

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
KATEDRA APLIKOVANÉ EKOLOGIE

TOXICITA CIGARETOVÝCH NEDOPALKŮ
PRO VODNÍ PROSTŘEDÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: doc. Ing. Lenka Wimmerová, MSc., Ph.D.

Bakalant: Viktor Kocáb

2024

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Viktor Kocáb

Aplikovaná ekologie

Název práce

Toxicita cigaretových nedopalků pro vodní prostředí

Název anglicky

Toxicity of cigarette butts for water environment

Cíle práce

Cílem práce je zhodnocení akutní toxicity cigaretových nedopalků pro vodní prostředí. V rešeršní části práce bude pozornost zaměřena na druhy cigaretových filtrů, obalových papírů a tabáku, jejich zdroje a možná rizika v rámci litteringu životního prostředí se zřetelem na vodní prostředí. Praktická část práce bude zpracována pro vybrané cigaretové nedopalky v laboratorním měřítku.

Metodika

Bakalářská práce má experimentální charakter. Metodicky půjde o vytvoření aktuálního literárního přehledu z oblasti ekotoxicity cigaretových nedopalků s navazující praktickou částí ověřující jejich toxicitu pomocí vybraného toxikitu (Duckweed F, testovací organismus Spirodela polyhriza). Pro účely zkoušek budou vybrány 2–3 druhy cigaret, přičemž bude vybrána jak klasická cigareta, tak její moderní varianta za účelem srovnání případného vlivu spalování a zahřívání tabáku.

Doporučený rozsah práce

cca 50 stran textu a 10 stran příloh

Klíčová slova

cigareta, littering, filtr, papír, tabák, ekotoxicita, Spirodela polyrhiza, vyluh

Doporučené zdroje informací

- ANDĚL, Petr. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Liberec: Evernia, 2011. ISBN 978-80-903787-9-7.
- Dobaradaran, S. a kol., 2021: Environmental fate of cigarette butts and their toxicity in aquatic organisms: A comprehensive systematic review. *Environ Res.* 195:110881. doi: 10.1016/j.envres.2021.110881.
- Microbiotest, 2019: Duckweed toxkit F – Growth inhibition microbiotest with Spirodela polyrhiza. Standard operation procedure. 32 s. Dostupné z <https://www.microbiotests.com/wp-content/uploads/2019/07/duckweed-toxicity-test_duckweed-toxkit-f_standard-operating-procedure.pdf>.
- Montalvão, M.F. a kol., 2019: Cigarette butt leachate as a risk factor to the health of freshwater bivalve. *Chemosphere* 234:379–387. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.100.
- Slaughter, E. a kol., 2011: Toxicity of cigarette butts, and their chemical components, to marine and freshwater fish. *Tobacco Control* 20(Suppl 1):i25ei29. doi:10.1136/tc.2010.040170.
-

Předběžný termín obhajoby

2023/24 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Lenka Wimmerová, MSc, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra aplikované ekologie

Konzultant

Bc. Marie Martincová

Elektronicky schváleno dne 28. 2. 2023

prof. Ing. Jan Vymazal, CSc.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 1. 3. 2023

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 24. 03. 2024

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou/závěrečnou práci na téma: Toxicita cigaretových nedopalků pro vodné prostředí vypracoval/a samostatně a citoval/a jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použil/a a které jsem rovněž uvedl/a na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

Jsem si vědom/a, že na moji bakalářskou/závěrečnou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jsem si vědom/a, že odevzdáním bakalářské/závěrečné práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzí tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování:

Rád bych poděkoval doc. Ing. Lence Wimmerové, MSc., Ph.D. za odborné vedení, konzultace, velkou trpělivost a vstřícnost, kterou mi věnovala při psaní této práce. Dále bych chtěl poděkovat Bc. Nadija Čehajić za konzultaci a pomoc, kterou v nemalé míře také věnovala.

Abstrakt

Životní prostředí je ovlivňováno únikem mnoha antropogenních toxických látek. Toto znečištění negativně ovlivňuje faunu i floru na této planetě. Mezi tyto kontaminanty patří i cigaretové nedopalky. Tato bakalářská práce se zaměřila na problematiku cigaretových nedopalků jako odpadu, který se vyskytuje v životním prostředí. V teoretické části jde pak hlavně o vysvětlení ekotoxikologických testů, složení cigaretových nedopalků a obeznámení se s příslušnou legislativou.

Mezi jedním z nástrojů hodnocení vlivu odpadů a látek na životní prostředí patří i standardizované laboratorní ekotoxikologické testy. Díky těmto testům můžeme lépe pochopit účinky jednotlivých látek na dané prostředí. V praktické části zaměřené na zjištěné ekotoxicity cigaretových nedopalků byl použit test ekotoxicity, který je založen na inhibici růstu *Spirodela polyrhiza* (závitky mnohokořenné). Tento test nám může naznačit, jaký vliv mají cigaretové nedopalky a nedopalky z elektronických cigaret na vodní faunu a floru.

Měření inhibice růstu *S. polyrhiza* v roztoku výluhu cigaretových nedopalků a rostoucího média v různých poměrech ukázalo, že toxické látky přítomné v nedopalcích (ať už klasických cigaret nebo elektronických) mají vliv na růst zvoleného organismu. S rostoucí koncentrací cigaretového výluhu rostla míra inhibice růstu jak u elektronických nedopalků, tak u těch klasických. Výsledky měření koncentrace chlorofylu ukázaly, že kromě inhibice růstu reaguje testovaný organismus nejspíše i snížením tvorby chlorofylu. Toto zjištění poukazuje na případné limity tohoto ekotoxikologického testu.

Klíčová slova: cigareta, littering, filtr, papír, tabák, ekotoxicita, *Spirodela polyrhiza*, výluh

Abstract

The environment is affected by the release of many anthropogenic toxic substances. This pollution negatively affects the fauna and flora of the planet. These contaminants include cigarette butts. This bachelor thesis focused on the issue of cigarette butts as a waste that occurs in the environment. The theoretical part is mainly about explaining the ecotoxicological tests, the composition of cigarette butts and getting familiar with the relevant legislation.

One of the tools for assessing the environmental impact of wastes and substances is standardised laboratory ecotoxicological tests. These tests allow us to better understand the effects of individual substances on the environment. In the practical part focused on the detected ecotoxicity of cigarette butts, an ecotoxicity test based on the inhibition of the growth of *Spirodela polyrhiza* was used. This test can give us an indication of the effects of cigarette butts and e-cigarette butts on aquatic biota.

Measurements of the growth inhibition of *Spirodela polyrhiza* in a solution of cigarette butt leachate and growing medium in different ratios showed that toxic substances present in cigarette butts (conventional or electronic cigarette) influence the growth of the organism. The extent of growth inhibition increased with increasing concentration of cigarette leachate for both electronic and conventional cigarette butts. The results of chlorophyll concentration measurements showed that in addition to growth inhibition, the test organism probably responded by reducing chlorophyll production too. This finding highlights the potential limitations of this ecotoxicological test.

Keywords: cigarette, littering, filter, paper, tobacco, ecotoxicity, *Spirodela polyrhiza*, leachate

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	3
3	Literární rešerše	4
3.1	Ekotoxikologie	4
3.2	Související legislativa	5
3.3	Ekotoxikologické testy	6
3.3.1	Typy testů	6
3.3.2	Sledované parametry	7
3.4	Ekotoxikologické indexy	8
3.5	Standardizace testů	8
3.6	Faktory ovlivňující ekotoxicitu	9
3.7	Ekotoxikologický účinek na organismus	10
3.8	Testovací organismy	11
3.8.1	Výhody testu s organismy čeledi Araceae	13
3.9	Spirodela polyrhiza	14
3.10	Ekotoxikologické testy Spirodela polyrhiza	15
3.11	Cigaretové nedopalky	16
3.12	Struktura a složení klasické cigarety	19
3.12.1	Cigaretové filtry	20
3.12.2	Obalové papíry	20
3.12.3	Tabáková směs	21
3.13	Chemické složení cigaretových nedopalků	21
3.14	Ekotoxikologické testy cigaretových nedopalků	23
3.15	Struktura a složení elektronické cigarety	25
3.16	Ekotoxikologické testy elektronických nedopalků	26
4	Metodika	28
4.1	Metodika inhibice růstu Spirodela polyrhiza	28
4.1.1	Chemikálie	28
4.1.2	Laboratorní přístroje a pomůcky	28
4.1.3	Příprava Steinbergova činidla	28
4.1.4	Germinace turionů	29
4.1.5	Příprava roztoku z nedopalků	29
4.1.6	Vlastnosti roztoků	30
4.1.7	Laboratorní postup	30

4.1.8	Postup testování	31
4.1.9	Vyhodnocení testu	32
4.2	Metodika stanovení koncentrace chlorofylu–a	32
4.2.1	Chemikálie	32
4.2.2	Laboratorní přístroje a pomůcky.....	32
4.2.3	Laboratorní postup.....	33
4.2.4	Vyhodnocení testu	33
4.2.5	Podstata zkoušky.....	33
5	Výsledky.....	34
5.1	Výsledky inhibice růstu Spirodela polyrhiza	34
5.1.1	Testování klasických cigaretových nedopalků	34
5.1.2	Testování elektronických cigaretových nedopalků	36
5.2	Výsledky stanovení koncentrace chlorofylu–a.....	38
6	Diskuse.....	40
7	Závěr a přínos práce	42
8	Přehled literatury a použitých zdrojů	43

Seznam zkratek

ASTM	Americká společnost pro testování a materiály (American Society for Testing and Materials)
CEN	Evropský výbor pro normalizaci (European Committee for Standardization)
ČSN	Česká technická norma
DDT	aromatická organická sloučenina
DMP	dimethylftalát
EC50	koncentrace látky v prostředí, která způsobí určitý efekt, námi pozorovanou změnu, u 50 % organismů (effective concentration)
EN	Evropská norma
EPA	Úřad pro ochranu životního prostředí USA (U.S. Environmental Protection Agency)
IC50	koncentrace látky v prostředí, která způsobí inhibici růstu u 50 % organismů (inhibitory concentration)
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci (International Organization for Standardization)
IUCN	Mezinárodního svazu ochrany přírody (The International Union for Conservation of Nature)
LC	málo dotčený ohrožený druh (Least concern)
LC50	letální koncentrace látky v prostředí, která zahubí 50 % organismů (lethal concentration)
LD50	letální dávka, která zahubí 50 % organismů (lethal dose)
LOAEL	nejnižší dávka, při které již byl zaznamenán účinek na testovaný organismus (lowest observed adverse effect level)
MARA	vícedruhový ekotoxikologický test (microbial assay for risk assessment)
NOAEL	expozice, při které nejsou pozorovány žádné negativní vlivy na testovaný organismus (no observable adverse effect level)
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organization for Economic Cooperation)
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky

PVA	polyvinylalkohol
ROS	reaktivní kyslíkové částice
ÚNMZ	Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví

Pozn.: V seznamu nejsou uvedeny zkratky všeobecně známé nebo používané jen ojediněle s vysvětlením v textu.

1 Úvod

Člověk svým vlivem ovlivňuje přírodu již od doby paleolitu a jeho vliv narůstá exponenciálně až do dnešní moderní doby. Životní prostředí je ovlivňováno únikem mnoha toxických látek, které lidstvo ať už úmyslně nebo neúmyslně vypouští do svého okolí. Toto antropogenní znečištění negativně ovlivňuje faunu i floru na této planetě. Mezi tyto kontaminanty patří i odpady, které se každým rokem vyprodukují v nadměrném množství. V roce 2012 byla průměrná celosvětová produkce odpadu na člověka 1,2 kg odpadu za den (to činilo 438 kg odpadu za rok). Globální produkce pevného komunálního odpadu se pohybovala v roce 2015 mezi 7 až 9 miliard tun ročně (Wilson & Velis, 2015). V roce 2025 se předpokládá, že tato hodnota naroste na 1,4 kg odpadu na člověka za den. Při současném stoupajícím gradientu populace je celkové číslo hmotnosti odpadu odstrašující. Přičemž tato čísla odpovídají pouze komunálnímu odpadu a nezahrnuje odpady průmyslové (Chen et al., 2020).

Různé typy komunálního odpadu se mohou lišit svými dopady na životní prostředí. Plastové odpady způsobují stále větší mezinárodní obavy. Jejich rezistence v prostředí a snadná akumulace do potravního řetězce je činí pro lidskou populaci velmi nebezpečnými. (Wagner & Lambert, 2018).

Problémem je zároveň nedostatečné zabezpečení tohoto odpadu, pokud není zajištěn správný zpětný odběr, vyskytuje se tento odpad volně v přírodě. Většina nesprávně uloženého nebo pohozeného odpadu je deštěm smývána do řek a ty poté transportují a kumulují tento odpad v mořích a oceánech. Mezi tyto odpady řadíme i cigaretové nedopalky, které patří mezi nejčastější litteringové odpady. Littering definujeme jako odpad, který se vyskytuje v životním prostředí mimo vyhrazené nebo sběrné místo. Chápeme ho tedy jako pohozený odpad (Schultz et al., 2013).

Jedná se o úmyslně nebo neúmyslně pohozený, ponechaný nebo vlivem přírodních procesů (např. vítr, či voda) zanesený odpad v urbanizovaném (městském, venkovském) nebo přírodním prostředí a také v blízkosti dopravní infrastruktury, mimo místa určená pro sběr odpadů (nádoby, odpadkové koše apod.), u něhož původce nejeví aktivní snahu o sběr, a který má negativní vliv na životní prostředí. Součástí litteringu tudíž není odpad, který je výsledkem nelegálního chování (např. odpad typický pro černé skládky – elektroodpad, stavební a demoliční odpad, bioodpad apod.) (Najfus, 2022).

Cigaretové nedopalky obsahují velké množství toxických látek, které se vlivem molekul vody uvolňují do okolního prostředí. Při současném stavu, kdy je takto pohozeno odhadem každým rokem celosvětově 4,96 trilionu cigaretových nedopalků, se bavíme o velmi významném druhu znečištění (Slaughter et al., 2011), kdy především vodní organismy jsou těmito látkám vystaveny v největší koncentraci při deltách řek a u pobřeží oceánů nebo moří. To způsobuje bioakumulaci těchto toxických sloučenin napříč potravními řetězci (Schwarz et al., 2019).

Mezi jeden z nástrojů hodnocení vlivu odpadů a látek na životní prostředí patří ekotoxikologické testy. Standardizované laboratorní postupy jsou prvotními ukazateli toxicity těchto látek pro životní prostředí. Díky těmto testům můžeme lépe pochopit účinky jednotlivých látek na dané prostředí (Ford et al., 2021).

Test ekotoxicity, který je založen na inhibici růstu *Spirodela polyrhiza* (závitky mnohokořenné) nám může naznačit, jaký vliv mají cigaretové nedopalky a nedopalky z elektronických cigaret na vodní faunu a floru. Zatímco u klasických cigaretových nedopalků jsou již řadu let testovány jejich negativní vlivy na životní prostředí a jejich celková ekotoxicita je poměrně dobře prozkoumána, narůstající obliba elektronických cigaret pro nahřívání tabáku má pro nás zatím neznámé dopady na životní prostředí a je třeba se tomuto problému více věnovat (Solomou et al., 2023).

2 Cíle práce

Hlavním cílem bakalářské práce bylo experimentální ověření ekotoxicity klasických cigaretových nedopalků a nedopalků z elektronických cigaret na bázi zahřívání tabáku pomocí standardizovaného testu inhibice růstu *Spirodela polyrhiza* (závitky mnohokořenné). Vedlejším cílem práce bylo pak zpracování aktuální literární rešerše z oblasti toxicity klasických a zahříváných cigaretových nedopalků.

3 Literární rešerše

3.1 Ekotoxikologie

Ekotoxikologie je interdisciplinární vědní obor, který propojuje ekologii a toxikologii. Ekologie je věda studující vztahy mezi organismy a jejich prostředím a mezi populacemi samotnými (Friederichs, 1958). Toxikologie je naopak věda, která zkoumá vliv chemických látek a sloučenin na živé organismy. Dalším pojmem v tomto oboru je i toxicita. Tu chápeme jako fyzikálně-chemickou schopnost látky negativně ovlivňovat metabolismus daného jedince (Waddell, 1993). Ekotoxikologie současně využívá i ostatní vědní obory. Snaží se predikovat potencionální toxické účinky látek na přírodní ekosystémy a jednotlivé druhy organismů (Ford et al., 2021).

Tato věda se tedy zabývá hlavně pozorováním negativních morfologických změn, změn v chování, změně reprodukce, mortalitě, inhibici nebo růstu studovaného organismu. Zároveň může pohlížet nejen na jedince, ale na celé populace či společenstva, kde studuje odchylky ve vnitřních vztazích (Moriarty, 1988).

Prvním, kdo použil termín „*ecotoxicology*“, byl francouzský vědec René Truhaut roku 1969. V počátcích se zaměřovala toxikologie hlavně na dopady polutantů na člověka, posléze i na vlivy v životním prostředí. V historii byly v období průmyslové revoluce v 19. století pozorovány a prokázány první antropogenní vlivy na životní prostředí. V roce 1962 se ve velkém diskutovalo o používání pesticidů a jejich negativnímu účinku na přírodu, především použití DDT a dalších agrochemikálií. DDT je aromatická organická sloučenina, která patřila mezi první používané insekticidy. Po prokázání toxických účinků na životní prostředí byla tato látka postupně zakázána (Olsson & Reutergårdh, 1986). Velkou zásluhu má na tom i mimo jiné publikace „*Silent Spring*“ od americké bioložky Rachel Carsonové. Tato kniha informovala o nebezpečí použití syntetických pesticidů pro životní prostředí a šíření dezinformací ze strany nadnárodních společností (Lear, 1993). To vedlo v USA v roce 1970 k založení Úřadu pro ochranu životního prostředí (*U.S. Environmental Protection Agency, EPA*) (Hoffman et al., 2002).

Ekotoxikologie se zaměřuje na populace jednotlivých druhů a jejich společenstva. Monitorováním a testováním citlivostí jednotlivých druhů na rozdílné chemické látky se snaží zjistit dopady a rizika těchto sloučenin na jednotlivé organismy. Nemusí se však vždy jednat o chemické látky, mezi stresory může patřit i hluk, elektromagnetické záření, teplota nebo biologičtí činitelé. Tyto stresory můžeme definovat také jako polutanty (Pavlíková, 2008).

