnosti putrescinu, který byl aplikován ve formě postřiku roztokem o koncentraci 75mM. Na základě tohoto pozorování byla provedena kultivace tabáku v Hoaglandově hydroponickém médiu s konstantní koncentrací thoria,  $100\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , a s jednotlivými přísadky putrescinu (Put), sperminu (Spm), spermidinu (Spd) a kadaverinu (Cad) s jednotnou koncentrací  $100\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (Obr. 12.).

Z Obr. 12 je patrné, že v průběhu 14 denní kultivace dochází k nárůstu koncentrace thoria ve všech částech rostliny, přičemž se nejvíce akumuluje v kořeni, méně ve stonku a listech. Akumulace thoria je ve všech případech přidavků PA v porovnání s kontrolou snížena zejména v kořeni, kde je pokles po celou dobu kultivace 2 až 3násobný, s výjimkou sperminu, kde obsah v kořeni po 14 dnech výrazně vzrostl. Koncentrace ve stoncích je po celou dobu kultivace nižší, nežli u kontroly, obsah thoria v listech je u všech rostlin víceméně totožný.

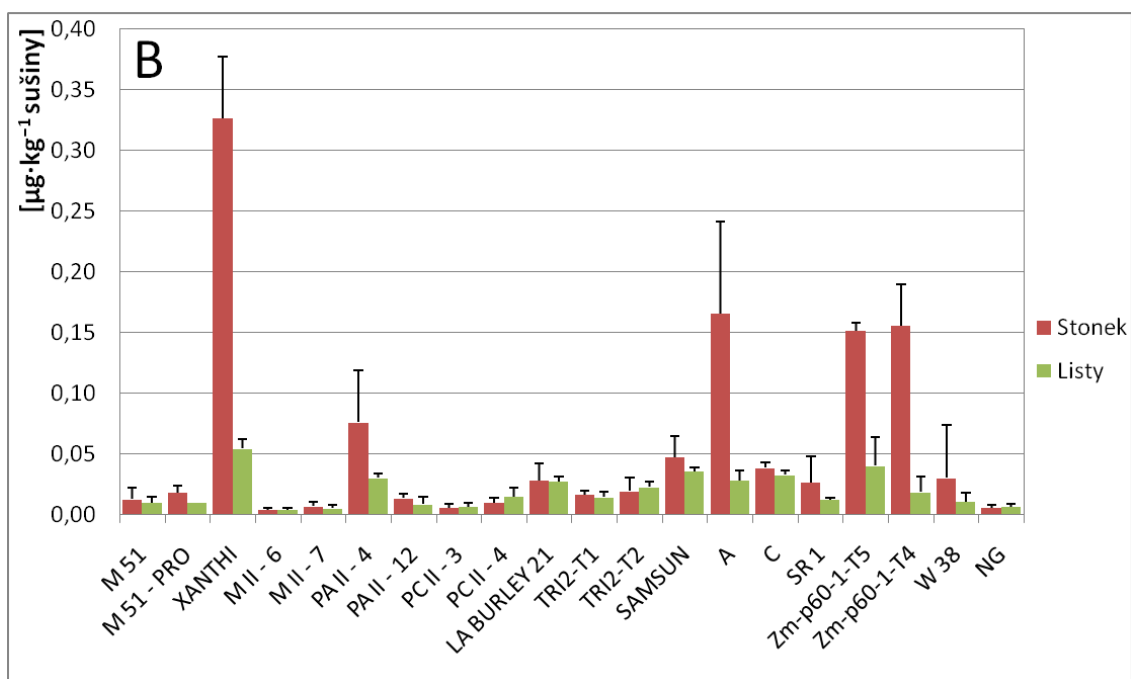
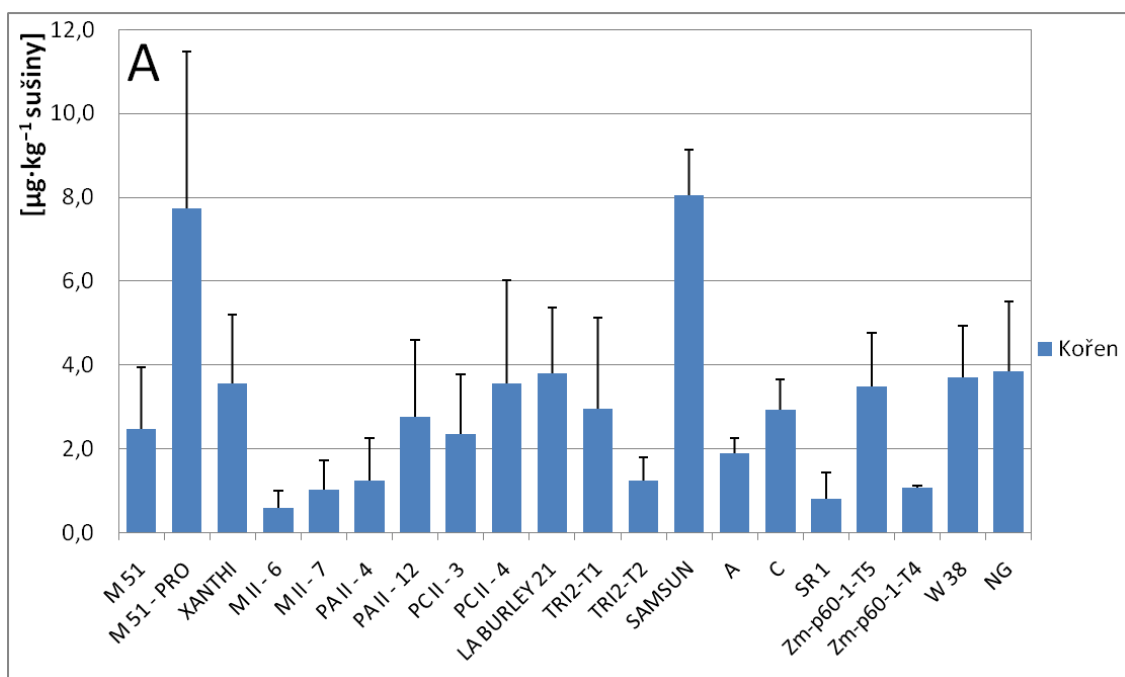


