

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

Katedra aplikované ekologie

Diplomová práce

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

Diplomant: Bc. et Bc. Marie Válová

2021

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Marie Válová

Inženýrská ekologie
Ochrana přírody

Název práce

Ekotoxikologické aspekty přítomnosti mikroplastů ve vodním prostředí

Název anglicky

Ecotoxicological aspects of microplastics presence in aquatic environment

Cíle práce

Cílem práce je zhodnocení ekotoxikologických rizik výskytu mikroplastů ve sladkovodním vodním prostředí. Rešeršní část práce bude zaměřena zejména na definici mikroplastů, jejich typy a možná rizika pro ekosystémy, dále na dostupné analytické metody jejich stanovení a metody sledování jejich ekotoxicity. Praktická část práce bude realizována na vybraných druzích sladkovodních organismů, které budou vystaveny expozici mikroplastů.

Metodika

Diplomová práce má charakter studie. Metodicky půjde o vytvoření aktuálního literárního přehledu z oblasti mikroplastů a praktickou zkoušku jejich ekotoxikologického účinku na vybraných organismech. Testy budou prováděny v souladu s příslušnými ČSN.

Doporučený rozsah práce

cca 80 stran textu a 10 stran příloh

Klíčová slova

mikroplasty, vody, sladkovodní, riziko, organismus, ekotoxicita, životní prostředí

Doporučené zdroje informací

- Dandová, K., 2019: Hodnocení ekotoxicity odpadů. Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta životního prostředí, Praha, 57 s (bakalářská práce).
- Jemec Kokalj, A. a kol., 2018: Screening study of four environmentally relevant microplastic pollutants: Uptake and effect on *Daphnia magna* and *Artemia franciscana*. *Chemosphere* 208, 522-529.
- Lambert, S. a kol., 2017: Ecotoxicity testing of microplastics: Considering the heterogeneity of physicochemical properties. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 13, 470-475.
- Pivokonsky, M. a kol., 2018: Occurrence of microplastics in raw and treated drinking water. *Sci. Total Environ.* 643, 1644-1651.
- Prata, J.C. a kol., 2019: A new approach for routine quantification of microplastic using Nile Red and automated software (MP-VAT). *Sci. Total Environ.* 690, 1277-1283.
- Silva, A.B. a kol., 2017: Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry – a review. *Anal. Chim. Acta* 1017, 1-19.
-

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Lenka Wimmerová, MSc., Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra aplikované ekologie

Elektronicky schváleno dne 2. 2. 2021

prof. Ing. Jan Vymazal, CSc.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 10. 2. 2021

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 14. 03. 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou/závěrečnou práci na téma: Ekotoxikologické aspekty přítomnosti mikroplastů ve vodním prostředí vypracovala samostatně a citovala jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použila a které jsem rovněž uvedla na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

Jsem si vědoma, že na moji diplomovou 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 vědoma, že odevzdáním diplomové 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:

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Lence Wimmerové, MSc., Ph.D. za odborné vedení, konzultace, trpělivost a vlídnost při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině, partnerovi a synovi, kteří mi byli během celého mého studia velkou oporou.

Abstrakt

Mikroplasty jsou nyní již všudypřítomnou součástí životního prostředí. Ať už jsou primárně produkovány pro různé účely, nebo vznikají sekundárně z rozkladu plastových výrobků, jedná se významnou a zatím ne příliš prozkoumanou oblast, která může představovat riziko pro různé trofické úrovně. Mikroplasty jsou také velice různorodé, lze hodnotit jejich druh, tvar, velikost, schopnost adsorpce aj. a všechny tyto faktory ovlivňují jejich chování a osud v životním prostředí.

Výzkum realizovaný v této práci byl zaměřen na využití ekotoxikologických testů k zjištění toxicity vybraných mikroplastů. Jednalo se o polyesterová vlákna délky do 5 mm, které byla barvena fluorescenčním barvivem Nile Red a komerčně prodávané fluorescenční částice směsného polymeru kulovitého tvaru velikosti 1-5 μm . Testy byly prováděny na zkušebních organismech *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* a *Thamnocephalus platyurus*. Pro srovnání byly provedeny zkoušky rovněž na semenech *Sinapis alba* a externě akreditovanou laboratoří na mořské bakterii *Aliivibrio fischeri*. Dále se praktická část práce zaměřila na viditelné potvrzení a možnosti zobrazení přítomnosti mikroplastů uvnitř trávicího ústrojí zkoumaných organismů, a to díky jejich fluorescenčním vlastnostem a použití UV světla o vlnové délce 375-395 nm.