Ekotoxikologii dělíme na retrospektivní a prospektivní. První zmíněná se zaměřuje na dopady znečištění aktivit z minulosti tedy ty, co už proběhly. Prospektivní se snaží tomuto znečištění předcházet pomocí testování nových chemických sloučenin, které by mohly být vypuštěny do biosféry (Anděl, 2011).

3.2 *Související legislativa*

Podle definice evropské směrnice 2008/98/EC, o odpadech a o zrušení některých směrnic, v platném znění, známé také jako Rámcová směrnice o odpadech (*Waste Framework Directive*), odpadem je: „*jakákoli látka nebo objekt, který držitel zahodí, má v úmyslu zahodit nebo je povinen zahodit*“. Definice odpadu se liší v různých zemích EU, stejně jako definice komunálního odpadu, držitele a výrobce.

Existuje několik typů a kategorií odpadu, jako je komunální, průmyslový, zemědělský, nebezpečný apod. Podle evropské směrnice 2008/98/EC mohou být všechny tyto typy označeny za nebezpečné, pokud mají určité vlastnosti a na základě těchto vlastností mohou spadat do jedné nebo více z 15 kategorií, přičemž kategorie HP14 je ekotoxická. Evropská směrnice nespécifikuje postup pro hodnocení nebezpečného odpadu ani ekotoxikologické testy, které by měly být použity pro hodnocení. Proto se směrnice a legislativa každého členského státu EU mohou lišit.

Podle nařízení Komise (EU) č. 1357/2014 je ekotoxický odpad definován jako: „*odpad, který představuje nebo může představovat bezprostřední nebo pozdější rizika pro jednu nebo více složek životního prostředí*“ a je označen číslem HP14. V tomto nařízení o chemických látkách se v Příloze III stanovuje přesné provádění hodnocení ekotoxicity (a mnoha dalších nebezpečných vlastností) na základě definovaných kritérií v příloze VI. a limitních hodnot.

V České republice podle zákona č. 541/2020 Sb., o odpadech, v platném znění (dále jen zákon o odpadech) je původcem odpadu: „*každý, při jehož činnosti vzniká odpad nebo právnícká nebo podnikající fyzická osoba, která provádí úpravu odpadů nebo jiné činnosti, jejichž výsledkem je změna povahy nebo složení odpadu*“. Pokud fyzická osoba uloží odpad na určeném místě, obec se stává původcem a držitelem odpadu. V této chvíli má obec odpovědnost za nakládání s odpadem, jeho likvidaci a zpracování.

V návaznosti na nový zákon o odpadech zveřejnilo Ministerstvo životního prostředí vyhlášku č. 273/2021 Vyhláška o podrobnostech nakládání s odpady, která blíže specifikuje technické podrobnosti nakládání s jednotlivými odpady. Dále pak vydalo Vyhlášku č. 8/2021 Katalogu odpadů a posuzování vlastností odpadů. Tyto dokumenty nahradily předchozí legislativu o odpadech. Cílem této novely je zajistit vysokou úroveň ochrany životního prostředí a lidského zdraví a udržitelné využívání přírodních zdrojů správou odpadu v souladu s hierarchií odpadu.

Toto nařízení začleňuje relevantní předpisy EU a spravuje Katalog odpadů, klasifikaci odpadů podle katalogu, školení pro hodnocení nebezpečných vlastností odpadu, požadavky pro hodnocení nebezpečných vlastností odpadu, metody a postupy pro hodnocení nebezpečných vlastností odpadu, dodatečné limitní hodnoty a kritéria pro nebezpečné vlastnosti odpadu H9, H14 a H15, vzorkování odpadu, metodologii laboratorních testů, analýzy a ekotoxikologické a mikrobiální testy odpadu.

Ekotoxicita se podle přílohy č. 3 nařízení č. 8/2021 stanovuje pomocí 4 kontrolních testů, přičemž překročení limitů stačí pouze u jednoho z nich, aby byl odpad považován za ekotoxický dle platného předpisu. Mezi zkušební organismy patří bakterie *Aliivibrio fischeri*, hrotnatka velká (*Daphnia magna* Straus), řasa *Desmodesmus subspicatus* a locika salátová (*Lactuca sativa*). Testování toxicity se provádí ve vodních výluzích u kapalných vzorků. Zkoušky bakterie, perloočky a řasy se stanovují ve vodném výluhu pevného odpadu nebo s kapalným odpadem, zkouška se salátem se provádí s pevným nebo kapalným odpadem.

3.3 Ekotoxikologické testy

Základním nástrojem pro zjišťování ekotoxicity jsou ekotoxikologické testy. Test sleduje nejčastěji fyziologické reakce testovaných organismů na cizorodé sloučeniny. Můžeme však pozorovat i změny v biochemii organismu, anatomicko-morfologické nebo behaviorální dysbalance. Testovaný druh bývá často jednobuněčný a je dobře známa jeho fyziologie a morfologie. Nejčastěji studujeme vliv jednoho polutantu na jeden konkrétní druh. Test probíhá v laboratorním předem definovaném a uměle vytvořeném prostředí, aby docházelo k co nejmenšímu možnému zkreslení výsledků. Z reakce organismu na expozici daným toxikantem se poté zjišťuje riziko dané látky pro přírodní prostředí. Ekotoxikologické testy jsou standardizovány, aby byly výsledky průkazné a bylo možné srovnání účinků různých polutantů na organismus.

Testy jsou tedy koncipovány jako co nejjednodušší, průkazné a snadno realizovatelné. To zajišťuje reprodukovatelnost jejich výsledků. Nicméně je třeba mít na paměti, že laboratorní podmínky nemusí vždy odpovídat skutečnosti a nemusí být tedy relevantní vůči skutečnému účinku polutantu v ekosystému (Hoffman et al., 2002). Současně laboratorní testy nezahnují vnitrodruhové a mezidruhové interakce, které mohou mít zásadní vliv na konečný dopad polutantu. Pokud však standardizovaný test prokáže negativní účinky na testovaný organismus, můžeme předpokládat, že negativní dopady bude mít tato látka i na životní prostředí a je třeba dále ověřit v jaké míře ho bude ovlivňovat. Terénní výzkum, který pracuje se skutečnou expozicí a skutečnými odpověďmi daného ekosystému, zjistí pak výsledný dopad polutantu na životní prostředí. Díky laboratornímu testu již však může být zúžen na sledování určitého okruhu specifických aspektů (Anděl, 2011).

3.3.1 Typy testů

Testy můžeme rozlišovat na základě mnoha kritérií. Základním rozdělením je dělení testů na základě doby expozice na:

- **Testy akutní**, kdy se sleduje účinek cizorodé látky v rozmezí 24-96 hodin. Akutní testy udávají informace po jednorázovém podání toxikantu.
- **Testy subakutní** nebo také subchronické mají dobu expozice definovanou v intervalu přibližně 28-90 dní.

- **Testy chronické** se již používají na získávání informací o dlouhodobém působení toxikantu. Časový interval monitoringu je zde i v řádu let. Často se sleduje po celou dobu životního cyklu organismu (Anděl, 2011).

Dalším kritériem rozdělení může být typ prostředí, ve kterém je daný test prováděn.

- **Akvatické testy** probíhají v roztoku, či vodním výluhu testovaných polutantů.
- **Terestrické testy** probíhají v substrátu půdy ať už přírodním nebo uměle vytvořeném. Jedná se o testování látek v pevném skupenství (Chapman, 2002).

Rozdělení může být i na základě zapojených druhů v testové jednotce:

- **Jednodruhové testy** probíhají pouze na jednom určitém druhu organismu. Jsou jednodušší na zpracování, ale nemusí obsáhnout a identifikovat všechny polutanty v měřených vzorcích.
- **Vícedruhové testy** jsou složitější na zpracování a přípravu, ale výsledky měření jsou více relevantní. Testování je podroben soubor druhů, které ideálně simulují (nebo jsou mu co nejvíce blízka) přirozená společenstva daného ekosystému.

Místo, ve kterém určujeme ekotoxicitu, odlišujeme na:

- **Testy *in situ*** jsou prováděny přímo v přírodě, tedy testovaná matrice se nachází na svém místě původního výskytu a v tomto místě je i testována.
- **Testy *in vitro*** (ve zkumavce) jsou již prováděny v laboratoři při kontrolovaných podmínkách (Anděl, 2011).

3.3.2 Sledované parametry

Testované parametry se liší na základě typu testu, který používáme. Sledované parametry se mohou zároveň i lišit v závislosti na konkrétních cílech studie, druhu zkoumaného organismu a typu chemické látky, která je předmětem analýzy. Nejčastější parametry se zároveň mohou lišit u akutních testů oproti chronickým nebo subchronickým.

U akutní toxicity nejčastěji sledujeme:

- Živočichové – letalita, imobilizace,
- Autotrofové – růst, dělení, množství chlorofylu, klíčení,
- Destruenti – růst, metabolická aktivita.

U chronické a subchronické toxicity to jsou pak parametry:

- Živočichové – růst, malformace, reprodukce, biomarkery (hladina enzymů, proteinů, genová změna...), bioakumulace, změny chování,

- Autotrofové – klíčení, růst, tvorba gamet/semenn (Campbell et al., 2022)

3.4 Ekotoxikologické indexy

Toxikologické testy ukazují především účinky látek na organismus, kdy je toxikant přítomen v těle organismu. Oproti tomu ekotoxikologie zkoumá hlavně koncentrace toxikantů v prostředí, které ovlivňují jedince. Často se sleduje nejen smrt jedince, ale i inhibice růstu, imobilizace, změny chování a jiné účinky které jsou zmíněny výše. Nicméně všechny indexy kvantitativně charakterizují nebezpečné vlastnosti látek. Na základě výše zmíněné doby expozice rozlišujeme indexy pro testy akutní a subakutní/chronické (Horák et al., 2004).

Pro akutní ekotoxicitu definujeme:

- LD₅₀ (*lethal dose*) – letální dávka, která zahubí 50 % organismů,
- LC₅₀ (*lethal concentration*) – letální koncentrace látky v prostředí, která zahubí 50 % organismů,
- EC₅₀ (*effective concentration*) – koncentrace látky v prostředí, která způsobí určitý efekt, námi pozorovanou změnu, u 50 % organismů,
- IC₅₀ (*inhibitory concentration*) – koncentrace látky v prostředí, která způsobí inhibici růstu u 50 % organismů.

Pro chronické/subchronické testy máme indexy:

- NOAEL (*no observable adverse effect level*) – expozice, při které nejsou pozorovány žádné negativní vlivy na testovaný organismus,
- LOAEL (*lowest observed adverse effect level*) – nejnižší dávka, při které již byl zaznamenán účinek na testovaný organismus.

3.5 Standardizace testů

Jak již bylo uvedeno výše, pro porovnatelnost a prokazatelnost výsledků jednotlivých testů, je většina ekotoxikologických testů standardizována. To umožňuje srovnání jednotlivých měření mezi sebou a vytváření databáze o ekotoxických vlastnostech jednotlivých látek. Cílem standardizace je snížit mezilaboratorní variabilitu a zaručení jednotnosti a opakovatelnosti výsledků. Legislativně je pak často hodnocení ekotoxicity součástí bezpečnostních listů chemických látek a přípravků nebo ke klasifikaci odpadů do kategorie HP14 ekotoxický. Metodické postupy jednotlivých testů jsou proto přesně definovány na základě norem, které může vydat jedna z níže uvedených mezinárodních organizací:

- Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj neboli *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) je jednou z hlavních mezinárodních organizací, která se podílí na tvorbě metodických postupů pro testování ekotoxicity. Mezi její zájmy patří hlavně hospodářství a sociální politiky. Důležitá je však i její role v ochraně životního prostředí. Založena byla v roce 1961.

- Americká společnost pro testování a materiály, (*American Society for Testing and Materials*, ASTM) vznikla v roce 1902 a publikuje velké množství mezinárodních norem, které jsou aplikovány v mnoho odvětvích průmyslu.
- Mezinárodní organizace pro normalizaci, *International Organization for Standardization* (ISO) založena 1947 je světovou federací jednotlivých národních orgánů pro publikaci norem. Zabývá se tvorbou mezinárodních norem ISO pro průmysl.
- Evropský výbor pro normalizaci, *European Committee for Standardization* (CEN) byl založen v roce 1961. Jeho cílem je vytváření evropských norem (EN) a dalších technických dokumentů za účelem jednotného posuzování látek v rámci členských států Evropské unie. Vydané normy tímto úřadem jsou závazné a členské státy musí tyto normy přijmout do své ústavy. Česká republika patří jako plnoprávný člen od roku 1997.

Kromě těchto mezinárodních norem, pak každý stát může vydávat své vlastní na národní úrovni. Tyto normy mohou být navíc implementovány ostatními státy do vlastního právního řádu státu. V České republice máme České státní normy (ČSN). Vydávání, tvorbu a distribuci těchto norem má na starost Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví (ÚNMZ), která má na starost i přejímání případných ostatních norem například z Německa (DIS) nebo Velké Británie (BS).

3.6 Faktory ovlivňující ekotoxicitu

Ekotoxicita je ovlivňována mnoha různými faktory, které určují, jak chemické látky interagují s životním prostředím a organismy v něm. Některé látky jsou známy pro svou vysokou ekotoxicitu. Mezi tyto látky patří například těžké kovy, jako je rtuť a olovo, pesticidy, herbicidy a průmyslové chemikálie (Kong et al., 1995).

Následující faktory mají významný vliv na konečnou ekotoxicitu:

- **Chemické vlastnosti látek:** Chemické vlastnosti, jako je rozpustnost, míra stability, polarita a molekulární struktura mohou ovlivňovat, jak se látka chová v životním prostředí a jaký je její potenciál v rámci toxicity.
- **Dávka:** Ekotoxicita obvykle závisí na množství dodané chemické látky, které je organismus vystaveny.
- **Expoziční čas:** Doba, po kterou jsou organismy vystaveny toxikantu, může ovlivnit účinek dané látky. Krátkodobá expozice se mohou lišit od dlouhodobé (Horák et al., 2004).
- **Typy organismů:** Různé druhy organismů mají odlišnou citlivost na chemické látky. To znamená, že látka, která je pro jeden organismu toxická, nemusí být pro druhý. Zároveň i geneticky podmíněná citlivost příslušného jedince a fyziologický stav (velikost, stáří, pohlaví, paraziti, bakterie...) mohou ovlivnit výsledky měření.

- **Interakce s dalšími látkami:** Přítomnost jiných látek v životním prostředí může ovlivnit ekotoxicitu nového příchozího polutantu. Některé látky mohou zvyšovat nebo snižovat toxicitu již přítomných látek.
- **Teplota a pH:** Teplota a pH prostředí mohou ovlivňovat dostupnost a reaktivitu chemických sloučenin. Tyto dva parametry mohou ovlivňovat například rozpustnost.
- **Světlo, světelná perioda:** Množství dopadajícího světla ovlivňuje hlavně fotosyntetizující organismy a má velký význam jako jeden z definovaných parametrů u standardizovaných testů.
- **Fáze prostředí:** Chemické látky mohou být přítomny ve formě plynu, kapaliny nebo pevné látky, což může ovlivňovat jejich chování a schopnost proniknout do prostředí nebo jedince (Anděl, 2011).
- **Genetické rozdíly organismů:** Genetické rozdíly mezi jednotlivci stejného druhu mohou způsobují variabilitu v citlivosti na chemické látky.
- **Bio-akumulace:** Některé látky se mohou hromadit v tkáních organismů a postupovat v potravním řetězci, což může způsobit vyšší koncentrace a větší ekotoxicitu hlavně u vrcholových predátorů.
- **Způsob vstupu do organismů:** Způsob, jakým chemická látka vstupuje do organismu (inhalace, požití, absorpce kůží), může ovlivnit, jaké orgány a systémy jsou ovlivněny, případně zda vůbec dojde k odezvě organismu na cizorodou látku (Campbell et al., 2022).

Vzhledem k této řadě faktorů je hodnocení ekotoxicity složitým procesem, který zahrnuje laboratorní testy, polní studie a modelování, aby bylo možné určit, jaký vliv mají chemické látky na životní prostředí a organismy v něm. Cílem je minimalizovat negativní dopady a chránit biodiverzitu životního prostředí (Newman, 2020).

3.7 Ekotoxikologický účinek na organismus

Pokud je organismus vystaven toxikantu, může působit tato expozice různé odpovědi daného organismu, které se projevují různými fyziologickými reakcemi. Mezi hlavní mechanismy patří:

- **Oxidační stres:** Toxikanty mohou způsobovat produkci reaktivních kyslíkových částicemi ROS (Reactive oxygen species), které atakují lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Tvorbu ROS mohou mimo jiné katalyzovat těžké kovy jako olovo, rtuť nebo třeba kadmium. Výskyt ROS vede k oxidačnímu stresu, který je spojován s řadou onemocnění. Proti těmto volným radikálům působí antioxidanty.
- **Interakce s biologickými molekulami:** Toxikanty mohou interagovat (nejčastěji blokace fosfolipidových membrán) s biologickými molekulami jako jsou proteiny, enzymy nebo receptory, což může narušit normální funkce těchto molekul (Newman, 2020).

- **Genotoxicita:** Toxikanty mohou způsobovat poškození nukleových kyselin DNA a RNA, což může vést k často fatálním následkům (mutace, deformace, nádory). Nejčastěji dělíme toxikanty s účinkem na genom do třech kategorií.
 - Karcinogeny, což jsou látky iniciující nádorová onemocnění.
 - Mutageny, které vyvolávají chyby ve strukturách nukleových kyselin (mutace).
 - Teratogeny, ty způsobují vývojové vady jedince. Ovlivňují embryonální a reprodukční procesy, což může mít za následek vývojové anomálie a snížení plodnosti.
- **Narušení homeostáze:** toxikanty mohou ovlivňovat dynamickou rovnováhu vnitřního prostředí organismů. Vytvoření nerovnováhy vede ke špatné odpovědi buněk na podráždění a metabolickým poruchám
- **Interference s enzymovou aktivitou:** polutanty mohou blokovat nebo zvýšit enzymovou aktivitu, což může narušit biochemické procesy v těle.
- **Defekty buněčných membrán:** toxikanty mohou ovlivnit strukturu a permeabilitu buněčných membrán. To může způsobit únik obsahu buňky a narušení buněčné integrity (Campbell et al., 2022).
- **Imunosuprese:** chemické látky (ale i mikroorganismy) potlačí imunitní reakce těla, což může zvýšit náchylnost k infekcím a dalším onemocněním.
- **Akumulace a biomagnifikace:** Některé toxikanty se hromadí v tukových tkáních organismů a postupují v potravním řetězci. Jejich koncentrace je poté nejvyšší na v horních patrech ekologické potravní pyramidy (Brouwer et al., 1990); (Zachariassen et al., 1991).