Obr. 12. Obsah thoria v jednotlivých částech rostliny (kořen, stoněk, listy) po 7 a 14 dnech kultivace při konstantní koncentraci Th,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , v Hoaglandově hydroponickém médiu bez přidavku (kontrola) a s přidavky kadaverinu, spermidinu, putrescinu a sperminu v koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

## 5.6 Porovnání akumulace kultivaru La Burley 21 s ostatními kultivary a jejich GMO

Šest přírodních kultivarů tabáku *Nicotiana tabacum*, 13 jejich genetických modifikací (GMO) a tabák *Nicotiana glauca* (NG) bylo kultivováno 14 dnů při shodné koncentraci Th v hydroponickém médiu,  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (Obr. 13.).

Na Obr. 13. lze pozorovat nárůst koncentrace thoria ve všech částech rostliny u každého druhu použitého tabáku, přičemž nejlepší poměr koncentrací kořen:stonek:list, vykazují kultivary **Xanthi**, **Samsun** a jejich GMO **PA II 4** a **C**, dále pak GMO kultivaru **SR 1**, **Zm-p60-1-T5**. Obsah Th v kořenech je u všech rostlin oproti stonku a listům výrazně vyšší, u některých druhů je zvýšení až 80násobné. Koncentrace Th v kultivaru La Burley 21 je vyšší než je tomu u jeho GMO. Opačná situace je naopak u kultivaru SR 1, jehož koncentrace je ve všech částech nižší než u jeho GMO. V případě kultivaru Xanthi, obsahují všechny jeho GMO nižší koncentraci Th, zejména ve stonku a listech. Ostatní kultivary i jejich GMO akumulují se stejnou variabilitou jako je tomu u výše popsaných rostlin tabáku.