Dosažené výsledky neprokázaly toxicitu u žádného z použitých mikroplastů, a to ani v případě viditelného pozření mikroplastů testovaným organismem. V rámci experimentů nebyla prokázána akutní ani chronická toxicita. Nicméně v chronických testech na dafních bylo možné sledovat zvýšený nárůst jejich početnosti ve vodním prostředí s mikroplastovými částicemi.

Klíčová slova

Mikroplasty, vody, sladkovodní, riziko, organismus, ekotoxicita, životní prostředí.

Abstract

Microplastics are now a ubiquitous part of the environment. Whether they are primarily produced for many purposes or arise secondarily from the decomposition of plastic products, this is an important and not yet very explored area that can pose a risk to different trophic levels. Microplastics are also very diverse, their type, shape, size, adsorption capacity, etc. can be evaluated, and all these factors influence their behaviour and fate in the environment.

The research carried out in this work was focused on the use of ecotoxicological tests to determine the toxicity of selected microplastics. These were polyester fibers up to 5 mm in length, which were dyed with the fluorescent dye Nile Red and commercially sold fluorescent particles of a mixed polymer of spherical shape with the size of 1-5 μm . The tests were performed on the test organisms *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* and *Thamnocephalus platyurus*. For comparison, tests were also performed on *Sinapis alba* seeds and an externally accredited laboratory for the marine bacteria *Aliivibrio fischeri*. Furthermore, the practical part of the work focused on the visible confirmation and the possibility of displaying the presence of microplastics within the digestive tract of the studied organisms, thanks to their fluorescent properties and the use of UV light at a wavelength of 375-395 nm.

The results obtained did not show toxicity for any of the microplastics used, even in the case of visible ingestion of the microplastics by the tested organism. No acute or chronic toxicity was measured in the experiments. Nevertheless, in the chronic tests on daphnia was observed the increased number of their abundance in an aqueous environment with microplastic particles.

Keywords

Microplastics, water, freshwater, risk, organism, ecotoxicity, environment.

Obsah

1. Úvod.....	12
2. Cíle práce	13
3. Literární rešerše:	14
3.1. Mikroplasty	14
3.2. Ekotoxicita mikroplastů	17
3.2.1. Ekotoxikologie:	17
3.2.2. Možná rizika pro životní prostředí a člověka.....	18
3.2.3. Metody stanovení mikroplastů.....	20
3.2.4. Metody sledování ekotoxicity	23
3.2.5. Indexy ekotoxicity.....	24
3.2.6. Standardizace testů ekotoxicity.....	25
3.2.7. Testy ekotoxicity	25
3.2.8. Ve výzkumu testované organismy	27
4. Metodika	30
4.1. Použité přístroje a laboratorní materiál:.....	30
4.3. Příprava jedinců <i>Daphnia pulex</i>	33
4.4. Příprava jedinců <i>Thamnocephalus platyurus</i>	33
4.5. Příprava živného roztoku pro testování	35
4.6. Příprava polyesterových vláken	35
4.7. Příprava FMB částic	36
4.8. Metodika testu.....	36
4.9. Test na semenech <i>Sinapis alba</i>	37
4.10. Test na bakteriích <i>Aliivibrio fischeri</i>	39
4.11. Vizualizace výsledků	39
4.12. Vizualizace na filtrech	40
4.13. Hypotézy práce	40
5. Výsledky	41
5.1. Výsledky akutních testů:.....	41
5.1.1. <i>Thamnocephalus platyurus</i> :	41
5.2. Výsledky chronických testů:.....	45
5.2.1. <i>Daphnia magna</i> :	45
5.2.2. <i>Daphnia pulex</i> :	49
5.3. Výsledky srovnávacích testů.....	53
5.3.1. <i>Sinapis alba</i>	53

5.3.2. <i>Aliivibrio fischeri</i> :	55
5.4. Výsledky v porovnání mezi jednotlivými organismy	55
5.5. Zobrazení výsledků na filtrech.....	56
6. Diskuze	57
7. Závěr a přínos práce.....	61
8. Přehled literatury a použitých zdrojů.....	62
9. Seznam obrázků, tabulek a grafů	68