3.8 Testovací organismy

Existuje velké množství organismů využívaných pro testování ekotoxicity. Správný výběr záleží na mnoha faktorech, kdy je zapotřebí zvážit výhody jednotlivých organismů a také posoudit jaký případný vliv bude mít toxikant na zkoumaný organismus a zda budou získaná data dostatečně prokazatelná. Zároveň musíme organismus volit tak, aby byla snadná manipulace s organismem, došlo k rychlému dosažení dostatečně velké populace a aby byla vysoká citlivost na chemikálie a změny prostředí. Organismus musí být dobře identifikován a jeho nika by měla mít co možná největší rozsah v daném ekosystému.

V řadě případů, je třeba také zohlednit legislativní požadavky. Např. dle prováděcích předpisů zákona o odpadech patří mezi metody stanovení vlastnosti HP 14 ekotoxický čtyři ekotoxikologické testy:

1. Řasa *Desmodesmus subspicatus* – ČSN EN ISO 8692:2012 zkouška inhibice růstu. Řasa je vystavena testovacímu roztoku po dobu 72 hodin za konzistentních podmínek. Vzorek řasy je umístěn v kultivačních baňkách a je během experimentu minimálně třikrát denně promícháván, což pomáhá udržet konzistenci a distribuci řasy v roztoku. Testy jsou prováděny při konstantní

teplotě 25 ± 2 °C a za stálého osvětlení o intenzitě 6000 lx, což simuluje přirozené světelné podmínky. Každých 24 hodin je provedeno měření hustoty buněk, a to pomocí počítačící komůrky, která umožňuje kvantifikovat počet buněk v daném vzorku. Současně jsou zaznamenávány změny v růstové rychlosti řasy v průběhu experimentu. Tyto změny jsou porovnávány s referenčním vzorkem. Při hodnocení testového experimentu je klíčovým ukazatelem procentuální stimulace nebo inhibice růstu řasy ve srovnání s kontrolním vzorkem.

2. Bakterie *Aliivibrio fischeri* – ČSN EN ISO 11348:2009 stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi luminiscenční bakterií. Existují tři normy, založené na stejném principu, lišící se pouze technologií uchování bakterií, kdy jsou buď čerstvé, sušené nebo lyofilizované. Princip testové metody spočívá v porovnání luminiscence, tedy světelného záření, emitovaného organismy, před a po expozici testované látky. Pro kvantifikaci světelné produkce se využívá speciální luminometr. Samotný experiment probíhá v zkumavkách obsahujících roztok testované látky, který je obohacen o halit (NaCl) za teploty udržované na 15 °C po dobu 15 nebo 30 minut. Hodnota, která slouží jako limitní kritérium pro určení ekotoxicity testované látky, je stanovena na 20 % inhibice luminiscence. To znamená, že pokud testovaná látka způsobí snížení světelné produkce organismů o více než 20 % ve srovnání s kontrolními podmínkami, považuje se tato látka za ekotoxickou.
3. Perloočka *Daphnia magna* – ČSN EN ISO 6341:1997 zkouška inhibice pohyblivosti. Testování probíhá na jedincích, kteří jsou ve věku 24 hodin, což je období kdy jejich senzitivita k polutantům dle měření nejvyšší. Perloočky jsou vystaveny po dobu 48 hodin roztoku toxikantu. Poté je měřena hodnota EC_{50} daného vzorku.
4. Salát *Lactuca sativa* – ČSN EN ISO 11269-1:2013 stanovení účinků znečišťujících látek na půdní flóru. Test je prováděn na samotném odpadním materiálu ne na výluhu. Testovaný vzorek tvoří 10 % hmotnosti testovací matrice, a zbývajících 90 % je doplněno sušinou umělé půdy, což vytváří reprezentativní testovací prostředí. Pro testování se používají nepoškozená a nijak chemicky ošetřená semena salátu. Před samotným testováním jsou semena nejprve podrobována procesu předklíčení, kdy jsou po dobu 24-48 hodin umístěna na vlhký filtrační papír. Během tohoto předklíčícího procesu nejsou žádné vnější podmínky, jako je teplota, vlhkost, osvětlení nebo jiné faktory regulovány, což napodobuje přirozené podmínky. Samotný test je prováděn v testovacích nádobách při nulovém osvětlení a kontrolované teplotě 24 °C. Semena jsou pečlivě a rovnoměrně rozmístěna na substrátu s minimální výškou 3 cm. Test probíhá 120 hodin. Poté jsou semena opatrně vyjmuta a provádí se zhodnocení průměrné délky kořínků. Tato délka je

následně porovnávána s kontrolním vzorkem. To umožňuje posoudit, zda testovaný materiál měl stimulační nebo inhibiční vliv na růst kořínků salátu.

Ekotoxikologické testy stanovení toxických účinků látek na vodní prostředí, které jsou založeny na principu inhibice růstu okřehku *Lemna minor* jsou standardizovány podle normy ČSN EN ISO 20079:2007 (757745). Zkouška je založena měření odezvy organismu inhibicí růstu na látky, které jsou rozpuštěny ve vodě. Zahrnuje mimo jiné i postupy ředění a určování koncentrace toxikantu ve vzniklém vodním roztoku. Na základě měřených parametrů jako je počet listenů, plocha listenů nebo hmotnost biomasy, je určena míra inhibice oproti kontrolnímu měření. Délka trvání testu je 168 hodin. Postup provádění testu založeného na inhibici růstu *Spirodely polyrhiza* je detailně popsán v normě ČSN EN ISO 20227:2018 (757747).

Studie s těmito organismy se zaměřují na zkoumání koncentrace na jednotlivé kovové prvky jako kadmium, rtuť, nikl, arsen a chrom (Baudo et al., 2015). V těchto studiích se ukazuje *Lemna sp.* jako velice dobrý indikátor zvýšeného množství těchto kovů.

Kde legislativa povoluje můžeme použít i alternativní testy. Narůstající oblibou se těší takzvané Toxkity. Jedná se o ekonomicky efektivní a uživatelsky přívětivé řešení pro komerční využití. Jednoznačnou výhodou je, že po zakoupení Toxkitu má uživatel k dispozici veškeré vybavení nezbytné k provedení testu. Sada obsahuje také testovací organismy v jejich dormantních stádiích. Na trhu je nyní k dispozici široký výběr sad testů zahrnujících testovací organismy různých trofických úrovní a vhodných pro různé typy testovaných matric.

Mezi ně patří právě již zmíněný test založený na inhibici růstu *Spirodela polyrhiza*, podobně jako příbuzné druhy *Lemna minor* a *Lemna gibba*, prokazuje schopnost rychlého nárůstu biomasy a vysokou citlivost vůči toxickým látkám. Díky svým vlastnostem, jako je snadná kultivace, jednoduchá morfologie a malá velikost, je *S.a polyrhiza* ideálním zástupcem vyšších rostlin pro provádění miniaturizovaných testů na ekotoxicitu v laboratorních podmínkách. Samotný test probíhá na destičce s 48 jamkami, kde jsou provedeny pětkrát osm opakování pro různé koncentrace testované látky. Doba expozice roztoku toxikantu činí 72 hodin. Po uplynutí této doby je provedena obrazová analýza, která umožňuje zhodnotit míru inhibice růstu rostlin. Na základě těchto dat je vypočtena hodnota EC₅₀.

3.8.1 Výhody testu s organismy čeledi Araceae

Zásady ekotoxikologie nám říkají, že neexistuje jeden ideální testovaný organismus, který se nejlépe hodí na stanovení toxicity všech možných chemických látek. Existuje velká řada studií, které poukazují na fakt, že některé biologické modely musí být upřednostňovány před jinými. Oproti ostatním ekotoxikologickým testům mají testy s rostlinami „okřehkovitého“ typu následující výhody, které hrají zásadní roli při rozhodování výběru ekotoxikologického testu:

- malá velikost testovaných organismů,

- rapidní růst a kontrola kultivace,
- vegetativní rozmnožování geneticky homogenních populací, které eliminují efekt genetické variability,
- možnost kultivace jak ve vodném roztoku, tak v agaru,
- velká plocha ku objemu těla,
- schopnost akumulace kovových prvků,
- citlivost na povrchově aktivní látky a hydrofobní sloučeniny (Baudo et al., 2015).

Citlivost testu *Spirodely polyrhiza* je stejná jako o testu *Lemna minor* (Appenroth et al., 2010). I při nižších koncentracích těžkých kovů dochází k validním výsledkům pro zjištění přítomnosti těchto prvků. Měřeními při různých koncentracích kadmia v roztoku projevily test podobnou citlivostí obou testů (Oláh et al., 2016).

Test *Spirodely polyrhiza* má několik výhod oproti testu na *Lemna minor*:

- skladované turiony mají životnost několik měsíců s velmi vysokou úspěšností klíčení,
- k testování není potřeba udržovat živé zásoby testovaného druhu,
- možnost uchovávat klidová stadia turiony oproti živým kulturám usnadňuje nároky na skladování,
- ekotoxikologický test vyžaduje malé nároky na laboratorní vybavení a inkubační prostor,
- měření plochy lístků je velice přesné a časově méně náročné,
- délka testu je pouhých 72 hodin (Baudo et al., 2015).

3.9 *Spirodela polyrhiza*

Jedná se o jednoděložnou, jednoletou a jednodomou rostlinu z čeledi *Araceae* (Áronovité). Starší taxonomické rozdělení je řadí mezi *Lemnaceae* (Okřehkovité). Oproti většině okřehkovým rostlinám připadá na jednu stélku více kořenů. Jedná se o natantní (plovoucí) nekořenící a hydrofiletické (obnovující pupeny pod vodní hladinou) rostliny (Appenroth et al., 1996).



Obrázek 1 *Spirodela polyrhiza* (Navrátilová, 2005)

Rostliny mají orgány klonálního růstu, tedy mohou fragmentovat své tělo a vytvářet jednotlivé jednotky (ramety) jak můžeme vidět na *Obrázku 1*. Tvoří velmi rozsáhlé kolonie na hladinách vod, považují se obecně za r strategů. V České republice se jedná o původní a hojně se vyskytující druh klasifikován podle Mezinárodního svazu ochrany přírody (*The International Union for Conservation of Nature, IUCN*) jako málo dotčený LC (Least concern). Vyskytuje se převážně na eutrofních a mezotrofních stojatých vodách, kdy bývá často dominantní makrofytickou vegetací.

Vegetativní rozmnožování převládá nad pohlavním, kdy vytvoření květů je velmi výjimečné. Doba generativního rozmnožování je obvykle kolem května až června, kdy je květ bezobalný. Rozmnožování probíhá fakultativní autogamii, tedy přenos pilového zrna je hlavně samosprašně občas i cizosprašně zprostředkovan větrm (anemofilie), vodou (hydrofilie) nebo hmyzem (entomofilie). Plodem pak je suchý plod měchýřek. Nepříznivé podmínky může přečkat v podobě stonkové metamorfózy turionu. Turion je tedy dormantní stádium této rostliny, při které jsou pozastaveny případně omezeny fyziologické procesy (Kaplan & Štěpánková, 2010).

3.10 Ekotoxikologické testy *Spirodela polyrhiza*

Bylo provedeno velké množství měření, které poukazovaly na citlivost tohoto testu na různé izolované typy sloučenin. Díky těmto předešlým testům je zřejmé, že *Spirodela polyrhiza* reaguje inhibicí růstu na různé druhy sloučenin a je validním prostředek pro zjišťování negativních vlivů na životní prostředí.

Při koncentraci 600 mg/l dimethylftalátu (DMP) byly pozorovány jednoznačné změny ve velikosti daných organismů a byla zjištěna inhibice růstu *S. polyrhiza*. Zároveň bylo pozorováno snížení pigmentů a fotosyntetického barviva. Kromě ekotoxikologického testu, byly testované rostliny podrobeny genetickým testům. Při nich bylo zjištěno poškození genomu, které bylo vyvoláno právě molekulami DMP. Tato sloučenina bývá často součástí elektronických cigaret a byl prokázán její negativní vliv na životní prostředí (Pietrini et al., 2022).

V další studii byla měřena koncentrace železa a mědi ve vodním roztoku. Zároveň se prokázala biokumulace těchto prvků ve *S. polyrhiza* a nadměrné množství způsobovalo v extrémních případech nekrózu jedinců. Byla zároveň prokázána snížená funkčnost příjmu fosfátů a dusíků, která mimo jiné narušuje tvorbu chlorofylu (Xing et al., 2008).

Nikl jako jeden z dalších těžkých kovů má také výrazné účinky na inhibici růstu *S. polyrhiza*. Realizovaný ekotoxikologický test byl prokazatelný a jeho výsledky naznačují škodlivé účinky při vyšších koncentracích tohoto kovu a jeho akumulaci v biomase (Appenroth et al., 2010).

Při laboratorním testování vlivu mikroplastů nebyly prokázány změny v růstu ani změny koncentrací chlorofylu. Tedy celkový toxický účinek na rostliny nebyl prokázán. Nicméně v genomu jedinců, kteří byli vystaveni mikročasticím plastových materiálů,

bylo zjištěno poškození DNA. Studie dále pracovala s bioakumulací těchto částí v potravním řetězci, kdy byla zjištěna vyšší koncentrace mikroplastů u primárních konzumentů. Tito jedinci byli krmeni výhradně primárními producenty (*S. polyrhiza*), kteří byli vystaveni přítomnosti mikroplastů (Iannilli et al., 2023).

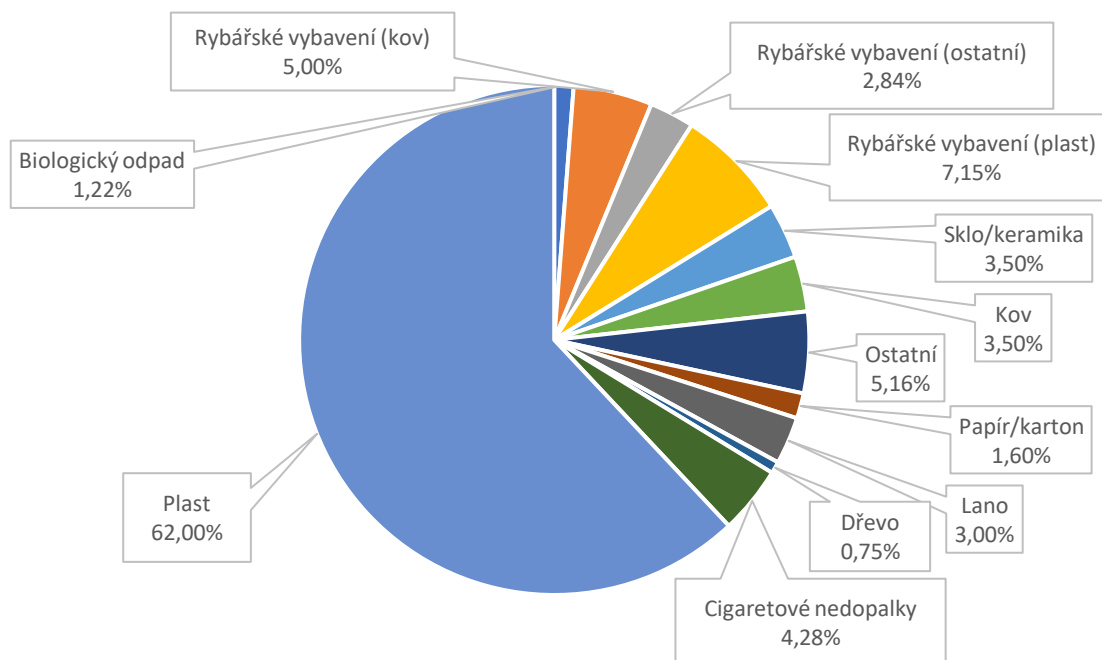
Všechny látky výše zmíněné jsou součástí cigaretových nedopalků a sumárně lze konstatovat, že byl prokázán jejich negativní vliv na životní prostředí. V těchto testech, kdy se zjišťovala reakce a citlivost odezvy *S. polyrhiza*, se prokázal tento organismus jako dobrým indikátorem a validním testovacím organismem na zjišťování i minimálních koncentrací těchto látek.

3.11 Cigaretové nedopalky

Cigaretové nedopalky tvoří velkou část odpadu, který označujeme anglickým slovem „litter“ (Asensio-Montesinos et al., 2019). Mluvíme o odpadu, který se volně nachází v naší krajině a není nijak zabezpečen. Navíc se jedná o biologicky téměř nerozložitelný druh odpadu obsahující velké množství toxických látek a mikroplastů (Novotny et al., 2009).

Každým rokem se spotřebuje přibližně 5,6 trilionu cigaret celosvětově (Slaughter et al., 2011). To vytváří enormní množství odpadu, který zpravidla skončí ve formě nedopalku pohozený životním prostředím. Odhadem se hovoří téměř o 4,96 trilionu cigaretových nedopalků ročně. Mluvíme tak přibližně o 680 000 tunách acetát celulózy, která je obsažena v cigaretových nedopalcích, které jsou volně pohozeny (Judith et al., 2012). Tento odpad může kontaminovat ekosystém oceánů a moří a může mít negativní dopad na faunu a floru slaných i sladkých vod. Kumulací tohoto odpadu dochází ke zvýšení rizika a signifikantnímu navýšení pravděpodobnosti překročení limitních hodnot některých látek a prvků (Curtis et al., 2016)

Nedopalky tvoří přibližně 10 % z celkového odhozeného odpadu. Mezi lety 1984 až 2011 bylo nasbíráno 52 milionů nedopalků na pobřeží různých států (Dobaradaran et al., 2021). V průběhu mezinárodního dne čištění oceánů (*International Coastal Cleanup Day*) byly uváděny informace, že v roce 2007 dobrovolníci nasbírali 1,7 milionu nedopalků při pobřeží Floridy (Judith et al., 2012). To tvořilo téměř 34 % z celkového počtu nasbíraného odpadu. Cigaretové nedopalky jsou na první příčce nasbíraného odpadu, co se týká množství. Hned za nimi jsou potravinové obaly (Novotny & Slaughter, 2014). Hmotnostní zastoupení cigaretových nedopalků v mořských ekosystémech tvoří přibližně 4,28 % odpadů (Hahladakis, 2020).