Obr. 13. Obsah thoria v kořeni (A), stonku a listech (B) u vybraných přírodních kultivarů *N. tabaccum*, jejich GMO a *N. glauca* (NG), po 14 dnech kultivace při koncentraci Th v Hoaglandově hydroponickém médiu,  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

## 6 DISKUZE

Akumulace thoria a studium stresových odpovědí rostlin na jeho přítomnost zahrnovala celkem 6 experimentů, které dokumentují akumulaci a distribuci thoria v celé rostlině. Nejvyšší koncentraci thoria lze vždy nalézt v kořenech, výrazně méně pak ve stonku a listech. Tyto výsledky se v hlavních bodech shodují s již publikovanými pracemi<sup>59,58,63</sup>. Lze předpokládat, že vysoká koncentrace Th v kořeni je způsobena nejen jeho absorpcí, ale také jeho povrchovou adsorpcí. Dále bylo zjištěno, že jsou tyto rostliny nejen schopny thorium v sobě akumulovat, ale také ho v průběhu delší kultivace distribuovat ve všech svých částech.

V závislosti na (ne)přítomnosti určitých látek a esenciálních složek média, dochází ke zvýšení či snížení akumulace rostlinou. Za největšího činitele ovlivňujícího akumulaci lze považovat (ne)přítomnost fosfátů v médiu. Z výsledku experimentů je patrné, že jejich absence vede k významně vyšší (až 100násobné) akumulaci ve všech částech rostliny, přičemž nejvyšší koncentrace lze opět najít v kořeni (až  $82 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), méně ve stonku a listech. Lze se domnívat, že vysoký nárůst koncentrace je způsoben dostupností rozpuštěného  $\text{Th}^{4+}$  v hydroponickém médiu, které jinak v přítomnosti fosfátů pravděpodobně tvoří pro rostlinu málo dostupné nerozpustné fosfothoričité komplexy<sup>59</sup>. Podobné chování bylo prokázáno u uranu, který se svým chováním blíží thoriu, a jenž tvoří v médiu podobné fosfát-uranové komplexy.<sup>72</sup> Jelikož jsou fosfáty pro rostliny esenciální složka a během kultivace v bezfosfátovém médiu nedocházelo k viditelným negativním změnám jejich růstu, vývoji či zabarvení, lze se domnívat, že rostliny měli zásobu fosfátu z pre-experimentální fáze kultivace.

Vliv na akumulaci Th z média mají dále organické kyseliny, z vybraných zejména kyselina vinná a citronová, které zvyšují akumulaci až 3krát oproti kontrole. Vliv kyseliny šťavelové byl nižší, než u výše zmíněných kyselin, avšak v porovnání s kontrolou je nárůst akumulace viditelný. V souvislosti s působením kyselin na chování rostlin a případnou akumulaci v hydroponických médiích není mnoho známo, a proto se lze pouze dohadovat, zda ke zvýšené akumulaci v přítomnosti organických kyselin dochází zvýšením rostlinné transpirace, chemickou reakcí (vazba Th s kyselinou) a tím zvýšenou biodostupností, změnou rozpustnosti<sup>60</sup> thoria snížením pH média nebo kombinací těchto možností.

Všechny látky popsané v předchozích odstavcích koncentraci thoria ve všech částech rostliny zvyšovaly. V případě přítomnosti diaminů a polyaminů (PA) v hydroponickém médiu dochází k efektu přesně opačnému, tedy snížení koncentrace Th ve všech částech rostliny, viditelnému zejména po 14 dnech kultivace. Na výsledcích akumulace v přítomnosti putrescinu lze pozorovat, že akumulace rostlinou je ovlivněna způsobem aplikace PA. Pravidelný postřik plochy listů roztokem putrescinu nezpůsobil žádné snížení na rozdíl od přídatku v hydroponickém médiu. Vzhledem k dokumentovanému antioxidantivnímu působení PA v rostlinách<sup>64</sup>, lze na základě výsledků soudit, že snížená akumulace thoria v rostlině by mohla být způsobena zvýšením odolnosti zejména kořenového systému rostliny vůči „stresu“ vyvolaného přítomností Th v médiu.