Seznam zkratek

- ASTM – Americká společnost pro testování a materiály (*American Society for Testing and Materials*)
- ATR – Zeslabená úplná reflektance (*Attenuated Total Reflectance*)
- BPA – Bisfenol A (*Bisphenol A*)
- CEN – Evropský výbor pro normalizaci (*European Committee for Standardization*)
- EC₅₀ – Účinná koncentrace, odezva u 50 % organismů, úhyn, změna chování (*Effective Concentration*)
- FTIR – Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)
- IC₅₀ – Inhibiční koncentrace, inhibice u 50 % organismů (*Inhibitory Concentration*)
- ISO - Mezinárodní organizace pro normalizaci (*International Organization for Standardization*)
- LC₅₀ – Letální koncentrace při které dochází k úhynu 50 % organismů ve vzorku, plyn a kapaliny (*Lethal Concentration*)
- LD₅₀ – Letální dávka při které dochází k úhynu 50 % organismů ve vzorku, pevné vzorky (*Lethal Dose*)
- LOAEL –Nejnižší dávka, kdy již je pozorovatelný vliv látky na organismus (*Lowest Observed Adverse Effect Level*)
- NOAEL –Nejvyšší dávka, kdy ještě není pozorovatelný vliv látky na organismus (*No Observed Adverse Effect Level*)
- OECD – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (*Organization for Economic Cooperation and Development*)
- PE – polyethylen
- PFE – Fluidní extrakce podporovaná tlakem (*Pressurized Fluid Extraction*)

- PP – polypropylen
- py-GC/MS – Pyrolýzní plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (*Pyrolysis–Gas Chromatography–Mass Spectrometry*)
- SWF – standardní sladká voda (*Standard Freshwater*)PET – polyethylentereftalát
- U.S. EPA – Agentura pro ochranu životního prostředí USA (*United States Environmental Protection Agency*)
- UV – ultrafialový (*ultraviolet*)

1. Úvod

Během posledních několika desetiletí se kontaminace plasty stala hlavním objektem znepokojení mezi vědci, politiky a veřejností. Světová produkce plastů překonala v roce 2016 hranici 320 milionů tun (PlasticsEurope, ©2016). Tento materiál výrazně přispívá ke vzniku odpadu a odhadem 5 až 13 tun ročně skončí v oceánech (World Economic Forum, ©2016). Na takto vzniklý, ať už vodní nebo suchozemský plastový odpad působí degradační procesy, sluneční záření, mechanické síly, mikroorganismy, které se podílí na rozkladu a fragmentaci těchto materiálů až do vzniku mikroplastů. Mikroplasty ale nemusí nutně vznikat degradací, velké množství je produkováno záměrně například v kosmetickém průmyslu (Costa et al., 2017). Zároveň často nedochází k jejich úplnému rozkladu, hromadí se tak ve všech ekosystémech, potravních řetězcích, samotných potravinách a pitné vodě (Echa.Europa, ©2021). Jejich pohyb a dostupnost v životním prostředí je také ovlivněna jejich chemickými a fyzickými vlastnostmi, jako jsou druh plastu, velikost a tvar (Rocha-Santos et Duarte, 2015).

Výzkum mikroplastů tak cílí hlavně na sledování jejich osudu v životním prostředí, ekotoxicitu, sorpci, způsoby jejich odstranění a omezení produkce. Vytvoření vhodné metodiky pro studium mikroplastů a jejich ekotoxicity je jedním z faktorů pro získání směrodatných informací o možných rizicích těchto látek, nejen pro životní prostředí, ale i pro člověka.

2. Cíle práce

Cílem diplomové práce bylo zhodnocení ekotoxikologických rizik výskytu mikroplastů ve sladkovodním vodním prostředí. V rešeršní části práce byly popsány a definovány mikroplasty, byla nastíněna možná rizika jejich působení pro ekosystémy a byly zhodnoceny dostupné analytické metody stanovení mikroplastů a jejich ekotoxicity. V praktické části práce pak za pomoci testů bylo provedeno hodnocení ekotoxicity vybraných dvou mikroplastů, a to jejich expozicí na vybrané sladkovodní druhy organismů. Pro srovnání byl proveden rovněž test klíčivosti na semenech vyšších rostlin a na standardizovaném mořském organismu.

3. Literární rešerše:

3.1. Mikroplasty

Plasty, z řeckého „*plastikos*“ - tvárný/vhodný pro lití, jsou tvárné, plastické syntetické a polysyntetické materiály (Plastics Europe, ©2018). Jedná se o polymery, ve své podstatě tvrdé až křehké (Běhálek, 2016). Plasty můžeme primárně rozdělit na termoplasty a reaktoplasty dle možnosti jejich tepelného zpracování. Termoplasty je možné opětovně zahřát a tvarovat, reaktoplasty nikoliv. Výroba plastů je stále rostoucím celosvětovým trendem. V roce 2018 to bylo světově 359 milionů tun a v roce 2019 již 368 milionů tun plastu (Plastics Europe, ©2020).