Graf 1 Globální rozložení litteru v mořských ekosystémech, vlastní zpracování dat dle (Hahladakis, 2020)

V České republice probíhalo v roce 2020 a 2021 ve spolupráci společnosti EKO-KOM a Univerzity Jana Evangelisty Purkyně (UJEP) studie zaměřená na litteringový odpad. Měření probíhalo na 164 lokalitách po celém území ČR. Cigaretový odpad (nedopalky a jiné odpady tabákových výrobků) tvořil 6,1 % z celkové hmotnostní skladby. Co se týče celkového počtu nasbíraného odpadu tvořil naopak cigaretový odpad 71,6 %. Tedy byl zdaleka nejčastějším odpadem, co se týče počtu kusů (Slavík et al., 2022).

V některých rozvinutých zemích zavedly přísná nařízení o kontrole tabáku a výrobků obsahující tabák, nicméně významné snížení spotřeby se v celosvětovém měřítku zatím neprojevalo (Kurmus & Mohajerani, 2020).

Samotné cigaretové nedopalky obsahují velké množství toxických látek, jejichž množství je malé s ohledem na nízkou hmotnost jednoho nedopalku, která činí okolo 30 g. Nicméně díky jejich velkému množství v řádu trilionů ročně na celé planetě v součtu znamenají nemalé množství kontaminace, které je potřeba brát v úvahu. Otázka rizikovosti tohoto odpadu a jeho dopadu na životní prostředí by proto měla být více studována, neboť většina nedopalků končí pohozená v přírodě a pohozené nedopalky představují potenciálně velké riziko.

Dosavadní pokusy o recyklovatelné cigaretové filtry a nedopalky jako takové, jsou zatím stále málo účinné a nedosahují uspokojivých hodnot, které by mohly napomoci řešení tohoto problému. Jedná se zejména o chybějící technologii a materiály, které by dokázaly nahradit dosavadní výrobu filtrů a učinili tyto produkty nezávadné a potenciálně netoxické pro životní prostředí (Moroz et al., 2021).

Jak je blíže specifikováno v kapitole níže, již existují biologicky rozložitelné filtry. Ty zatím ale tvoří minoritní procento z celkové produkce a zároveň chybí i větší množství studií, které by jejich menší dopad na životní prostředí potvrdily. Navíc pokud by se použitý filtr dostal do volné přírody, nezabránilo by to kontaminaci ekosystémů látkami, které jsou filtrem zachytávány při kouření a kterých je v cigaretovém nedopalku velké množství (Novotny et al., 2009).

Druhým problémem je nedostatečný zpětný odběr a třídění těchto typů odpadů. V současné době je většina nedopalků odhozena do směsného odpadu a nejsou nijak recyklovány. Časté jsou i případy, kdy takto vyhozený nedopalek způsobí vznik požáru v daném odběrném kontejneru. Existovalo velké množství pokusů odpadových společností (především v Austrálii), které se snažily vytvořit systém zpětného odběru nedopalků a jejich následného skládkování či spalování. Nicméně manipulace s tímto typem odpadu je velice nákladná a technologicky náročná. Navíc při spalování nebo skladování může docházet k riziku vyšší expozice nebezpečnými výpary, které mohou vážně narušit životní prostředí nebo lidské zdraví (Aldieri et al., 2019).

Samozřejmě existuje mnoho programů, které se zaměřují na třídění a zpětný odběr. Za zmínku stojí projekt americké firmy TerraCycle s názvem „*Cigarette Waste Free Recycling Program*“, která distribuuje a zpětně odebírá kontejnery určené pouze pro cigaretové nedopalky. Tyto kontejnery jsou pak sváženy na třídící linky a nedopalky jsou recyklovány a dále použity (TerraCycle, 2022).

Jedná se tedy o surovinu, která není v dostatečné míře k dispozici pro další využití. Není tedy prozatím možné zužitkovat tento materiál jako zdrojovou surovinu pro stavební nebo jiný průmysl. Zároveň není prozatím proveditelné tuto surovinu ve větším množství získávat. Byly studovány a navrhovány různé postupy recyklace včetně míchaní do pálených cihel, míchaní do asfaltového betonu, výroba celulózové buničiny, využití jako inhibitor koroze a mnoho dalších. Žádný z těchto postupů není zatím velkoprodukčně využíván (Marinello et al., 2020).

Technologií vytvářející kompozitní materiály z cigaretových nedopalků je velké množství. Celkově přidání cigaretových filtrů zlepšilo tížené vlastnosti materiálu. Většina těchto studií poukazuje pouze na chemické a fyzikální vlastnosti vzniklého kompozitu a nezaměřuje se již na možné ekotoxikologické dopady využití takového materiálu ve velkém měřítku. Majoritní složkou cigaretového nedopalku tvoří acetát celulózová vlákna, spolu s nimi i velké množství toxických látek a těžkých kovů, které mohou kontaminovat životní prostředí a během druhotného zpracování mohou být stále přítomny ve vzniklém materiálu (Marinello et al., 2020).

Lepším řešením se zdá separace jednotlivých látek z cigaretového nedopalku a následné zpracování v dalším procesu. Jednotlivé separované části jsou zbaveny toxických látek a vzniklý materiál by měl být již bezpečný z hlediska složení. Hlavním používaným materiálem je právě acetát celulóza. Toto řešení je opět zatím

energeticky ne příliš výhodné a postrádá velkokapacitní využití. V malých měřítkách již existují firmy, které takto vzniklé materiály znovu využívají. Jedná se především o plastové produkty jako nádoby, odpadní kontejnery a další (d'Henri Teixeira et al., 2017). Výše zmíněná společnost TerraCycle rozkládá cigaretové nedopalky na jednotlivé materiály, které jsou posléze prodávány firmám jako základní materiál na další využití (TerraCycle, 2022).

Také sociální návyky, které ke kouření cigaret neodmyslitelně patří, nepomáhají k rozvoji v této oblasti. Uživatelé tabákových výrobků si často nejsou vědomi svého potenciálně nebezpečného chování pro životní prostředí a nejsou ochotní své chování změnit. Bylo zjištěno že kolem 75 % kuřáků nemá morální problém své nedopalky odhodit na zem a tím vytvořit litter, který může kontaminovat okolí (Aldieri et al., 2019). Americký průzkum provedený mezi 1 000 kuřáky zjistil, že 74,1 % dotazovaných minimálně jednou odhodilo cigaretový nedopalek na zem nebo ven z auta (Novotny & Slaughter, 2014).

Ve městech kolem odpadních košů, na ulici, v parku a na mnoha dalších místech se můžeme potýkat s výskytem nedopalků ležících na zemi. Tento jev není ojedinělý a je rozšířen po celém světě. V České republice nejčastějším místem výskytu nedopalků jsou právě města, zejména pak rušné ulice, parkoviště nebo zastávky veřejné hromadné dopravy. Podle průzkumu se ve městech se jednalo přibližně o 30 % litteringového odpadu. Pokud na tyto data pohlédneme z pohledu množství kusů, hovoříme až o téměř 80 % (Slavík et al., 2022).

Nedopalky ležící na ulici jsou vlivem dešťové vody a přízemní vlhkosti vystavovány vlhku, které napomáhá k uvolňování toxických látek do prostředí. Srážková voda navíc funguje jako transportní médium, které odnáší nedopalky dále do povrchových toků. Nedopalky pak většinou skončí na plážích, v řekách a oceánech. Mořská a sladkovodní fauna pak může zaměnit nedopalky za potravu a tím kumulovat rizikové prvky a sloučeniny ve své biomase (Schwarz et al., 2019). Nedopalky byly objeveny např. v žaludcích mořských želv, ptáků a ryb. Jejich výskyt v trávicí soustavě těchto živočichů způsobil zažívací problémy, které vedly ke smrti daného jedince (Dobaradaran et al., 2021). Zároveň bio-metabolické procesy vodních živočichů jsou závislé na pH vodního prostředí, kterou přítomnost nedopalků mění (Ullmann et al., 2000).

3.12 Struktura a složení klasické cigarety

Klasická cigareta se skládá z cigaretového filtru, cigaretového papírku, tabákové směsi a náustkového papíru. Všechny tyto součásti podléhají přísným technologickým normám a jejich výroba splňuje specifické vlastnosti pro konkrétní využití. Zatímco struktura tradiční cigarety bývá zachována napříč výrobci, chemické složení a poměrové zastoupené látek bývá u každého výrobce mírně odlišná a podléhá firemnímu tajemství. Chemické a toxické vlastnosti jednotlivých cigaretových

nedopalků různých značek mohou mít odlišnou míru účinku, nicméně vždy byla prokázána nějaká míra ekotoxicity (Micevska et al., 2006).

3.12.1 Cigaretové filtry

Cigaretové filtry ochlazují kouř a zabraňují vdechnutí nežádoucích částic kouře do dýchacích cest a absorbují vlhkost. Na trhu je velké množství typů filtrů. Za zmínku stojí biologicky rozložitelné druhy filtrů od různých firem, které nejsou vyrobeny z umělé celulózy, ale ze směsi přírodních vláken. Rozklad těchto filtrů v půdním substrátu by se měl pohybovat v řádech dní a ve vodě v řádech hodin. Jako pojivo se používá lepidlo na bázi škrobu. Jeden z druhů filtrů se skládá z vláken na bázi potravinářského škrobu. Tento materiál je teoreticky i levnější než dosavadně používaný acetát celulózy a jeho rozklad se pohybuje kolem 2 měsíců. Firem zabývajících se těmito druhy filtrů je na trhu několik a nabízejí teoreticky udržitelné alternativy ke klasickému cigaretovému filtru (Novotny et al., 2009).

Nicméně pokud by se takovýto použitý filtr dostal do volné přírody, nezabránilo by to kontaminaci ekosystémů látkami, které jsou filtrem zachytávány při kouření a kterých je v cigaretovém nedopalku velké množství. Navíc spolu se zbytkem tabákové směsi mohou vlivem vody být tyto látky vylouhovány a jednoduše se dostat do okolí.

3.12.2 Obalové papíry

Tyto materiály musí splňovat velké množství technických nároků a splňovat specifické požadavky pro tuto oblast použití. Mezi hlavní vlastnosti patří dobrá pevnost v tahu, vyšší tržná pevnost, bílá barva popela, propustnost, pórovitost a možnost řízení rychlosti hoření. Další sledovaný parametr je schopnost neovlivnit chuť tabákové směsi při požití cigarety.

Hlavní vstupní surovinou pro výrobu cigaretových papírků je buď vláknina z jednoletých rostlin jako je konopí, len, sisal nebo rýžová sláma. Nebo další možností je použití chemické buničiny případně směsi buničiny a rostlinných vláken v různém poměru.

Obalové papíry samozřejmě obsahují velké množství chemických přísad a jejich celkový obsah se může pohybovat až kolem 30 %. Mezi hlavní plnidla patří uhličitán vápenatý (CaCO_3), který ovlivňuje propustnost a barvu. Pro zlepšení barvy popela se přidává uhličitán hořečnatý (MgCO_3) nebo oxid titaničitý (TiO_2). Citronan sodný ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), citronan draselný ($\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) a Vinan draselno-sodný ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) jsou sloučeniny, které se používají jako regulátory hoření. Vyšší koncentrace těchto látek má za následek vyšší rychlost hoření. Jako pomocné pojivo se přidává oxidovaný škrob a karboxy-metyl-celulóza (KMC). Lepidlo, které spojuje vytvořený válec, je ve většině případů vodný roztok organické sloučeniny polyvinylalkoholu (PVA), který má velice nízké hodnoty toxicity a je zdravotně nezávadný (Ullmann et al., 2000).

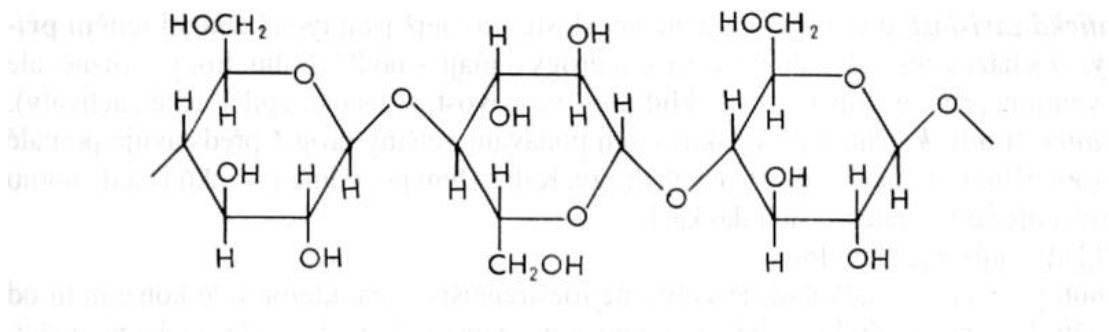
3.12.3 Tabáková směs

Tabákovou směs tvoří rostliny rodu *Nicotiana* a přidaná aditiva. Mezi hlavní komerčně používané druhy patří *Nicotiana rustica* (tabák selský) a *Nicotiana tabacum* (tabák virginský). Kompozice tabákové směsi se liší podle preferencí jednotlivých zemí a výrobců. Hlavní částí využívané rostliny na výrobu tabáku jsou listy, které podléhají několika fázím výrobního procesu jako je sklizeň, sušení, vlhčení, stahování, třídění a míchání. Během výroby jsou přidávány různá aditiva, jenž mají zlepšit vlastnosti výsledného produktu nebo zefektivnit výrobní proces. Přidávají se zejména zvlhčující látky a aromatické přísady. Hlavní zvlhčující látkou v cigaretovém tabáku je glycerol a propylenglykol. Tyto látky zabraňují ztrátě plasticity a udržují jisté procento vlhkosti v listech tabáku.

3.13 Chemické složení cigaretových nedopalků

Jako hlavní materiál pro výrobu všech druhů filtrů se používá velice pevná celulóza. Někdy jsou cigaretové filtry označovány i jako celulosové filtry. Celulóza je polysacharid, který je složen z beta-D-glukóz. Tento polymer se získává primárně z buničiny a bavlněných linterů (krátká nespředená vlákna bavlny). Z celulózy se esterifikací hydroxylových skupin za pomoci kyseliny octové (ethanové) vytvoří acetát celulózy, což je hlavní složka cigaretových filtrů (Belzagui et al., 2021).

Celuloza (polysacharid)



Obrázek 2 Strukturální vzorec celulózy (Slejška, 2005)

Molekula acetát celulózy je velice stabilní látka, u které je biodegradace téměř nulová (Puls et al., 2011). Rozklad probíhá za přítomnosti vzduchu a UV záření. Nicméně náustkový papír, který obaluje filtr, ho chrání před UV zářením a zpomaluje tak dekompozici tohoto odpadu (Novotny et al., 2009). Deacetylaze hydrolyzou je totiž za normálních podmínek velice pomalý proces. Bylo zjištěno že v anaerobních podmínkách může trvat degradace cigaretových nedopalků 1 až 2 měsíce, 6 až 9 měsíců v půdě, 12 měsíců v sladké vodě a v slané vodě nebo poušti klidně i více jak 3 roky (Ach, 1993). Jednotlivá vlákna se pak rozloží na mikroplasty, jejichž dopad na životní prostředí je stále předmětem mnoha výzkumů (Hale et al., 2020).

Při zapálení tabákové směsi dojde k uvolňování chemických sloučenin, které z části prochází při natáhnutí cigaretového kouře skrz filtr. Na filtru se pak zachytávají mnohé částičky z tohoto kouře, z nich je velká část toxická. V cigaretovém kouři a dehtu může být obsaženo více jak 4 000 různých sloučenin, které jsou uvolňovány do životního prostředí nebo některé z nich zachytávány právě cigaretovým filtrem (Kurmus & Mohajerani, 2020). Většina těchto sloučenin je potenciálně nebezpečná pro životní prostředí a mohou ohrozit přirozený vývoj a výskyt jednotlivých druhů organismů (Rebischung et al., 2018).

Cigaretové nedopalky obsahují mnoho potenciálně škodlivých látek, mezi ně mimo jiné patří zejména:

- PAU neboli polycyklické aromatické uhlovodíky jsou skupiny uhlovodíku, které vznikají při nedokonalém spalování. Mají nejméně dvě benzenová jádra. Řada z nich je mutagenní a karcinogenní. Některé látky z této skupiny snižují krvetvorbu a poškozují imunitní systém. Zároveň mohou způsobit narušování kosterní soustavy některým druhům ryb (Hodson, 2017).
- Formaldehyd, systematickým názvem methanal (HCHO), je karcinogen a mutagen. Jeho přítomnost negativně ovlivňuje vodní organismy (Lalonde et al., 2015).
- Aceton neboli propan-2-on působí zejména toxicky pro vodní ekosystémy, kdy snižuje obsah kyslíku ve vodě. Jeho hodnota LC_{50} je pro rybí organismy 8,3 g/l po dobu 96 hodin (Majewski et al., 1978).
- Ethylfenol se používá jako ochucovadlo a je obsažen v tabákovém kouři. Při styku s vodním prostředím dochází k jeho bio akumulaci ve vodních organismech. Bylo prokázáno, že acetát celulózy (hlavní složka cigaretových filtrů) účinně absorbuje ethylfenol z cigaretového kouře. Z toho důvodu může být obsažen v cigaretovém nedopalku v mnohem vyšší koncentraci než třeba v cigaretovém kouři a může docházet k vylouhování do prostředí (Thompson et al., 1995)
- Benzen (C_6H_6) je karcinogenní, mutagenní a toxická organická látka, která proniká skrze dýchací cesty do těla. Dlouhodobá expozice v nízkých koncentracích je nebezpečná pro životní prostředí.
- Amoniak (NH_3) je bezbarvý a štiplavý plyn. Jedná se o běžný odpadní produkt metabolitu organismů, vzniká také při rozkladu organické hmoty. Velice toxický plyn, který je nebezpečný pro všechny živé organismy. Většina rostlinných druhů vykazuje snížený růst při expozici amoniakem. Amoniak vyvolá v systému rostliny nedostatek minerálních živin, který zmenší mimo jiné schopnost příjmu esenciálních kationtů kovu. Dále pak způsobí okyselení kořenového systému, který v důsledku ztrácí své schopnosti vstřebávat další živiny. V tabákové směsi se často vyskytuje kvůli své schopnosti lépe transportovat a vstřebávat nikotin do těla (Gerendás et al., 1997).

- Nikotin je anti herbivorní látka, kterou metabolizují rostliny rodu nicotina a je používána i jako pesticid. Jedná se o pyridinový alkaloid, který v malém množství stimuluje nervovou soustavu a je také návykový. Ve větším množství se jedná o jed. Jeho hodnota EC₅₀ pro vodní bezobratlé je 3 mg/l po dobu expozice 48 hodin. Smrtelná dávka pro člověka je kolem 60 mg. Nikotin je nejspíše jeden z hlavních důvodů vysoké toxicity cigaretových nedopalků (Micevska et al., 2006). Ve vodním prostředí se navíc velice lehce vstřebává různými orgány vodních organismů. Například vyšší koncentrace nikotinu ve vodě způsobuje rybám jaterní problémy (Adamu & Kori-Siakpere, 2011).