Výsledky experimentů s (ne)přítomností fosfátů v médiu a přídatky organických kyselin, u nichž byla v průběhu kultivace měřena změna pH, poukázaly na vliv použité koncentrace thoria, přítomnost fosfátů a organických kyselin, na rostlinu i médium. Vysoká koncentrace thoria v médiu s obsahem fosfátů a vysoké koncentrace organických kyselin vedou k dramatickému poklesu pH takového média. Tento pokles, jenž by mohl být vyvolán chemickými reakcemi jednotlivých látek v médiu, však není během celé kultivace konstantní, ale má trend nárůstu k hodnotě pH=4. Zdá se pravděpodobné, že zvýšení by mohlo být způsobeno rostlinnými exudáty, pomocí nichž rostliny ovlivňují své okolí. Tento předpoklad potvrzuje výsledek experimentu s vysokou koncentrací Th ( $500 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) v kombinaci s obsahem fosfátů, při kterém v důsledku úhynu rostlin, nedošlo k výrazné změně pH po celou dobu kultivace. K úhynu rostlin docházelo také během experimentu s použitím téže  $500\mu\text{M}$  koncentrace Th v kombinaci s organickými/anorganickými přídatky, což mělo za následek velmi nepravidelnou distribuci Th oproti experimentu se  $100\mu\text{M}$  koncentrací Th v médiu.

Na základě porovnání akumulace kultivaru La Burley 21 s jeho GMO a dalšími vybranými kultivary, jejich GMO a s rostlinami *N. glauca*, bylo prokázáno, že studovaný kultivar vykazuje oproti jiným kultivarům průměrnou akumulaci, avšak s velmi dobrým distribučním poměrem koncentrací kořen:stonek:list. Výrazně lepšími akumulátory se zdají být například kultivary Xanthi, Samsun, GMO kultivaru SR 1, Zm-p60-1-T5. Genetická modifikace tabáku Zm-p60-1-T5 spočívala ve zvýšené expresi enzymu Zm-p60-1, který je zapojen do regulace metabolismu cytokinů, jež ovlivňují odpověď rostlin na nepříznivé podmínky v jejich okolí a mohou tak ovlivnit akumulaci.



## 7 ZÁVĚR

V této diplomové práci bylo zjištěno následující:

- 1) Rostliny ve všech experimentech akumulovaly thorium v každé své části, přičemž koncentrace rostla ve směru, kořen > stonek > list.
- 2) Dlouhodobá kultivace v hydroponickém médiu s konstantní koncentrací Th vede k postupnému zvyšování obsahu thoria v celé rostlině.
- 3) K postupnému zvyšování obsahu thoria v rostlině dochází také u hydroponických médií obsahujících postupně se zvyšující koncentraci Th, tedy rychlost akumulace roste se zvyšující se koncentrací Th.
- 4) Nejvýznamnější vliv na akumulaci Th měla přítomnost fosfátů v médiu. Při jejich absenci výrazně vzrostla koncentrace ve všech částech rostliny.
- 5) Přítomnost vybraných organických kyselin v médiu zvyšuje akumulaci thoria v rostlině, přičemž tato akumulace, pozorovatelná zejména u kyseliny citronové a vinné, roste se zvyšující se koncentrací kyseliny v médiu.
- 6) Kombinace vysokých koncentrací thoria a přítomnost fosfátů v médiu vedou k úhynu rostlin, stejně jako u přidavku vysoké koncentrace vybraných organických kyselin.
- 7) Diaminy a polyaminy přítomné v hydroponickém médiu ovlivňují akumulaci thoria v celé rostlině. Ve všech případech použitých PA byla snížena akumulace zejména v kořenovém systému, méně ve stoncích a listech. Působení PA je ovlivněno typem aplikace. Postřik na plochy listů má za následek zvýšení akumulace, přidavek do média naopak příjem snižuje.
- 8) Vyšší koncentrace thoria a přídavky organických kyselin významně snižují pH hydroponického média na počátku kultivace. Během dalšího růstu, však dochází u všech médií k postupnému nárůstu pH směrem k hodnotám okolo pH=4.
- 9) Kultivar La Burley 21 v porovnání s ostatními kultivary a jejich GMO vykazuje v hydroponickém médiu v přítomnosti konstantní koncentrace Th, průměrnou akumulaci, avšak s velmi dobrým distribučním poměrem koncentrací kořen:stonek:list. Lepší akumulační vlastnosti vykazovaly kultivary Xanthi, Samsun či GMO kultivaru SR 1, Zm-p60-1-T5.

# SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- 
- <sup>1</sup>Kuznetsov V. I.; Savvin S. B.; Mikhailov V. A.: Progress in the analytical chemistry of uranium, thorium and plutonium. *Russ. Chem. Rev.* 29 (1960), 243.
- <sup>2</sup>Mička Z.; Lukeš, I.: *Anorganická chemie II: Systematická část*, Karolinum (1999).
- <sup>3</sup>Chemical elements<<http://www.chemicalelements.com>> [cit. 4. 6. 2011]
- <sup>4</sup>Willard H. H.; Gordon L.: Thorium in Monazite Sand. *Anal. Chem.* 20 (1948), 165–169.
- <sup>5</sup>Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Toxicological profile for Thorium. *U. S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Atlanta, GA* (1990).
- <sup>6</sup>Daly F. P.: Methanol synthesis over a Cu/ThO<sub>2</sub> catalyst. *Journal of Catalysis* 89 (1984), 131–137.
- <sup>7</sup>Wustrow T. P. U.; Behbehani A. A.; Wiebecke B.: Thorotrast–induced oro– and hypopharyngeal fibrosis with recurrent bleeding. *Journal of Cranio–Maxillo facial Surgery* 16 (1988), 315–319.
- <sup>8</sup>Baker W. JR; Bick R. L.; Schale D. P.; Swinyer B. P.: Thorotrast–Induced Angiosarcoma Complicated by Disseminated Intravascular Coagulation and Microangiopathic Hemolytic Anemia: Case Report and Review. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 1 (1995), 230–240.
- <sup>9</sup>International Atomic Energy Agency: Thorium based fuel options for the generation of electricity: Developments in the 1990s. IAEA–TECDOC–1155, květen (2000).
- <sup>10</sup>Kazimi M. S.: Thorium Fuel for Nuclear Energy. *American Scientist.* 91 (2003), 408.
- <sup>11</sup>Benedict M.; Pigford T. H.; Levi H. W.: Thorium. *Nuclear Chemical Engineering* 2 (1981), 283–317.
- <sup>12</sup>Patnaik, P.: *Handbook of Inorganic chemicals.* 927–933. McGraw–Hill 2003.
- <sup>13</sup>Mineralogy Database. Dostupné z URL: <<http://webmineral.com/>> [cit. 4. 6. 2011]
- <sup>14</sup>Pérez N.; Pey J.; Querol X.; Alastuey A.; López J. M.; Viana M.: Partitioning of major and trace components in PM10–PM2.5–PM1 at an urban site in Southern Europe. *Atmospheric Environment.* 42 (2008), 1677–1691.
- <sup>15</sup>Pulhani V. A.; Deafuti S.; Hedge A. G.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 274 (2007), 341.
- <sup>16</sup>LaFlamme B. D.; Murray J. W.: Solid/solution interaction: The effect of carbonate alkalinity on adsorbed thorium. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 51 (1987), 243–250.
- <sup>17</sup>Cotton A. F.; Wilkinson G.; F. R. S.: *Anorganická chemie*, Academia 1993.
- <sup>18</sup>Fisher N. S.; Teyssie J. L.; Krishnaswami S.; Baskaran M.: Accumulation of Th, Pb, U, and Ra in Marine Phytoplankton and its Geochemical Significance. *Limnology and Oceanography* 32 (1987), 131–142.