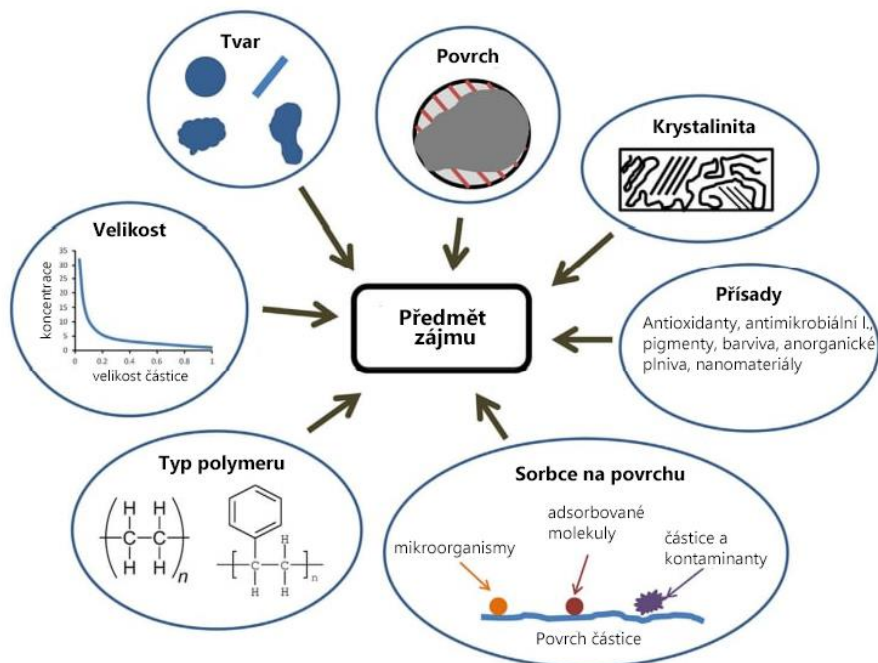
Velikost plastových částic můžeme rozdělit do 4 kategorií (Wagner et al., 2014):

- Makroplasty (>25 mm)
- Mesoplasty (5–25 mm)
- Mikroplasty (20 µm–5 mm)
- Nanoplasty (< 20 µm)

Dle vzniku jsou mikroplasty děleny na primární a sekundární (Auta et al., 2017; Wagner et al., 2014). Primární, tedy uměle vyráběné mikročástice záměrně přidávané do výrobků jako jsou hnojiva, přípravky na ochranu rostlin, kosmetika, detergenty, čisticí prostředky, barvy, měkký výplňový materiál k umělému trávníku a výrobky používané v ropném a plynárenském průmyslu. Použití těchto mikroplastů je hlavně ve formě abraziv (exfoliační a leštící mikročástice v kosmetice). Další funkcí může být i regulace hustoty a stability výrobku. Stále více se využívají i jako třpytky a součásti líčidel. K těmto účelům se v Evropě využije okolo 145 tisíc tun mikroplastů (Echa.Europa, ©2021).

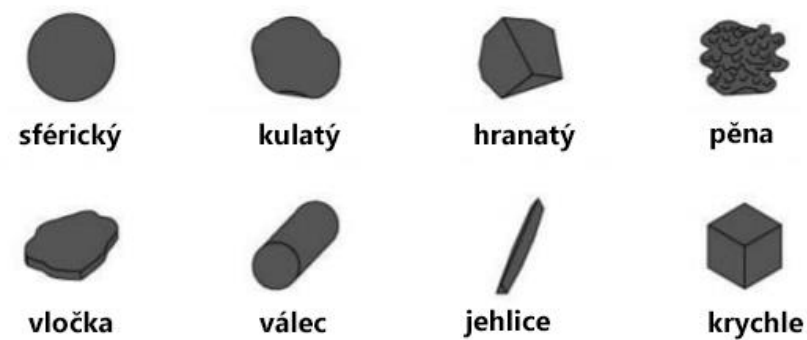
Druhým zástupcem jsou pak sekundární mikroplasty vzniklé degradací z makroplastů (biotickou i abiotickou), mechanickým narušením, působením UV záření, narušením mikroorganismy apod. (Auta et al., 2017; Wagner et al., 2014).

Mikroplasty jsou množinou proměnných, které se výrazně projevují na jejich chování a osudu v prostředí (Lambert et al., 2017).