V samotném filtru pak nacházíme kromě výše zmíněných, které se uvolňují hlavně z dehtu a cigaretového kouře, i velké množství těžkých kovů, arsenu a nikotinu. Při chemické analýze se zjistilo, že cigaretové nedopalky obsahují množství kovů jako kadmium, chrom, měď, rtuť, mangan, fosfor, zinek, baryum, železo, olovo a mnoho dalších. Jeden cigaretový nedopalek může do svého okolí vylučovat tyto kovy po dobu až jednoho měsíce. Pokud uvažujeme přibližné množství 4,95 trilionů nedopalků jako litteru za rok, jedná se kontaminaci prostředí 9,26 kg hliníku, 8,76 kg barya a 38,1 kg železa. To je potenciální možné množství uvolňování těchto kovů za rok do ekosystémů jen díky odhozeným nedopalkům (Moerman & Potts, 2011).

Těžké kovy velice snadno putují do metabolismu, jsou velice špatně odbouratelné a hromadí se v jednotlivých orgánech. Hlavním mechanismem je navázání se na proteinové struktury (enzymy, hormony), nukleové kyseliny a vitamíny a tím ovlivňují funkci metabolických procesů všech organismů (Fu & Xi, 2020).

Při pěstování tabáku je použito velké množství pesticidů, které se pak dostanou do koncového výrobku. Při spalovacím procesu jsou pak tyto sloučeniny zachytávány cigaretovým filtrem. Byly nalezeny 3 různé pesticidy (flumetralin, pendimethalin, trifluralin) ve vzorku cigaretových nedopalků. Každý z těchto pesticidů je vyroben za účelem maximální efektivity zabití cílového organismu při co možná nejmenší dávce. To činí tyto sloučeniny extrémně nebezpečnými a mohou lehce podléhat bioakumulaci v lidském potravním řetězci (Dane et al., 2006).

Toxicita jednotlivých nedopalků závisí na mnoha faktorech. Každý případný studovaný organismus má jinou odezvu a míru odezvy na polutant. Každý výrobce tabákových výrobků má navíc vlastní chemické složení svých produktů. Mohou se lišit složením tabákové směsi, ale i koncentrací použitých chemikálií na výrobu finálních cigaret. To způsobuje i různou míru toxicity pro životní prostředí (Micevska et al., 2006).

3.14 Ekotoxikologické testy cigaretových nedopalků

Cigaretové nedopalky vykazují známky ekotoxicity na akvatické i suchozemské ekosystémy (Slaughter et al., 2011). Při výrobě cigaret je použito velké množství chemických látek. To platí i v případě pěstování tabáku, kdy se ve velkém množství

používají různě herbicidy, insekticidy, fungicidy, rodenticidy a mnohé další chemické látky. Všechny tyto sloučeniny se můžou v malém množství vyskytovat v konečném výrobku. Velké množství zbytkových koncentrací těchto pesticidů zachytí právě cigaretový filtr, který se tak stane místem s vysokou koncentrací různých chemických látek, které se při spalování uvolňují (Soleimani et al., 2022).

Test na osmi organismech, z nichž byly 4 vodní a 4 suchozemské, prokázal, že cigaretové nedopalky a jejich vodní roztoky jsou vysoce toxické. Byly zjištěny jednotlivé hodnoty EC₅₀ pro všechny druhy. Projevy toxicity na jednotlivé organismy byli různé. Jednalo se nejčastěji o inhibici růstu, inhibici mobility, snížení reprodukce případně i smrt. Mezi testované druhy patřila například *Daphnia magna* (hrotnatka velká), *Lactuca sativa* (locika setá) nebo *Eisenia fetida* (žížala hnojní) (Rebischung et al., 2018).

V jiné studii se autoři zaměřili na porovnání toxicity nedopalků, nepoužitých cigaretových filtrů a použitých filtrů na sladkovodní a mořské druhy ryb. Testy byly provedeny na dvou druzích, mořské rybě *Atherinops affinis* (gavúnovec jednopruhý) a sladkovodním druhu *Pimephales promelas* (jeleček velkohlavý). Bylo zjištěno že hodnota koncentrace pro klasické nedopalky obsahující i zbytky tabáku LC₅₀ je pro oba druhy přibližně 1 nedopalek na litr vody. Dopad nepoužitého cigaretového filtru bez tabáku ukázal, že LC₅₀ pro jelečka velkohlavého byla 13,5 filtru/l a pro gavúnce jednopruhého 5,1 filtru/l. Test ekotoxicity pouze na použitých cigaretových filtrech naměřil hodnoty pro *P. promelas* LC₅₀ 4,3 filtru/l a pro *A. affinis* LC₅₀ 1,8 filtru/l (Slaughter et al., 2011).

Je tedy zřejmé, že použité filtry, kterými procházel kouř z tabákové směsi a cigaretového papíru, jsou více toxické než nepoužité cigaretové filtry. Výskyt zbytků tabákové směsi, která obsahuje i popel a částečně spálené produkty, zvyšují toxicitu cigaretového nedopalku a činí ho nebezpečnějším pro životní prostředí. Je to dáno vznikem toxických sloučenin, které se při spalování tabákové směsi uvolňují a vytváří při vyšších teplotách (Slaughter et al., 2011).

V další studii byly testovány cigaretové nedopalky šesti různých výrobců na zooplanktonu *Ceriodaphnia dubia* a na gramnegativní bakterii *Aliivibrio fischeri*. Rozdíl mezi nejvíce a nejméně toxickými výluhy byly 2,9násobný u *Ceriodaphnia dubia* a 8násobný u *Aliivibrio fischeri*. Dalším zjištěním bylo, že se lišily hodnoty toxicity pro oba druhy a tím pádem různé hodnoty koncentrací. Celkově byla *C. dubia* více sensitivní než *A. fischeri*. Zvyšující se množství dehtu v každém nedopalku napříč testovanými typy docházelo k nárůstu hodnoty EC₅₀ (Micevska et al., 2006). Tento poznatek poukazuje na skutečnost, že predikce ekotoxicity by neměla být založena pouze na jednodruhovém testu, ale na kompletní analýze a zároveň potvrdila, že různé typy nedopalků se liší v míře toxicity.

V laboratorních podmínkách byly vystaveni různým koncentracím výluhu cigaretových nedopalků 3 druhy mořských plžů (*Gastropoda*). Na všech testovaných

objektech byla po 8 dnech 100 % úmrtnost při koncentraci 5 nedopalků na litr a dvou hodinách expozice (Booth et al., 2015).

Cigaretové nedopalky kromě inhibice růstu nebo smrti jedince mají vliv i na reprodukci některých druhů. Nedopalky způsobují mutagenní změnu u sladkovodních škeblí a způsobují narušení genetické informace. Zároveň působily u škeblí snížení tvorby červených krvinek (Montalvão et al., 2019). U drápatky vodní (*Xenopus laevis*) byla zjištěna teratogenita, tedy vrozená vývojová odchylka v počátečním stádiu života (Parker & Rayburn, 2017).

U sladkovodních mlžů druhu *Anodontites trapesialis*, kteří byli vystaveni expozici cigaretovými nedopalky, se projevily změny chování. Mlži se zahrabávali pod menším úhlem a také nezahrabaly své tělo celé, ale pouze část. Zároveň se při analýze svalové tkáně zjistilo, že obsahuje větší množství chromu, niklu, olova, manganu, zinku a sodíku. Tento druh bioakumuloval tyto kovy ve svém těle, které mohly způsobit pozorované změny chování. To je činilo méně aktivními a více náchylnými na predaci. Zhoršení životní strategie zmenšovalo tedy celkově fitness populace, která byla vystavena znečištění (Montalvão et al., 2019).

Při expozici cigaretových nedopalků na embrya medaky japonské (*Oryzias latipes*) projevovaly mladí jedinci chování podobné úzkosti, zvýšila se jim srdeční frekvence a zrychlily svůj vývoj u nižších koncentrací. Při vyšších koncentrací výluhu se projevovala u jedinci naopak nižší srdeční aktivita, potlačovali vývoj a byla zvětšena celková mortalita pozorovaného vzorku (Lee & Lee, 2015).

3.15 Struktura a složení elektronické cigarety

Elektronické cigarety se staly oblíbenou náhradou tradiční tabákové cigarety. Technologie, kterou využívá tento typ cigaret, byla vyvinuta kolem roku 1988 tabákovými společnostmi a distribuují je po celém světě jako zdravější náhradu za tradiční cigaretu (Caputi, 2017). Tabák s aditivami je místo spalování pouze nahříván technologií známou také jako „heat not burn“. Tabáková směs je zahřívána pomocí elektrického topného tělesa ze stříbra, zlata a keramiky na teplotu přibližně kolem 350 °C, při které se uvolňuje aerosol. Tato teplota je ve srovnání s klasickým spalováním tabáku (900 °C) o mnoho nižší. Aerosol obsahuje také o trochu menší množství nebezpečných látek než klasická cigareta. (Schaller et al., 2016). Nižší koncentrace nebezpečných látek nejspíše souvisí s právě nižší procesní teplotou (Farsalinos et al., 2018)

Zařízení k užívání tohoto typu příjmu nikotinu se skládá z elektrického tepelného tělesa v izolačním krytu ve tvaru pera. Do něj se vkládají jednorázové tyčinky známe jako „HeatStick“ nebo „Heets“. Tyto tyčinky obsahují tabákovou směs s glycerinem obalenou nehořlavou papírovou dutinkou a polymerového filtru a náustkového papíru z acetát celulózy. Oproti klasické cigaretě, je tento typ tyčinky po použití stejně dlouhý, protože se tabák nespálí. Filtr zde funguje hlavně jako chladící medium, které má zmenšit teplotu aerosolu pro uživatele. Glycerin se přidává do tabákové směsi jako

zvlhčovadlo tabáku, který pak není příliš křehký. Zahřívání a následné odpařování glycerinu vytváří po opětovné kondenzaci na vzduchu viditelný aerosol, který pozorujeme jako viditelnou páru (Simonavicius et al., 2019).

Při zahřívání se může polymerový filtr roztavit a tím potenciálně začít uvolňovat nebezpečné sloučeniny už při používání, které pak jsou obsaženy ve vdechovaném aerosolu a zároveň uchovány v cigaretové tyčince. Roztavení se projeví změnou barvy na zažloutlou a deformací filtru (Davis et al., 2018), (Ruprecht et al., 2017).

Chemická analýza filtru zjistila v minulosti přítomnost ϵ -kaprolaktonu, laktidu a změkčovadla 1,2-diacetinu. Mezi další látky, jejichž přítomnost byla zjištěna, patřily formaldehyd a kyanhydrin. Všechny zmíněné látky jsou toxické (Davis et al., 2018). Zároveň stejně jako u klasického cigaretového filtru bylo zjištěno velké množství dalších látek jako amoniak, acetaldehyd, aceton, měď, hliník, kyanid, arsen, kadmium, nikl, oxidy dusíku, nikotin, nitro sloučeniny, acrolein, kyselina suberová, kyselina azelaová, a dalších (Schaller et al., 2016). Bylo zjištěno, že množství kovů je větší u použitých tyčinek, tedy že zdrojem většiny kovů je právě tabáková směs, ze které se po zahřátí tyto kovy lépe uvolňují (Koutela et al., 2020). Naopak sloučeniny PAU nebyly téměř zaznamenány oproti klasickým cigaretám, kde se tyto látky ve velkém množství nachází (Ruprecht et al., 2017).

3.16 Ekotoxikologické testy elektronických nedopalků

Tento typ cigaret je na trhu z pohledu výzkumu dopadu na životní prostředí jen velmi malou dobu. Neexistuje velké množství studií, které by se zabývaly vlivem tohoto typu nedopalku na ekosystémy naší planety. Obecně je preventivně předpokládáno, že stejně jako klasické nedopalky i tento typ výrobku má při špatném nakládání s odpady negativní vliv na životní prostředí minimálně ve stejné míře (Basaran et al., 2019).

Stále je přítomno v tomto typu nedopalku velké množství zbytkového tabáku a nikotinu, který je anti herbivorní látkou. Jako další již zmíněným toxikantem jsou PAU sloučeniny, které se vyskytují v použitých nedopalcích. Pomocí ultrasonické extrakce byla stanovena koncentrace těchto sloučenin z vodného výluhu okolo 83 ng/L na jeden nedopalek v dešťové vodě. Tato koncentrace byla vyšší oproti kontrolním vzorcům vody. Zároveň je v použitém filtru hmotnost PAU sloučenin přibližně o 80 % větší než nepoužitým. Toto číslo nicméně nepřekvapí, neboť je to právě filtr, který zachytává většinu škodlivých látek, které se uvolňují při procesu zahřívání. Oproti klasické cigaretě je však koncentrace škodlivých látek ve filtru nižší u nedopalků z elektronických cigaret. To je způsobeno právě zahříváním, a ne spalováním tabáku (Solomou et al., 2023).

Ekotoxicita elektronických nedopalků je pravděpodobně podobná jako u klasických cigaret. Pomocí více druhového ekotoxického testu MARA, který zahrnuje 11 různých testovacích mikroorganismů bylo zjištěno, že rozdíly mezi naměřenými hodnotami MTC (*microbial toxic concentration*) jsou velice nízké. MTC chápeme jako nejmenší možnou koncentraci, při které byla pozorována inhibice růstu mikroorganismu.

Důležité bylo však zjištění, že výluhy z těchto nedopalků měly negativní efekt na všechny testované organismy (Baran et al., 2020).

Stejně jako klasický nedopalek obsahují elektronické cigarety velké množství těžkých kovů jako hliník, chrom, nikl, měď zinek, arsen, kadmium, olovo, selen a rtuť. Všechny tyto kovy byly přítomny ve vodném roztoku elektronických nedopalků. Hlavním zdrojem těchto kovů oproti klasické cigaretě, kde se většina nachází v cigaretovém filtru, je tabáková směs (Koutela et al., 2020).

4 Metodika

4.1 Metodika inhibice růstu *Spirodela polyrhiza*

Metodické postupy se shodovali s normou ČSN EN ISO 20227:2018 (757747), která popisuje ekotoxikologický test založený na inhibici růstu *S. polyrhiza*.

4.1.1 Chemikálie

Steinbergovo činidlo s chemickým složením viz *Tabulka 1*

Destilovaná voda (ELGA LabWater, Velká Británie)

4.1.2 Laboratorní přístroje a pomůcky

Duckweed Toxkit F (Microbiotests, Belgie)

více jamkové kultivační destičky (MicrobioTest, Belgie)

odměrná baňka

kultivační jednotka (MicrobioTest, Belgie)

Petriho misky

Sítka 100 μm

Kádinky

Inkubátor (MicroBioTests, Gent, Belgie)

Orbitální třepačka (Verkon, Česká republika)

Špachtle

automatická dávkovací mikropipeta (Eppendorf, Německo)

síto

pinzeta

pH meter (WTW, Česká republika)

Image J program

R-studio

4.1.3 Příprava Steinbergova činidla

Činidlo bylo připraveno dle návodu. Vzniklé činidlo mělo chemické složení dle *Tabulky 1*. Toto činidlo se použilo na germinaci turionů jako rostoucí médium. Složení činidla podléhalo normě ISO 20079, podle kterého bylo připraveno. Činidlo bylo připraveno vždy opětovně pokud doba mezi testovacími jednotkami byla více než 14 dní. Koncentrované roztoky, které se ředí dle návodu jsou součástí testovaného balíčku a obsahují velké množství živin, minerálů a látek, které napomáhají k růstu jedince.

sloučenina	koncentrace/mg. L ⁻¹
<i>KNO₃</i>	350,0
<i>Ca(NO₃).2H₂O</i>	295,0
<i>KH₂PO₄</i>	90,0
<i>K₂HPO₄</i>	12,6
<i>MgSO₄.7H₂O</i>	100,0
	Koncentrace/ g. μL ⁻¹
<i>H₃B0₃</i>	120,0
<i>ZnSO₄.7H₂O</i>	180,0
<i>Na₂MoO₄.2H₂O</i>	44,0
<i>MnCl₂.4H₂O</i>	180,0
<i>FeCl₃6H₂O</i>	760,0
EDTA	1500,0

Tabulka 1 chemické složení Steinbergova činidla

4.1.4 Germinace turionů

Klidová stadia *Spirodely polyrhiza* v podobě turionů klíčili ve 30 ml Steinbergova činidla po dobu 3 dní (72 ± 1 h) za konstantní teploty (25 ± 1 °C) ve světelných podmínkách intenzity osvětlení kolem 6000 lux v Petriho misce, která byla umístěna do inkubátoru, který zajistil definované podmínky. Turiony se před použitím důkladně opláchli skrz síto destilovanou vodou a poté Steibergovým činidlem, aby nedocházelo k ředění činidla vodou. Turiony vykazovaly po třech dnech známky vegetativního růstu v podobě prvních lístků. V této fázi byli jedinci vhodní na testování.

4.1.5 Příprava roztoku z nedopalků

Příprava byla provedena podle Korelova et al.,2010. Výluhy z cigaretových nedopalků obsahovaly 2, 6 a poté 12 nedopalků na litr. Protože nebyla známa koncentrace, při které dochází k prokazatelnému zjištění toxicity u tohoto testu bylo rozhodnuto nejprve začít s 2 nedopalky v 1 litru destilované vody. Po ukončení kultivace tohoto prvotního testu jsem byla zvýšena koncentrace (tedy množství) nedopalků na šest a poté na dvanáct, kdy při poslední zmíněné hodnotě byly pozorovány patrné změny inhibice růstu. Experimentální zjištění správného počtu cigaretových nedopalků v roztoku, kdy dojde k inhibici, byla 12 nedopalků na litr.

Byly použity dva druhy, a to klasické cigaretové nedopalky a elektronické cigaretové nedopalky IQOS bez příchutě. Výluh byl v 500 ml destilované vodě v temnu, za stále teploty (25 ± 1 °C) a neustálého míchaní na orbitální třepačce 106 ot. /min. po dobu 1 týdne.

Většina chemických sloučenin se z nedopalků vylouhuje již po prvním dnu. Nicméně v týdenním časovém intervalu dojde k maximálnímu uvolnění látek obsažených v nedopalcích.