- 
- <sup>19</sup>Kazy S. K.; D'Souza S. F.; Sar P.: Uranium and thorium sequestration by a *Pseudomonas* sp.: Mechanism and chemical characterization. *Journal of Hazardous Materials* 163 (2009), 65–72.
- <sup>20</sup>Tsezos M.; Volesky B.: Biosorption of uranium and thorium. *Biotechnology and Bioengineering* 23 (1981), 583–604.
- <sup>21</sup>Onianwa P. C.: Monitoring atmospheric metal pollution: A review of the use of mosses as indicators. *Environmental Monitoring and Assessment*. 71 (2001), 13–50.
- <sup>22</sup>McKee P. M.; Snodgrass W. J.; Hart D. R.; Duthie H. C.; McAndrews J. H.; Keller W.: Sedimentation rates and sediment core profiles of uranium–238 and thorium–232 decay chain radionuclides in a lake affected by uranium mining and milling. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44 (1987), 390–398.
- <sup>23</sup>Sunta C. M.; Dang H. S.; Jaiswal D. D.: Thorium in man and environment uptake and clearance. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 115 (1987), 149–158.
- <sup>24</sup>Tomášek J.: Dokumentace o hodnocení vlivu na životní prostředí stavby – Sanace, rekultivace a vyřazování odkališť po uranové činnosti na lokalitě Mydlovary. *SOM s.r.o., EIA 2001* (2001), 260.
- <sup>25</sup>Dejgaard A.; Krogsgaard K.; Jacobsen M.: Venous-occlusive disease and peliosis of the liver after Thorotrast administration. *Virchows Archiv* 403 (1984), 87–94.
- <sup>26</sup>Summers D. E.; Chung E. B.: Thorotrast associated anemia and bone marrow hypoplasia. *J. Natl. Med. Assoc.* 78 (1986), 1161–1165.
- <sup>27</sup>Fischer P.; Golob E.; Kunze-Muehl E.: Chromosomal aberrations in thorium dioxide patients. *Ann. NY Acad. Sci.* 145 (1967), 759–766.
- <sup>28</sup>Guimaraes J. P.; Lamerton L. F.; Christensen W. R.: The late effects of Thorotrast administration. A review and an experimental study. *British Journal of Cancer* 9 (1955), 253–267.
- <sup>29</sup>Kumar A.; Ali M.; Mishra P.; Pandey B. N.; Sharma P.; Mishra K. P.: Thorium-induced neurobehavioural and neurochemical alterations in Swiss mice. *International Journal of Radiation Biology* 85 (2009), 338–347.
- <sup>30</sup>Farid I.; Conibear S. A.: Hepatic function in previously exposed thorium refinery workers as compared to normal controls from the health and nutrition survey. *Health Phys.* 44 (1983), 221–230.
- <sup>31</sup>Polednak A. P.; Stehney A. F.; Lucas H. F.: Mortality among male workers at a thorium-processing plant. *Health Phys.* 44 (1983), 239–251.
- <sup>32</sup>Meyer H. R.; Till J. E.; Bomar E. S.; Bond W. D.; Morse L. E.; Tennery V. J.; Yalcintas M. G.: Radiological impact of thorium mining and milling. *Nucl. Saf.* 20 (1979), 319–330.
- <sup>33</sup>Kandlbinder R.; Schupfner R.; Wolfbeis O. S.; Zinka B.: A study on thorium levels in human femur bones. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 285 (2010), 187–192.
- <sup>34</sup>Glover S. E.; Traub R. J.; Grimm C. A.; Filby R. H.: Distribution of natural thorium in the tissues of whole body. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 97 (2001), 153–160.