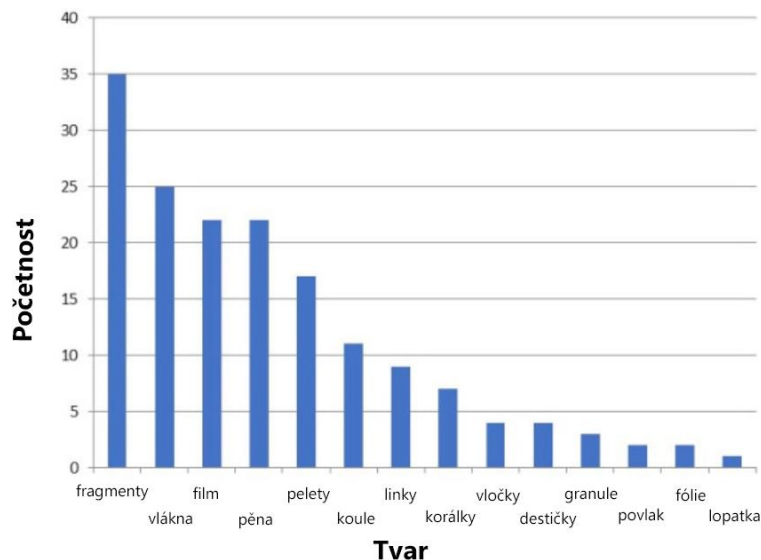


Obr.č. 1: Faktory vstupující do předmětu zájmu při studiu mikroplastů (Lambert et al. 2017; upraveno autorkou práce)

Mikroplasty můžeme v rámci výzkumu rozdělit dle tvaru na fragmenty, částice, vlákna, pěny, pelety, koule, vločka, granule a fólie (Koelmans et al., 2019).

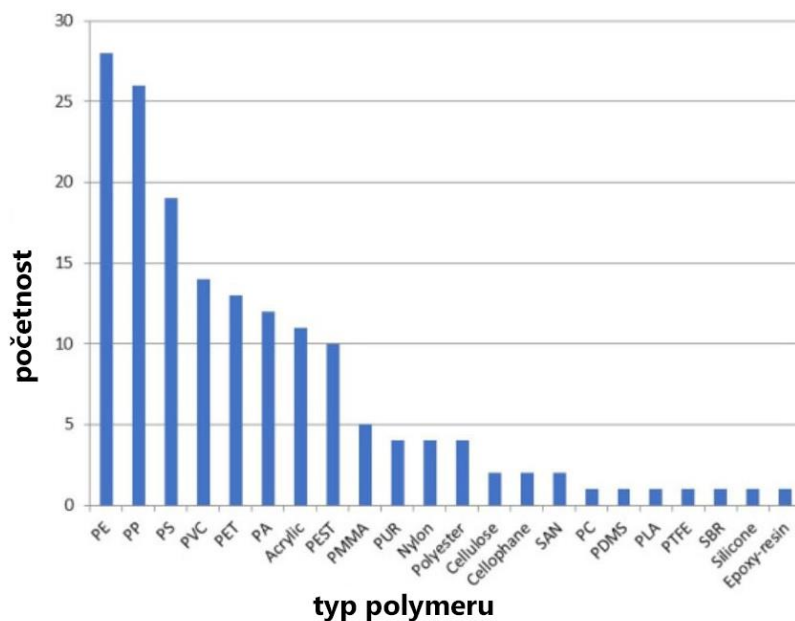


Obr.č. 2: Tvary mikroplastů (Vollertsen, ©2016-2020; upraveno autorkou práce)



Obr.č. 3: Tvary mikroplastů a jejich početnost v 55 publikovaných studiích (Koelmans et al. 2019; upraveno autorkou práce)

Stejně tak může být pro výzkum signifikantní druh mikroplastu. Jedná-li se například o polyethylen (HDPE, LDPE), polyethylen tereftalát (PET), polypropylen (PP), polystyren (PS) či polyvinylchlorid (PVC) (Bílková, 2015). Tyto faktory mohou mít důležitý vliv na chování mikroplastů v biotě.



Obr.č. 4: Typy mikroplastů a jejich početnost v 55 publikovaných studiích (Koelmans et al. 2019; upraveno autorkou práce)