Roztoky prošly filtrací za použití filtračního papíru a dále se ředily do jednotlivých rádků více jamkové kultivační destičky. Jednotlivé koncentrace v daných rádcích se

pohybovaly od 0% kdy bylo použito pouze Steinbergovo činidlo (kontrolní měření bez toxikantu), až do 100% byl použit pouze roztok z nedopalků.

4.1.6 Vlastnosti roztoků

Porovnáním cigaretových nedopalků z klasických a elektronických cigaret bylo zjištěno, že pH elektronických nedopalků byla nižší než u klasických. Rozdíl hodnot byl v průměru o 0,4 pH. Konduktivita byla naopak vyšší, což je nejspíše způsobeno větším množstvím částic a sloučenin v nedopalku z elektronických cigaret. Byl pozorován nárůst konduktivity u obou roztoků při zvyšujícím se počtu nedopalků. U hodnoty pH byla naopak pozorována snižující se tendence s rostoucím počtem nedopalků. Měření jak konduktivity, tak pH byla prováděna pouze jednou při všech koncentracích roztoku. Jednalo se o orientační měření, která měla pomoci určit cílovou podobu experimentu a napovědět případné chování výluhů.



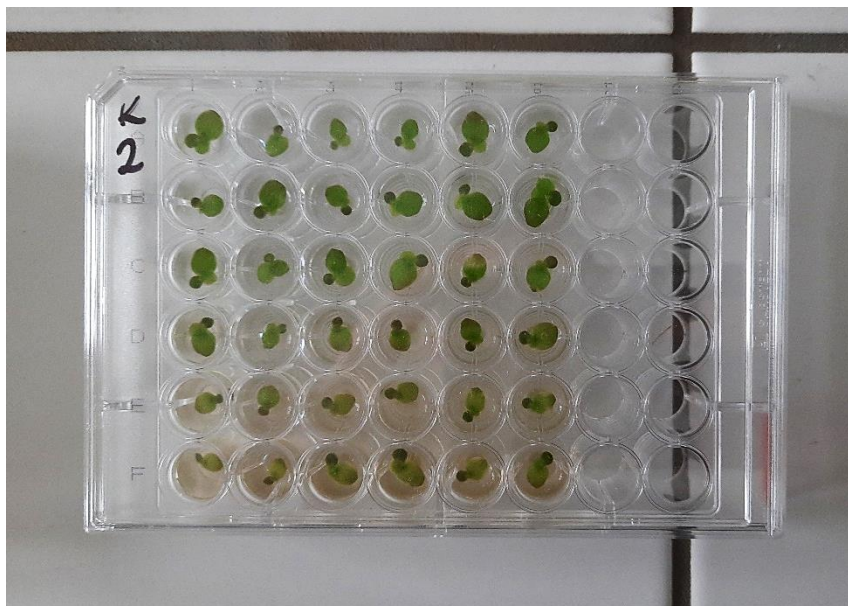
Obrázek 3 Roztoky z elektronických (vlevo) a klasických nedopalků (vpravo)

Další vlastnost, kterou můžeme porovnat je určitě barva roztoků, kdy elektronické nedopalky měly tmavší barvu oproti klasickým nedopalkům, jak můžeme pozorovat na *Obrázku 3*. Zároveň při filtraci bylo optickým pozorováním v roztoku z elektronických cigaret větší množství částic, které filtr zachytil a filtrování bylo časově náročnější.

4.1.7 Laboratorní postup

Do vícejamkové kultivační destičky byl v různých poměrech přidáván roztok cigaretového výluhu a Steinbergova činidla v různém poměru. Vždy byl přítomen kontrolní vzorek bez toxikantu, který sloužil jako kontrolní měření. Do každé testované jamky se vložil jeden jedinec *Spirodely polyrhiza*, který vykazoval známky vegetativního růstu a 1 ml roztoku cigaretového výluhu a Steinbergova činidla. Jedinci byly ukládány do jednotlivých jamek v náhodném pořadí, přičemž používaná špachtle se po každém použití opláchla, aby nedocházelo ke změnám koncentrací v rámci

testované jednotky. Každý řádek destičky představoval stejnou koncentraci roztoku, a tedy každý řádek udával měření inhibice růstu při dané koncentraci polutantu. Více jamková kultivační destička obsahovala řádky A až F a sloupce 1 až 8. Kontrolní řádek byl řádek A, řádek B až F obsahoval koncentraci polutantu od nejnižší po největší. Do každé jamky se umístil 1 ml příslušného roztoku.



Obrázek 4 Více jamková kultivační destička

Po naplnění testované kultivační destičky se pořídil fotografický snímek vzorků. Více jamková kultivační destička se umístila na bílou plochu, kde byl dostatek světla. V horizontální poloze nad kultivační destičkou se pomocí fotoaparátu pořídil snímek, na kterém byly jasně vidět všechny jamky tak, aby měly kulatý (ne oválný tvar), zároveň byly vidět i všechny hrany testované destičky. Snímky byly dělány stejným fotoaparátem na stejném místě při co možná nejvíce konstantních světelných podmínkách, aby nedocházelo k rozdílným optickým vlastnostem fotografie. Fotografický snímek se pořizoval vždy před a po ukončení inkubace testu.

Inkubace probíhala za teploty (25 ± 1 °C) po dobu (72 ± 1 h), za stálých světelných podmínek 6000 lux. Tyto podmínky byly dodrženy co nejpřesněji. Po inkubaci se pořázené snímky porovnali.

4.1.8 Postup testování

Bylo celkem měřeno šestkrát. Testovány byly vždy minimálně jedna více jamková destička s výluhem z klasického cigaretového filtru a jedna s výluhem z elektronických cigaretových nedopalků. Testů bylo provedeno 16 celkově.

První testování probíhalo při koncentraci výluhu 1 nedopalku. A následné ředění bylo 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1% a 10% koncentrace roztoku polutantu a Steinbergova činidla. Tímto měřením jsme se snažili zjistit meze při kterých je viditelná odezva organismu na daný toxikant. Poté byl vytvořeny výluhy s 3 nedopalky a testovanými

koncentracemi 10%, 25%, 50%, 75% a 100%. Koncentrace byla nakonec určena na 12 nedopalků na litr. Rozmezí v testované destičce bylo nastaveno na základě předešlých výsledků na 10%, 25%, 50%, 75% a 100% koncentrace roztoku polutantu a Steinbergova činidla. Měření z těmito hodnotami bylo provedeno celkově dvanáctkrát, respektive šestkrát pro klasické nedopalky a šestkrát pro elektronické nedopalky.

4.1.9 Vyhodnocení testu

Test je založen na pozorování inhibice růstu. Tedy měří se plocha jednotlivých jedinců pomocí počítačového programu „ImageJ“, který je doporučovaným nástrojem pro toto měření. Pomocí tohoto programu byly manuálně označeny plochy jednotlivých jedinců a program automaticky změnil jejich obsah na základě předem známého rozměru strany více jamkové kultivační destičky, která byla zadána. Zjištěné plochy jedinců před a po kultivaci byly porovnány mezi sebou a zjištěné hodnoty byly analyzovány na základě inhibice růstu při rozdílných koncentracích polutantu. Aby byl test validní, je potřeba, aby kontrolní řádek „A“ bez polutantu po 3 dnech inkubace měl v průměru nárůst plochy listenů (zvětšení biomasy) aspoň 10mm^2 . Pro statistické zhodnocení dat a grafické zobrazení dat byl použit program „R-Studio“.

4.2 Metodika stanovení koncentrace chlorofylu–a

V rámci určení toxicity cigaretových nedopalků byla kromě zkoušky na základě inhibice růstu *Spirodely polyrhiza* použita i metoda stanovení koncentrace chlorofylu. Tato laboratorní metoda byla vybrána, aby byla představa o toxicitě kompletní a mohli se porovnat výsledky těchto testů případně i mezi sebou. Spektrofotometrické stanovení koncentrace chlorofylu-a spadá pod normu ČSN ISO 10260.

4.2.1 Chemikálie

Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), vodný roztok 90%

Kyselina chlorovodíková (HCl), v koncentraci 3 mol/l

Destilovaná voda

4.2.2 Laboratorní přístroje a pomůcky

Automatická dávkovací mikropipeta (Eppendorf, Německo)

Zkumavky

Filtrační aparatura

Spektrofotometr (Agilent, Česká republika)

Vodní lázeň

Pinzeta

Kyvety

4.2.3 Laboratorní postup

Odebrané rostliny, které byly vystaveny stejné koncentraci toxikantu, se přefiltrovaly a uložily do zkumavky pomocí pinzety. Každá zkumavka obsahovala 7 ml ethanolu. Zkumavky se protřepaly a umístily do vodní lázně vytemperované na $(75 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C})$ po dobu 15 minut. Poté se z lázně vyndaly a nechaly se temperovat na laboratorní teplotu $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Po vyjmutí z vodní lázně se uchovával testovaný materiál v temnu, aby nedocházelo k rozkladu chlorofylu UV zářením a tím změně jeho koncentrace. Zkumavky se filtrovaly pomocí tlakové filtrace, aby se odstranily zbytky biomasy *Spirodely polyrhiza*.

Filtrát se poté testoval na spektrofotometru. Měření probíhalo za vlnových délek 665 nm a 750 nm. Referenční hodnota se provedla na vzorku 90 % ethanolu. Poté se testované vzorky včetně referenčního okyselily pomocí 0,01 ml kyseliny chlorovodíkové (3 mol/l) a protřepaly. Vzorky se po 5 minutách změřily znovu na spektrofotometru na stejných vlnových délkách.

4.2.4 Vyhodnocení testu

Změna hodnoty před a po okyselení nám pomocí výpočtu zjistí koncentraci chlorofylu-a a koncentrace feopigmentů. Feopigmenty jsou produkty rozkladu chlorofylu.

$$\text{Chlorofyl} - a \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{l}} \right] = 29,6 \cdot (A - A_a) \cdot \frac{v}{V \cdot d}$$

$$\text{Feopigmenty} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{l}} \right] = 20,8 \cdot A_a \cdot \frac{v}{V \cdot d} - \text{Chlorofyl} - a$$

Kdy:

A je ($A_{665} - A_{750}$) absorbance před okyselením,

A_a je ($A_{665} - A_{750}$) absorbance po okyselením,

v je objem extraktu v milimetrech,

V je objem zfiltrovaného vzorku v litrech,

d je délka kyvety v cm.

4.2.5 Podstata zkoušky

Testováním koncentrace chlorofylu se mohl určit jeden z mnoha činitelů, které poukazují na stav rostliny. Můžeme předpokládat, že menší množství chlorofylu ve vzorku poukazuje na případnou odezvu *Spirodely polyrhiza* na větší množství toxických látek ve vzorku a tím i menší produkci chlorofylu. Samotné spektrofotometrické stanovení chlorofylu-a extrahovaného ethanolom poměří jednotlivé vzorky mezi sebou. Tedy není zjištěná přesná koncentrace, ale pouze poměry mezi našimi vzorky, které můžeme porovnat.

5 Výsledky

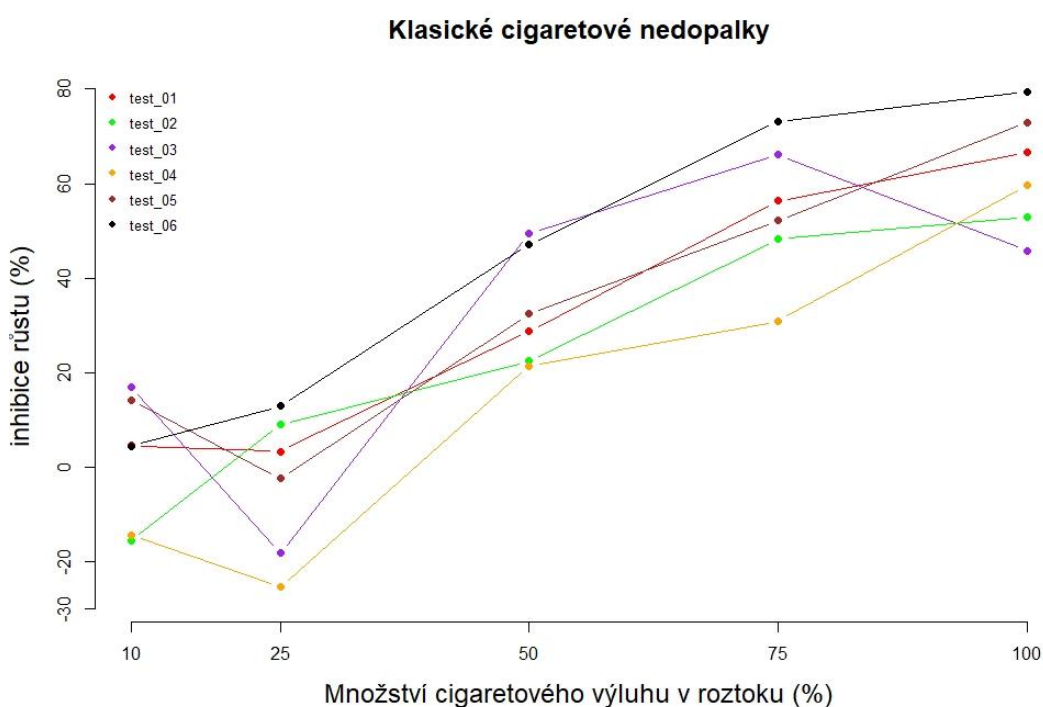
5.1 Výsledky inhibice růstu *Spirodela polyrhiza*

Testování probíhalo v několika fázích, kdy bylo cílem zjištění rozmezí, při kterém je test inhibice růstu prokazatelný a dochází k validním výsledkům a určit tak rozpětí, ve kterém se bude test ubírat a tím i stanovit specifika pro testování.

Nárůstu plochy listenů pro každou koncentraci výluhu se Steinbergovým činidlem byl vždy větší než 10mm^2 , tedy test byl validní. Koncentrace výluhu s činidlem byly 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1% a 10%. Pro každou koncentraci bylo vždy 5 vzorků, respektive 5 jedinců. Výsledkem bylo procentuální inhibice, která se bohužel pohybovala různě u obou typů cigaret a neměla rostoucí tendenci s vyšší koncentrací toxikantu. Výsledky tedy nebyly jednoznačné, a proto byla změněna koncentrace ve výluhu z dvou na šest nedopalků na litr. Zvýšili se i koncentrace výluhu s činidlem na 10%, 25%, 50%, 75% a 100%. Zde již byly patrné námi předpokládané tendence zvyšující se inhibice s rostoucí koncentrací. Konečný testovací model, který byl použit, byl výluh 6 cigaretových nedopalků na 500 ml respektive 12 nedopalků na litr a koncentrace tohoto výluhu v pěti testovaných koncentracích byla 10%, 25%, 50%, 75% a 100%, což odpovídá 1,2; 3; 6; 9 a 12 kusů na litr. Zbytek roztoku bylo Steinbergovo činidlo.

Jak již bylo několikrát zmíněno sledovala se inhibice růstu v závislosti na koncentraci roztoku polutantu z cigaretových nedopalků.

5.1.1 Testování klasických cigaretových nedopalků

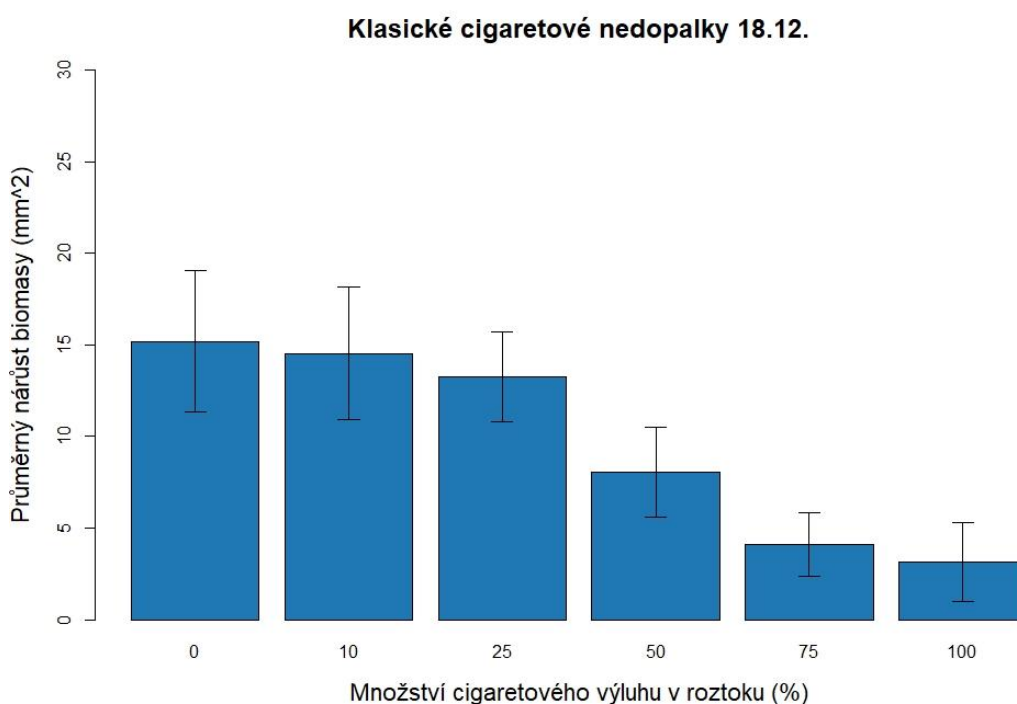


Graf 2 závislost inhibice růstu na koncentraci polutantu

Graf 2 poukazuje průměrnou inhibici růstu, která byla posouzena s referenčním růstem bez polutantu v rámci dané koncentrace při jednotlivých testech.

Jak z grafu vyplývá, s rostoucí množstvím výluhu nedopalků v roztoku se zvyšovala inhibice růstu organismu. Jednotlivá označení tes_01 až test_06 nám označují jednotlivá měření. Jedná se o 6 měření, která probíhala při stejné koncentraci roztoku poměru Steinbergova činidla a výluhu z cigaretových nedopalků.