- 
- <sup>35</sup>Hála J.: *Radioaktivita, ionizující záření, jaderná energie*. Konvoj, 1. vydání 1998.
- <sup>36</sup>Acar Y. B.; Gale R. J.; Ugaz A.; Puppala S.; Leonard C.: Feasibility of removing uranium, thorium and radium from kaolinite by electrochemical soil processing Phase I Project Report. *Electrokinetics Inc., Baton Rouge*, 243 (1992).
- <sup>37</sup>Groudev S. N.; Georgiev P. S.; Spasova I. I.; Komnitsas K.: Bioremediation of a soil contaminated with radioactive elements. *Hydrometallurgy* 59 (2001), 311–318.
- <sup>38</sup>Shapfro A. P.; Probsteln R. F.: Removal of contaminants from saturated clay by electroosmosis. *Environ. Sci. Technol.* 27 (1993), 283–291.
- <sup>39</sup>Acar Y. B.; Gale R. J.; Alshwabkeh A. N.; Marks R. E.; Puppala W.; Brickad M.; Parkere R.: Electrokinetic remediation: Basics and technology status. *Journal of Hazardous Materials* 40 (1995), 117–137.
- <sup>40</sup>Horáková D.: Bioremediace. Masarykova univerzita, Brno (2006). Dostupné z: <[http://is.muni.cz/do/1499/el/estud/prif/ps06/3062932/bioremediace\\_FRVS\\_2006-2.pdf](http://is.muni.cz/do/1499/el/estud/prif/ps06/3062932/bioremediace_FRVS_2006-2.pdf)> [cit. 20. 7. 2011]
- <sup>41</sup>Francis A. J.: Microbial transformations of radioactive wastes and environmental restoration through bioremediation. *Journal of Alloys and Compounds* 213–214 (1994), 226–231.
- <sup>42</sup>Andres Y.; MacCordick H. J.; Hubert J. C.: Bacterial biosorption and retention of thorium and uranium by *Mycobacterium smegmatis*. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 166 (1992), 431–440.
- <sup>43</sup>Gadd G. M.; White C.: Removal of thorium from simulated acid process streams by fungal biomass. *Biotechnol. Bioeng.* 33 (1989), 592–597.
- <sup>44</sup>White Ch.; Gadd G. M.: Biosorption of radionuclides by fungal biomass. *J. Chem. Tech. Bio.* 49 (1990), 331–343.
- <sup>45</sup>Lovley D. R.: *Environmental microbe-metal interactions*. ASM Press, 282–283 (2000).
- <sup>46</sup>Macek T.; Macková M.; Kučerová P.; Chromá L.; Burkhard J.; Demnerová K.: Phytoremediation—Biological cleaning of a polluted environment. *Reviews on Environmental Health* 19 (2004), 63–82.
- <sup>47</sup>Freshwater Management Series No. 2: *An introductory guide to decision-makers*. Dostupné z URL: <<http://www.unep.or.jp/ietc/publications/freshwater/fms2/2.asp>> [cit. 15. 3. 2011]
- <sup>48</sup>Pilon-Smith E.: *Annu. Rev. Plant. Biol.* 56 (2005), 15.
- <sup>49</sup>Pivetz B. E.: Phytoremediation of contaminated soil and ground water at hazardous waste sites. *EPA/540/S-01/500* (2001).
- <sup>50</sup>Soudek P.; Petrová Š.; Benešová D.; Kotyza J.; Vaněk T.: Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chem. Listy* 102 (2008), 346–352.
- <sup>51</sup>U. S. Environmental Protection Agency: Introduction to phytoremediation. *EPA/600/R-99/107* (2000). Dostupné z URL: <<http://www.clu-in.org/download/remed/introphyto.pdf>> [cit. 27.3.2011]