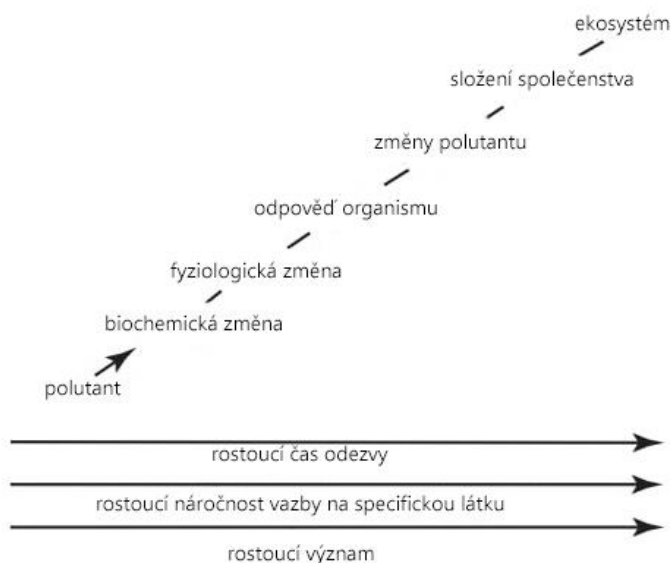
3.2. Ekotoxicita mikroplastů

3.2.1. Ekotoxikologie:

Ekotoxikologie je vědním oborem propojujícím ekologii a toxikologii. Tento termín byl poprvé definován v 60 letech 20. století (Truhaut, 1997). Do této doby se toxikologie zaměřovala hlavně na škodlivé účinky chemických látek na člověka. Vznik tohoto vědního oboru byl odrazem rostoucích obav z účinků těchto látek také na životní prostředí (Newman, 2010). Ekotoxikologie se tedy zabývá pozorováním morfologických změn, změn chování, imobilizace, či zhoršené reprodukci nebo úhynu studovaných organismů. Stejně tak se může zaměřovat na funkční vztahy na úrovni populací, společenstev a ekosystémů (Anděl, 2011).

Tlak na vznik vědního oboru nastal z důvodu průmyslové revoluce v 50. letech 19. století, kdy velké množství polutantů unikajících do ovzduší, ale i do vodního prostředí, působily nevratné změny na životním prostředí (Hoffman, 2003).

Ekotoxikologie je syntetická věda, která spojuje poznatky a metody z mnoha disciplín. Otázky týkající se účinku jsou kladeny na molekulární úrovni, ale i mezi jednotlivými složkami životního prostředí a na biosférické úrovni. Stejně tak ekotoxikologie řeší i otázku osudu chemických látek a jejich možný transport v prostředí (Newman, 2010).

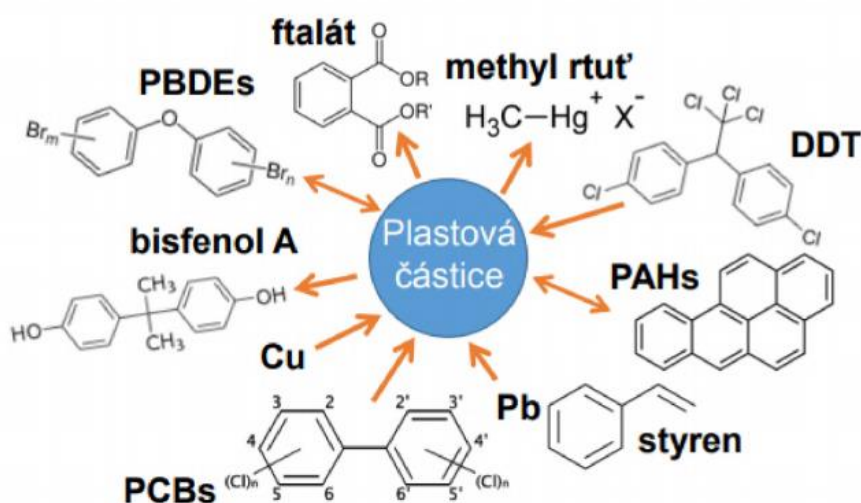


Obr.č. 5: Schéma vazeb mezi odpověďmi na různých organizačních úrovních (Newman, 2010; upraveno autorkou práce)

3.2.2. Možná rizika pro životní prostředí a člověka

S růstem množství mikroplastových částic v prostředí se dá předpokládat i jejich působení na ekosystémy, organismy a člověka (Wang et al., 2019). Ekotoxické působení mikroplastů zatím není zcela objasněno. Problémem zůstává variabilita na úrovni chemických a fyzikálních vlastností částic (Judy et al., 2019). Přestože jejich toxicita není prokázána, jsou většinou chápány jako kontaminanty. Jednak z důvodu jejich vlastního působení, tak i možnou vazbou dalších látek, které mohou působit ekotoxicky (Pivokonsky et al., 2018). Jejich malá velikost umožňuje jejich absorbování biotou a přímou účast a kumulaci v potravinovém řetězci (Rillig, 2012).

Velmi riziková vlastnost mikroplastů je jejich schopnost vázat na svůj povrch jiné látky. Tyto látky mohou být na částice absorbovány i záměrně během výroby, z důvodu barvení, změny tvrdosti, odolnosti a podobně (Li et al., 2018). Mezi tyto aditiva patří například tepelné a světelné stabilizátory, barviva, maziva, změkčovadla, antistatika, nadouvadla, retardéry hoření a plniva. Mezi těmito látkami najdeme i výrazně negativně působící ftaláty a Bisfenol A (BPA).