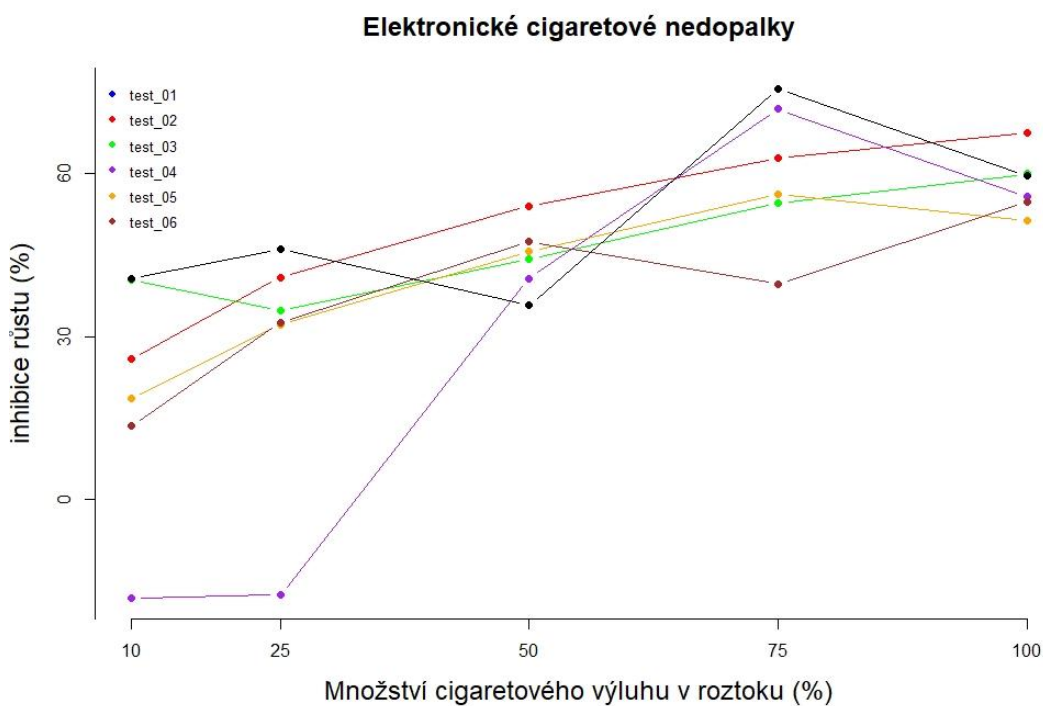
Záporná čísla nám říkají, že daný soubor jedinců měl průměrně vyšší přírůstek biomasy oproti referenčním jedincům. Tato měření byla zaznamenána pouze u koncentrací 10% a 25% roztoku klasických cigaretových nedopalků u 3 ze 6 testů.



Graf 3 průběžný nárůst biomasy u testu ze dne 18.12.2022

Naměřené hodnoty jsou v Grafu 3 reprezentativní, kdy s rostoucí koncentrací polutantu můžeme vidět snižující se množství nárůstu biomasy, které bylo měřeno jako hlavní parametr.

5.1.2 Testování elektronických cigaretových nedopalků

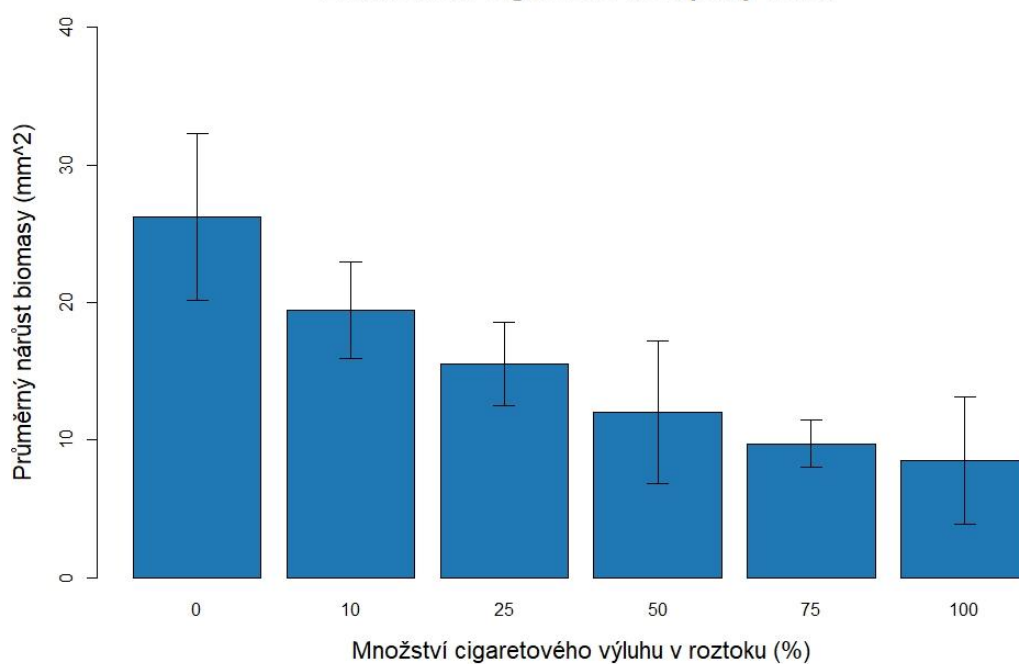


Graf 4 závislost inhibice růstu na koncentraci polutantu

Graf 4 opět poukazuje průměrnou inhibici růstu, která byla posouzena s referenčním růstem bez výluhu z cigaretových nedopalků v rámci dané koncentrace při jednotlivých testech.

Z *Grafu 4* opět vyplývá, že má inhibice růstu tendenci růst s rostoucím množstvím výluhu nedopalků v roztoku. Záporné hodnoty inhibice u test_04 jsou u nižších koncentrací a vyskytují se pouze u tohoto testu, přičemž tyto hodnoty neodpovídají pozorovanému trendu.

Elektronické cigaretové nedopalky 17.11.

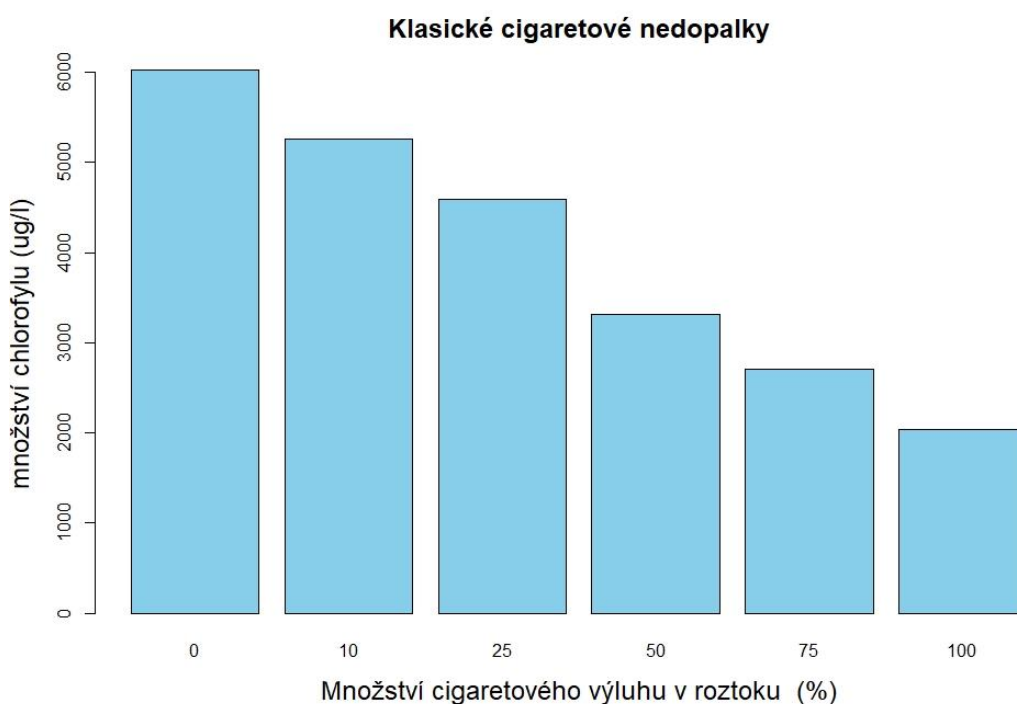


Graf 5 průměrný nárůst biomasy u testu ze dne 17.11.2022

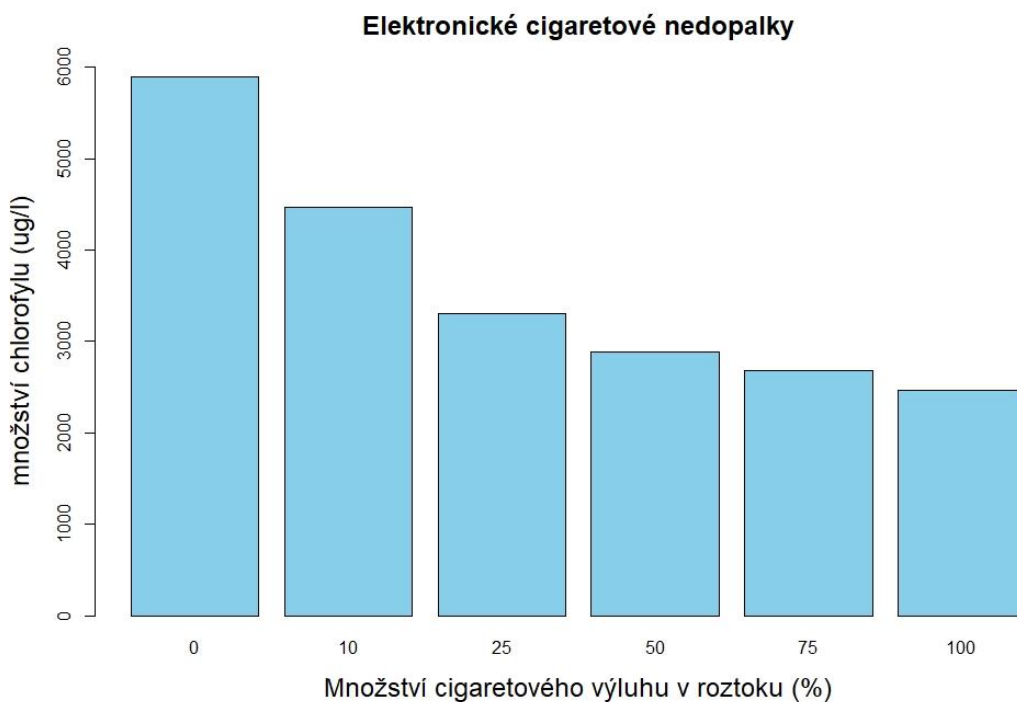
Grafu 5 je reprezentativním vzorkem měření a sledovaného trendu. Opět je zde snížení průměrného nárůstu biomasy s rostoucí koncentrací cigaretového výluhu v daném roztoku se Steinbergovým čínidlem.

5.2 Výsledky stanovení koncentrace chlorofylu–a

Výsledky stanovené koncentrace chlorofylu byly provedeny pouze jednou na 2 testovacích kitech. Toto testování mělo nastínit případné další změny, které se v organismu projevují, neboť jeho odpověď na polutant nemuselo být vždy snížení růstu, ale mohlo se projevit jako snížení množství chlorofylu v organismu. Porovnáním těchto hodnot napříč zvolených koncentrací ukázalo na základě Kruskal-Wallis testu, že můžeme vyvrátit hypotézu, že střední hodnoty množství chlorofylu jsou stejné. Námí zvolená hladina významnosti byla 0,05 a výsledná p hodnota byla 0,01.



Graf 6 množství chlorofylu v závislosti na množství cigaretového výluhu v roztoku



Graf 7 množství chlorofylu v závislosti na množství cigaretového výluhu v roztoku

Z Grafu 6 a z Grafu 7 vyplývá, že je zde tendence snižování množství chlorofylu s rostoucí koncentrací polutantu v roztoku se Steinbergovým činidlem. Testování korelace bylo u všech čtyř námi testovaných sad více jamkových kultivačních destiček prokázáno a hodnota korelačního koeficientu se blížila k hodnotě mínus jedné, přesněji šlo o hodnotu -0,8.

6 Diskuse

Hlavním cílem bakalářské práce bylo experimentální zhodnocení ekotoxicity klasických cigaretových nedopalků a nedopalků z elektronických cigaret na bázi zahřívání tabáku pomocí standardizovaného testu inhibice růstu *Spirodely polyrhiza* (závitky mnohokřenné).

Naše hypotéza spočívala ve snaze zjistit vztah mezi rostoucí koncentrací množství cigaretového výluhu. Roztok se skládal dále ze Steinbergova činidla, které sloužilo jako růstové médium. Zároveň jsme se snažili i zjistit, zda vůbec tyto nedopalky jsou pro námi zvolený test prokazatelné a zda můžeme touto naší metodou zjišťovat případnou toxicitu, kterou způsobují cigaretové nedopalky jako litter ve vodním prostředí.

Byla prokázána inhibice růstu *Spirodely polyrhiza* oproti referenčnímu vzorku, kde byl roztok pouze se Steinbergovým činidlem. Bylo prokázáno, že střední hodnoty inhibice růstu jsou napříč koncentracemi signifikantně rozdílné u obou druhů nedopalků. Byla statisticky prokázána korelace mezi zvyšujícím se množstvím cigaretového výluhu v roztoku a zvyšující se inhibicí růstu.

Cigaretové nedopalky vykazovaly známky ekotoxicity na *Spirodelu polyrhiza*. To se shoduje s výsledky studie, která prokázala ekotoxické účinky klasických cigaretových nedopalků na akvatické ekosystémy (Slaughter et al., 2011). Test na 4 vodních organismech prokázal, že vodní roztoky těchto nedopalků jsou vysoce toxické (Slaughter et al., 2011). To se ukázalo i v našem případě, kdy každý z našich testů byl validní a prokázal ekotoxicitu výluhu.

Oproti klasické cigaretě je koncentrace škodlivých látek ve filtru elektronických cigaret na bázi zahřívání tabáku nižší. To je způsobeno právě zahříváním, a ne spalováním tabáku. Toxicita elektronického nedopalku je ve srovnání s klasickou cigaretou naopak vyšší z důvodu přítomnosti velkého množství tabáku (Solomou et al., 2023). Testování těchto nedopalků potvrdilo jejich toxicitu, která je vyšší než u klasických nedopalků.

Výluhy z těchto nedopalků měly negativní efekt na všechny testované organismy v rámci více druhového ekotoxického MARA testu a ekotoxicita elektronických nedopalků je pravděpodobně podobná jako u klasických cigaret. (Baran et al., 2020). Tedy naše výsledky se shodují s literaturou a podporují tvrzení, že tento liter může představovat hrozbu pro životní prostředí hlavně tedy pro vodní ekosystémy.

Naše výsledky nebyly jednoznačné na celé škále testovaných laboratorních testů. Bylo potřeba zvýšit koncentraci polutantu na desítky procent v roztoku, aby byl pozorován námi předpokládaný jev. To, že může *Spirodela polyrhiza* reagovat na přítomnost polutantu z cigaretových nedopalků jinak než inhibicí růstu, může způsobovat nepřesnosti a špatné interpretace výsledků tohoto testu. Toto všechno

jsou limity tohoto výzkumu, kdy sice prokážeme ekotoxicitu tohoto polutantu, nicméně nemůžeme říci v jaké míře je nebezpečný.

Díky standardizovanému testu bylo minimalizováno množství proměnných, které by mohly test kompromitovat. Byl dán expoziční čas, dávka, typ organismu, který měl díky vegetativnímu rozmnožování geneticky homogenní populaci, světelné podmínky, teplota a mnoho dalších, které vychází z předepsané normy. Případná následná interpretace těchto výsledků je tedy validní k posouzení s dalším měřením.

Na základě této bakalářské práce lze formulovat několik doporučení:

- Rozšíření testovaných toxiků a větší množství dat se zaměřením na případně lepší rozložení koncentrací polutantu v rámci testované škály.
- Porovnání těchto testů na jiném standardizovaném testu s jiným vodním organismem, ať už rostlinných nebo živočišných druhů.
- Dále pak realizace projektu za účelem snížení množství nedopalků v životním prostředí a případná ekonomická studie, která by odhadla náklady na odstranění tohoto litteru.

7 Závěr a přínos práce

V rámci standardizovaného testu byly sledovány ekotoxikologické účinky cigaretových nedopalků, jak klasických, tak elektronických na testovací organismus *Spirodela polyrhiza*. Výsledky tohoto výzkumu indikují, že oba typy nedopalků jsou toxické pro testovaný organismus, což se projevuje inhibicí růstu.

Byla potvrzena existence ekotoxicity elektronických cigaret na *Spirodela polyrhiza*. Tato skutečnost zdůrazňuje potenciální dopady elektronických cigaret na vodní ekosystémy. Získané výsledky též ukazují, že *Spirodela polyrhiza* reaguje na výluhy z cigaretových nedopalků jinými mechanismy než pouze inhibicí růstu. Tato variabilita reakce může představovat komplikaci při interpretaci výsledků a následné identifikaci celkové ekotoxicity. Paralelně s prezentovaným výzkumem potvrzují literární prameny, že cigaretové nedopalky mohou být reálnou hrozbou pro vodní prostředí.

Standardizovaný test inhibice růstu se prokázal jako užitečný nástroj pro validní interpretaci výsledků. Je však nezbytné zdůraznit, že existují limity tohoto výzkumu, jako například nutnost zvýšení koncentrace polutantu pro pozorování očekávaných jevů. Tyto aspekty vyžadují další důkladné zkoumání s cílem komplexně porozumět rozsahu nebezpečí, které cigaretové nedopalky mohou představovat pro vodní ekosystémy.

Za hlavní přínos bakalářské práce je považováno provedení studie zkoumající problematiku cigaretových nedopalků obzvláště pak těch elektronických, které se těší velké oblibě, ale jejich dopad na životní prostředí není zcela prostudován. Dále pak provedení konkrétního ekotoxikologického testu, který může být jednou z možností, jak tyto informace získat a objasnit tuto problematiku.