- 
- <sup>52</sup>Anderson T. A.; Guthrie E. A.; Walton B. T.: Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27 (1993), 2630–2633.
- <sup>53</sup>Rugh C. L.: Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (1996), 3182–3187.
- <sup>54</sup>Alkorta I.; Hernández-Allica J.; Becerril J. M.; Amezaga I.; Albizu I.; Garbisu C.: Recent findings on the Phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as Zinc, Cadmium, Lead and Arsenic. *Rew. Environ. Sci. Bio/Tech.* 3 (2004), 71–90.
- <sup>55</sup>Lasat M. M.; Hazard J.: Phytoextraction of metals from contaminated sites – a critical review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *J. Hazard Substance Res.* 2 (2000), 1–25.
- <sup>56</sup>Voet D.; Voetová J. G.: *Biochemie*. Victoria Publishing. Praha 1995.
- <sup>57</sup>Kumar A.; Mishra P.; Ghosh S.; Sharma P.; Ali M.; Pandey B. N.; Mishra K. P.: Thorium – induced oxidative stress mediated toxicity in mice and its abrogation by diethylene triaminepentaacetate. *Int. J. Radiat. Biol.* 84 (2008), 337–349.
- <sup>58</sup>Shtangeeva I.; Ayrault S.; Jainc J.: Thorium uptake by wheat at different stages of plant growth. *J. Environ. Radioact.* 81 (2005), 283–293.
- <sup>59</sup>Shtangeeva I.; Ayrault S.: Phytoextraction of thorium from soil and water media. *Int. J. Environ. Pollut.* 154 (2003), 19–35.
- <sup>60</sup>Langmuir D.; Hermanb J. S.: The mobility of thorium in natural waters at low temperatures. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44 (1980), 1753-1766.
- <sup>61</sup>Carter P. J.; Nimmo H. G.; Fewson C. A.; Wilkins M. B.: Circadian rhythms in the activity of a plant protein kinase. *Embo J.* 10 (1991), 2063–2068.
- <sup>62</sup>McLung C. R.: Circadian rhythms in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52 (2001), 139–162.
- <sup>63</sup>Shtangeeva I.: Uptake of uranium and thorium by native and cultivated plants. *J. Environ. Radioact.* 101 (2010), 458–463.
- <sup>64</sup>Pandey S.; Ranade S.; Nagar P.; Kumar N.: Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J. Biosci.* 25 (2000), 291–299.
- <sup>65</sup>Kaur-Sawhney R.; Tiburcio A.; Altabella T.; Galston A: Polyamines in plants: An overview. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2 (2003), 1–12.
- <sup>66</sup>Alcazár R.; et al.: Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol. Lett.* 28 (2006), 1867–1876.
- <sup>67</sup>Gubiš J.; Vaňková R.; Červená V.; Dragúňová M.; Hudcovicová M.; Lichtnerová H.; Dokoupil T.; Jureková Z.: Transformed tobacco plants with increased tolerance to drought. *South African Journal of Botany* 73 (2007), 505 – 511.

- 
- <sup>68</sup>Wojas S.; Hennig J.; Plaza S.; Geisler M.; Siemianowski O.; Sklodowska A.; Ruszczynska A.; Bulska E.; Antosiewicz D. M.: Ectopic expression of Arabidopsis ABC transporter MRP7 modifies cadmium root-to-shoot transport and accumulation. *Environ. Pollut.* 157 (2009), 2781-2789.
- <sup>69</sup>Wojas S., Clemens S., Hennig J., Sklodowska A., Kopera E., Schat H., Bal W., Antosiewicz D. M.: Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: distinctive effects of AtPCS1 and CePCS genes on plant response to cadmium. *J. Exp. Botany* 59 (2008), 2205 -2219.
- <sup>70</sup>Wawrzynski A.; Kopera E.; Wawrzynska A.; Kominska J.; Bal W.; Sirko A.: Effects of simultaneous expression of heterologous genes involved in phytochelatin biosynthesis on thiol content and cadmium accumulation in tobacco plants. *J. Exp. Botany.* 57(2006), 2173 – 2182.
- <sup>71</sup>Teichmanová M.; Mašková P.; Vojvodová P.; Krekule J.; Francis D.; Lipavská H.: The fission yeast mitotic activator *cdc25* and sucrose induce early flowering synergistically in the day-neutral *Nicotiana tabacum* cv. Samsun. *New Phytologist* 176 (2007), 804 – 812.
- <sup>72</sup>Mkandawire M.; Vogel K.; Taubert B.; Dudel G.: Phosphate regulates Uranium (VI) toxicity to *Lemna gibba* L. G3. *Environmental Toxicology.* 22 (2007). Dostupné z URL: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.20228/pdf>> [Cit. 8.8.2011].