Obr.č. 6: Potenciální možnost vazby škodlivých perzistentních látek na mikroplasty (Pivokonský, 2018).

Mikroplasty se vyskytují ve většině vodních zdrojů. Běžně je můžeme nalézt v mořské i sladkovodní vodě, vodě povrchové i vodě pitné. Množství mikroplastů na m^3 se pohybuje od 1×10^{-2} do 10^8 částic (Koelmans et al. 2019). Často se jedná o fragmenty, v menší míře pak vlákna. V jednom výzkumu můžeme sledovat až 12

detekovaných druhů mikroplastů, v největší míře PET (polyethylentereftalát), PP (polypropylen) a PE (polyethylen) (Pivokonský, 2018). Biodostupnost mikroplastů ve vodním prostředí udává jejich přítomnost v různých výškách vodního sloupce. Mikroplasty s nižší hustotou budou vstupovat do potravních řetězců planktonofágu, oproti částicím s vyšší hustotou, které se budou vyskytovat na dně a v sedimentech a budou potravou pro detritofágy (Wright et al., 2013). Stejně tak mohou mikroplasty působit jako atraktivní vektor pro různé druhy organismů, bakterií, řas a patogenů, a přenášet tak i invazivní druhy (Derraik, 2002). Pozření mikroplastů vodními organismy může mít různé účinky. Může způsobovat poranění vnitřních orgánů, stres, celkové snížení fitness, až úhyn (Eerkes-Medrano et al., 2015).

Neprobádanou oblastí zůstává terestrické prostředí, u kterého se předpokládá kontaminace 4 – 23 x vyšší nežli je v oceánu a to hlavně na zemědělské půdě (Fuller et Gautam, 2016). Z důvodu nedostatku světla a kyslíku mohou v půdním prostředí mikroplasty setrvávat i více než 100 let (de Souza Machado et al., 2018).

V dnešní době není možné se expozici mikroplastů vyhnout. Do lidského těla se mikroplasty dostávají inhalačně nebo požitím, a to ať už vody nebo potravin. Množství, které takto vstupuje do organismu, není možné dostatečně dobře odhadnout, odhaduje se ale na 74-121 tisíc požitých částic (Cox et al., 2019).

Jak už bylo řečeno, mikroplasty se běžně vyskytují v různých tvarech, velikostech a materiálech. Tyto faktory společně s dalšími proměnnými (elektrický potenciál, množství, stáří) rozhodují o možných expozičních cestách a působení v organismu.

Mikroplastové částice mohou působit poranění dýchací a trávicí soustavy. Zvláště malé částice jsou schopny procházet buněčnou membránou, hematoencefalickou bariérou, nebo lidskou placentou (Vethaak et Leslie, 2016). Vnik mikročástic inhalací je z velké části omezen obrannými mechanismy. Částice o určité frakci (PM_{2,5} a PM_{1,0} - do 2,5, resp. do 1,0 μm) i přes to mohou ve formě prашného aerosolu pronikat až do alveolů a působit zdravotní potíže (Prata, 2018).

Při pozření mikročástic orálně, stejně jako u inhalace, do velké míry závisí na velikosti a množství částic. Většina částic prochází trávicím ústrojím beze změny. Jen malé množství zůstává deponováno, stejně jako jiné nerozpustné anorganické látky, v buňkách střevního epitelu. Předpokládají se dvě možné cesty vstřebání a to

endocytózou, prostřednictvím M buněk v Peyerových plátech, nebo parabuněčnou persorpcí. Následně se částice přes žluč navrací do střeva, případně se dostávají do krevního oběhu a jsou vylučovány stolicí a močí. Tento proces je více méně krátkodobý a nepředpokládá se degradace mikroplastových částic, stejně jako doposud nebyla zjištěna kumulace částic v trávicí soustavě.

Jsou známy účinky vdechnutí mikroplastů v pracovním prostředí s velkým množstvím částic ve vzduchu. Jedná se o provozy zpracovávající například syntetické textilie, kde byl zjištěn zvýšený výskyt kašle, dušnosti a dýchacích potíží. Na úrovni životního prostředí a běžné expozici člověka bohužel data chybí. Předpokládá se podobný účinek, jako má například prach. Tedy zánětlivá onemocnění dýchacích cest (akutní i chronické), snížená funkce plic, nepříznivý vliv na kardiovaskulární systém. Zatím není možné rozlišit vliv pouze mikroplastů bez prachových částic (Kožíšek et Kazmanová, 2019).