8 Přehled literatury a použitých zdrojů

- Adamu, K., & Kori-Siakpere, O. (2011). Effects of sublethal concentrations of tobacco (*Nicotiana tobaccum*) leaf dust on some biochemical parameters of Hybrid catfish (*Clarias gariepinus* and *Heterobranchus bidorsalis*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(1), 183-196. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000100023>
- Ach, A. (1993). Biodegradable Plastics Based on Cellulose Acetate. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 30(9-10), 733-740. <https://doi.org/10.1080/10601329308021259>
- Aldieri, L., Ioppolo, G., Vinci, C., & Yigitcanlar, T. (2019). Waste recycling patents and environmental innovations: An economic analysis of policy instruments in the USA, Japan and Europe. *Waste Management*, 95, 612-619. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.06.045>
- Anděl, P. (2011). *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring* (Vyd. 1). Evemia.
- Appenroth, K., Teller, S., & Horn, M. (1996). Photophysiology of turion formation and germination in *Spirodela polyrhiza*. *Biologia plantarum*, 38(1). <https://doi.org/10.1007/BF02879642>
- Appenroth, K., Krech, K., Keresztes, Á., Fischer, W., & Koloczek, H. (2010). Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere*, 78(3), 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.007>
- Asensio-Montesinos, F., Anfuso, G., & Williams, A. (2019). Beach litter distribution along the western Mediterranean coast of Spain. *Marine Pollution Bulletin*, 141, 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.031>
- Baran, W., Madej-Knysak, D., Sobczak, A., & Adamek, E. (2020). The influence of waste from electronic cigarettes, conventional cigarettes and heat-not-burn tobacco products on microorganisms. *Journal of Hazardous Materials*, 385. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121591>
- Basaran, R., GÜVEN, N., & EKE, B. (2019). An Overview of iQOSsup®/sup as a New Heat-Not-Burn Tobacco Product and Its Potential Effects on Human Health and the Environment. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(3), 371-374. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2018.79095>
- Baudo, R., Foudoulakis, M., Arapis, G., Perdaen, K., Lanneau, W., Paxinou, A., Kouvdou, S., & Persoone, G. (2015). History and sensitivity comparison of the *Spirodela polyrhiza* microbiotest and *Lemna* toxicity tests. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (416). <https://doi.org/10.1051/kmae/2015019>
- Belzagui, F., Buscio, V., Gutiérrez-Bouzán, C., & Vilaseca, M. (2021). Cigarette butts as a microfiber source with a microplastic level of concern. *Science of The Total Environment*, 762. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144165>
- Booth, D., Gribben, P., & Parkinson, K. (2015). Impact of cigarette butt leachate on tidepool snails. *Marine Pollution Bulletin*, 95(1), 362-364. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.004>

- Brouwer, A., Murk, A., & Koeman, J. (1990). Biochemical and Physiological Approaches in Ecotoxicology. *Functional Ecology*, 4(3).
<https://doi.org/10.2307/2389586>
- Campbell, P., Hodson, P., Welbourn, P., & Wright, D. (2022). *Ecotoxicology*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781108819732>
- Caputi, T. (2017). Industry watch: heat-not-burn tobacco products are about to reach their boiling point. *Tobacco Control*, 26(5), 609-610.
<https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2016-053264>
- Curtis, C., Novotny, T., Lee, K., Freiberg, M., & McLaughlin, I. (2016). Tobacco industry responsibility for butts: a Model Tobacco Waste Act. *Tobacco Control*, 26(1), 113-117. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2015-052737>
- Český normalizační institut. (2007). Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*).
- d'Henri Teixeira, M., Duarte, M., Raposo Garcez, L., Camargo Rubim, J., Hofmann Gatti, T., & Suarez, P. (2017). Process development for cigarette butts recycling into cellulose pulp. *Waste Management*, 60, 140-150.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.013>
- Dane, A., Havey, C., & Voorhees, K. (2006). The Detection of Nitro Pesticides in Mainstream and Sidestream Cigarette Smoke Using Electron Monochromator-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 78(10), 3227-3233.
<https://doi.org/10.1021/ac060328w>
- Davis, B., Williams, M., & Talbot, P. (2018). iQOS: evidence of pyrolysis and release of a toxicant from plastic. *Tobacco Control*, 28(1), 34-41.
<https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2017-054104>
- Dobaradaran, S., Soleimani, F., Akhbarizadeh, R., Schmidt, T., Marzban, M., & BasirianJahromi, R. (2021). Environmental fate of cigarette butts and their toxicity in aquatic organisms: A comprehensive systematic review. *Environmental Research*, 195. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110881>
- Farsalinos, K., Yannovits, N., Sarri, T., Voudris, V., & Poulas, K. (2018). Nicotine Delivery to the Aerosol of a Heat-Not-Burn Tobacco Product: Comparison With a Tobacco Cigarette and E-Cigarettes. *Nicotine & Tobacco Research*, 20(8), 1004-1009. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntx138>
- Ford, A., Ågerstrand, M., Brooks, B., Allen, J., Bertram, M., Brodin, T., Dang, Z., Duquesne, S., Sahm, R., Hoffmann, F., Hollert, H., Jacob, S., Klüver, N., Lazorchak, J., Ledesma, M., Melvin, S., Mohr, S., Padilla, S., Pyle, G. et al. (2021). The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection. *Environmental Science & Technology*, 55(9), 5620-5628. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06493>
- Friederichs, K. (1958). A Definition of Ecology and Some Thoughts About Basic Concepts. *Ecology*, 39(1). <https://doi.org/10.2307/1929981>
- Fu, Z., & Xi, S. (2020). The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 30(3), 167-176.
<https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>

- Gerendás, J., Zhu, Z., Bendixen, R., Ratcliffe, R., & Sattelmacher, B. (1997). Physiological and Biochemical Processes Related to Ammonium Toxicity in Higher Plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 160(2), 239-251. <https://doi.org/10.1002/jpln.19971600218>
- Hahladakis, J. (2020). Delineating the global plastic marine litter challenge: clarifying the misconceptions. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(5). <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8202-9>
- Hale, R., Seeley, M., La Guardia, M., Mai, L., & Zeng, E. (2020). A Global Perspective on Microplastics. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 125(1). <https://doi.org/10.1029/2018JC014719>
- Hodson, P. (2017). The Toxicity to Fish Embryos of PAH in Crude and Refined Oils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(1), 12-18. <https://doi.org/10.1007/s00244-016-0357-6>
- Hoffman, D., Rattner, B., Burton, G., & Cairns, J. (2002). *Handbook of Ecotoxicology* (2 ed.). CRC Press. Google-Books-ID: 6U3MBQAAQBAJ
- Horák, J., Linhart, I., & Klusoň, P. (2004). *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky* (Vyd. 1). Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- Chapman, P. (2002). Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, 44(1), 7-15. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00253-3](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00253-3)
- Chen, D., Bodirsky, B., Krueger, T., Mishra, A., & Popp, A. (2020). The world’s growing municipal solid waste: trends and impacts. *Environmental Research Letters*, 15(7). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab8659>
- Iannilli, V., Passatore, L., Carloni, S., Lecce, F., Sciacca, G., Zacchini, M., & Pietrini, F. (2023). Microplastic Toxicity and Trophic Transfer in Freshwater Organisms: Ecotoxicological and Genotoxic Assessment in *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. and *Echinogammarus veneris* (Heller, 1865) Treated with Polyethylene Microparticles. *Water*, 15(5). <https://doi.org/10.3390/w15050921>
- Judith, M., Michael, E., & Michael P, E. (2012). *The tobacco atlas* (4 ed.). American Cancer Society.
- Kaplan, Z., & Štěpánková, J. (2010). *Květena České republiky: 8. díl* (1 ed.). Academia.
- Kong, I., Bitton, G., Koopman, B., & Jung, K. (1995). Heavy Metal Toxicity Testing in Environmental Samples. In G. Ware (ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 119-147). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4252-9_5
- Koutela, N., Fernández, E., Saru, M., & Psillakis, E. (2020). A comprehensive study on the leaching of metals from heated tobacco sticks and cigarettes in water and natural waters. *Science of The Total Environment*, 714. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136700>
- Kurmus, H., & Mohajerani, A. (2020). The toxicity and valorization options of cigarette butts. *Waste Management*, 104, 104-118. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.01.011>

- Lalonde, B., Ernst, W., & Garron, C. (2015). Formaldehyde Concentration in Discharge from Land Based Aquaculture Facilities in Atlantic Canada. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94(4), 444-447. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1493-9>
- Lear, L. (1993). Rachel Carson's Silent Spring. *Environmental History Review*, 17(2). <https://doi.org/10.2307/3984849>
- Lee, W., & Lee, C. (2015). Developmental toxicity of cigarette butts – An underdeveloped issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 362-368. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.018>
- Majewski, H., KLAVERKAMP, J., & SCOTT, D. (1978). Acute lethality, and sub-lethal effects of acetone, ethanol, and propylene glycol on the cardiovascular and respiratory systems of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Water Research*, 12(4), 217-221. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(78\)90089-1](https://doi.org/10.1016/0043-1354(78)90089-1)
- Marinello, S., Lolli, F., Gamberini, R., & Rimini, B. (2020). A second life for cigarette butts? A review of recycling solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 384. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121245>
- Micevska, T., Warne, M., Pablo, F., & Patra, R. (2006). Variation in, and Causes of, Toxicity of Cigarette Butts to a Cladoceran and Microtox. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50(2), 205-212. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0132-y>
- Moerman, J., & Potts, G. (2011). Analysis of metals leached from smoked cigarette litter. *Tobacco Control*, 20(1), i30-i35. <https://doi.org/10.1136/tc.2010.040196>
- Montalvão, M., Chagas, T., da Silva Alvarez, T., Mesak, C., da Costa Araújo, A., Gomes, A., de Andrade Vieira, J., & Malafaia, G. (2019). How leachates from wasted cigarette butts influence aquatic life? A case study on freshwater mussel *Anodonta trapesialis*. *Science of The Total Environment*, 689, 381-389. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.385>
- Montalvão, M., Chagas, T., Gabriela da Silva Alvarez, T., Mesak, C., Pereira da Costa Araújo, A., Gomes, A., Emmanuela de Andrade Vieira, J., Rocha, T., & Malafaia, G. (2019). Cigarette butt leachate as a risk factor to the health of freshwater bivalve. *Chemosphere*, 234, 379-387. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.100>
- Moriarty, F. (1988). Ecotoxicology. *Human Toxicology*, 7(5), 437-441. <https://doi.org/10.1177/096032718800700510>
- Moroz, I., Scapolio, L., Cesarino, I., Leão, A., & Bonanomi, G. (2021). Toxicity of cigarette butts and possible recycling solutions—a literature review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(9), 10450-10473. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11856-z>
- Najfus, J. (2022). Litteringový výzkum v České republice. In *EKO-KOM*. <https://www.ekokom.cz/litteringovy-vyzkum-v-ceske-republice/>
- Navrátilová, J. (2005). Spirodela polyrhiza: Třeboň (okr. Jindřichův Hradec), NPR Stará řeka. In *Pladias.cz*. <https://pladias.cz/taxon/pictures/Spirodela%20polyrhiza#image1>

- Newman, M. (2020). *Fundamentals of Ecotoxicology* (5 ed.). CRC Press.
- Novotny, T., & Slaughter, E. (2014). Tobacco Product Waste: An Environmental Approach to Reduce Tobacco Consumption. *Current Environmental Health Reports*, 1(3), 208-216. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0016-x>
- Novotny, T., Lum, K., Smith, E., Wang, V., & Barnes, R. (2009). Cigarettes Butts and the Case for an Environmental Policy on Hazardous Cigarette Waste. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(5), 1691-1705. <https://doi.org/10.3390/ijerph6051691>
- Novotny, T., Lum, K., Smith, E., Wang, V., & Barnes, R. (2009). Cigarettes Butts and the Case for an Environmental Policy on Hazardous Cigarette Waste. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(5), 1691-1705. <https://doi.org/10.3390/ijerph6051691>
- Oláh, V., Hepp, A., & Mészáros, I. (2016). Assessment of Giant Duckweed (*Spirodela polyrhiza* L. Schleiden) Turions as Model Objects in Ecotoxicological Applications. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(5), 596-601. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1765-z>
- Olsson, M., & Reutergårdh, L. (1986). DDT and PCB Pollution Trends in the Swedish Aquatic Environment. In *JSTOR*. <https://www.jstor.org/stable/4313225>
- Parker, T., & Rayburn, J. (2017). A comparison of electronic and traditional cigarette butt leachate on the development of *Xenopus laevis* embryos. *Toxicology Reports*, 4, 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.01.003>
- Pavlíková, D. (2008). *Ekotoxikologie* (2., dopl. a přeprac. vyd). Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů.
- Pietrini, F., Iannilli, V., Passatore, L., Carloni, S., Sciacca, G., Cerasa, M., & Zacchini, M. (2022). Ecotoxicological and genotoxic effects of dimethyl phthalate (DMP) on *Lemna minor* L. and *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. plants under a short-term laboratory assay. *Science of The Total Environment*, 806. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150972>
- Puls, J., Wilson, S., & Hölter, D. (2011). Degradation of Cellulose Acetate-Based Materials: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*, 19(1), 152-165. <https://doi.org/10.1007/s10924-010-0258-0>
- Rebischung, F., Chabot, L., Biaudet, H., & Pandard, P. (2018). Cigarette butts: A small but hazardous waste, according to European regulation. *Waste Management*, 82, 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.038>
- Rebischung, F., Chabot, L., Biaudet, H., & Pandard, P. (2018). Cigarette butts: A small but hazardous waste, according to European regulation. *Waste Management*, 82, 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.038>
- Ruprecht, A., De Marco, C., Saffari, A., Pozzi, P., Mazza, R., Veronese, C., Angellotti, G., Munarini, E., Ogliari, A., Westerdahl, D., Hasheminassab, S., Shafer, M., Schauer, J., Repace, J., Sioutas, C., & Boffi, R. (2017). Environmental pollution and emission factors of electronic cigarettes, heat-not-burn tobacco products, and conventional cigarettes. *Aerosol Science and Technology*, 51(6), 674-684. <https://doi.org/10.1080/02786826.2017.1300231>

- Schaller, J., Pijnenburg, J., Ajithkumar, A., & Tricker, A. (2016). Evaluation of the Tobacco Heating System 2.2. Part 3: Influence of the tobacco blend on the formation of harmful and potentially harmful constituents of the Tobacco Heating System 2.2 aerosol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *81*, S48-S58. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.10.016>
- Schultz, P., Bator, R., Large, L., Bruni, C., & Tabanico, J. (2013). Littering in Context. *Environment and Behavior*, *45*(1), 35-59. <https://doi.org/10.1177/0013916511412179>
- Schwarz, A., Ligthart, T., Boukris, E., & van Harmelen, T. (2019). Sources, transport, and accumulation of different types of plastic litter in aquatic environments: A review study. *Marine Pollution Bulletin*, *143*, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.04.029>
- Simonavicius, E., McNeill, A., Shahab, L., & Brose, L. (2019). Heat-not-burn tobacco products: a systematic literature review. *Tobacco Control*, *28*(5), 582-594. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2018-054419>
- Slaughter, E., Gersberg, R., Watanabe, K., Rudolph, J., Stransky, C., & Novotny, T. (2011). Toxicity of cigarette butts, and their chemical components, to marine and freshwater fish. *Tobacco Control*, *20*(1), i25-i29. <https://doi.org/10.1136/tc.2010.040170>
- Slavík, J., Dolejš, M., & Rybova, K. (2022). *HODNOCENÍ VOLNĚ POHOZENÉHO ODPADU (LITTERING): JAKO PODKLAD PRO PLÁN ŘEŠENÍ PROBLEMATIKY LITTERINGU OBALŮ V ČESKÉ REPUBLICE VČETNĚ STANOVENÍ PODÍLU OBALOVÉ SLOŽKY* [Výzkum]. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně.
- Slejška, A. (2005). Strukturní vzorec celulozy. https://r.fld.czu.cz/vyzkum/nauka_o_lp/chemie/celuloza.jpg
- Soleimani, F., Dobaradaran, S., De-la-Torre, G., Schmidt, T., & Saeedi, R. (2022). Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review. *Science of The Total Environment*, *813*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152667>
- Solomou, N., Fernández, E., Szafnauer, R., & Psillakis, E. (2023). Total and bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons in unused and operated heat-not-burn tobacco products and conventional cigarettes. *Chemosphere*, *335*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139050>
- TerraCycle. (2022). Retrieved 2023-10-18, from <https://www.terracycle.com/en-US/brigades/cigarette-waste-recycling>
- Thompson, D., Perera, K., & London, R. (1995). Quinone Methide Formation from Para Isomers of Methylphenol (Cresol), Ethylphenol, and Isopropylphenol: Relationship to Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, *8*(1), 55-60. <https://doi.org/10.1021/tx00043a007>
- Ullmann, R., Gerhartz, W., & Yamamoto, s. (2000). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Waddell, W. (1993). The Science of Toxicology and Its Relevance to MCS. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *18*(1), 13-22. <https://doi.org/10.1006/rtph.1993.1040>

Wagner, M., & Lambert, S. (eds.). (2018). *Freshwater Microplastics*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5>

Wilson, D., & Velis, C. (2015). Waste management – still a global challenge in the 21st century: An evidence-based call for action. *Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy*, 33(12), 1049-1051. <https://doi.org/10.1177/0734242X15616055>

Xing, W., Huang, W., & Liu, G. (2008). Effect of excess iron and copper on physiology of aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. *Environmental Toxicology*, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/tox.20480>

Zachariassen, K., Aunaas, T., Børseth, J., Einarson, S., Nordtug, T., Olsen, A., & Skjervø, G. (1991). Physiological parameters in ecotoxicology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100(1-2), 77-79. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90126-E](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90126-E)

Seznam obrázků a tabulek:

Obrázek 5: Spirodela polyrhiza (Navrátilová, J. (2005). Spirodela polyrhiza: Třeboň (okr. Jindřichův Hradec), NPR Stará řeka. In *Pladias.cz*.

<https://pladias.cz/taxon/pictures/Spirodela%20polyrhiza#image1>)

Obrázek 6: Strukturní vzorec celulózy (Slejška, A. (2005). Strukturní vzorec celulózy. https://r.fld.czu.cz/vyzkum/nauka_o_lp/chemie/celuloza.jpg)

Obrázek 7: Roztoky z elektronických (vlevo) a klasických nedopalků (vpravo), (foto autor práce)

Obrázek 8: Více jamková kultivační destička (foto, autor práce)

Tabulka 2: chemické složení Steinbergova činidla (*DUCKWEED TOXKIT F. Growth inhibition microbiotest with Spirodela polyrhiza STANDARD OPERATING PROCEDURE. Online. 2022, s. 1-32. Dostupné z: <https://www.microbiotests.com/>. [cit. 2024-03-27]*)

Graf 3: Globální rozložení litteru v mořských ekosystémech (vlastní zpracování dat dle Hahladakis, J. (2020). Delineating the global plastic marine litter challenge: clarifying the misconceptions. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(5). <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8202-9>)

Graf 4: závislost inhibice růstu na koncentraci polutantu (vlastní zpracování)

Graf 3: průběrný nárůst biomasy u testu ze dne 18.12.2022 (vlastní zpracování)

Graf 4: závislost inhibice růstu na koncentraci polutantu (vlastní zpracování)

Graf 5: průměrný nárůst biomasy u testu ze dne 17.11.2022 (vlastní zpracování)

Graf 6: množství chlorofylu v závislosti na množství cigaretového výluhu v roztoku (vlastní zpracování)

Graf 7: množství chlorofylu v závislosti na množství cigaretového výluhu v roztoku (vlastní zpracování)