3.2.3 Metody stanovení mikroplastů

Výzkum mikroplastů

Při výzkumu mikroplastů a odběru vzorků je nutné dodržet pravidla pro co nejmenší možnou kontaminaci vzorků z vnějšího prostředí (oblečení výzkumníka, odběrová zařízení a jejich případné znečištění). Vždy je nutné mít připravený kontrolní vzorek, se kterým se manipuluje na dané lokalitě stejně jako s ostatními vzorky. Případně je možná kontrola postupu nakládání se vzorky za pomoci nepřímého slepého vzorku s již definovaným množstvím přidaného mikroplastového standardu, kdy sledujeme úbytek mikroplastů během procesu (Koelmans et al., 2019).

Detekce mikroplastů

Při studiu mikroplastů v životním prostředí je důležitá jejich detekce a kvalifikace. Způsobů studia a metodiky je velké množství, jejich cílem je separace částic ze směsného vzorku a jejich následná identifikace (Rocha-Santos et Duarte, 2015). Různé metody zajišťují různé výsledky a porovnání výsledků napříč výzkumy pak není možné (Van Cauwenberghe et al., 2015).

Metody separace

Pro separaci mikroplastových částic se používají metody podobné jako u sedimentů, tedy hustotní flotace, filtrace, elutriace nebo prosévání. Při oddělování

částic od matrice se využívá hlavně chemických a fyzikálních vlastností mikroplastů, jejich hustotě, velikosti, tvaru, elektrostatiky a rozměrům (Rocha-Santos et Duarte, 2015).

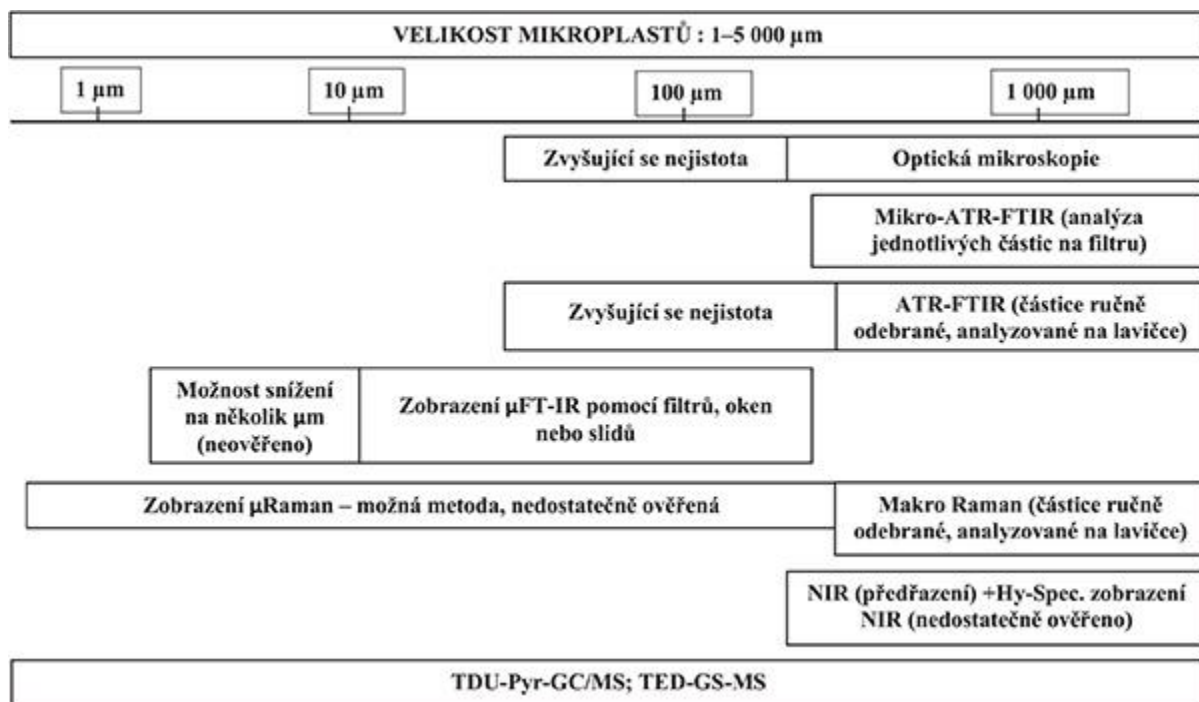
Základní metodou je tedy již zmíněná hustotní flotace, která je založena na rozdílnosti hustoty mikroplastů a sedimentů (Van Cauwenberge et al. 2015). K pevnému vzorku je přidán nasycený solný roztok (například NaCl, NaI, ZnCl₂), vzorek je protřepán, sediment se usadí na dně nádoby a v supernatantu zůstávají lehčí mikroplasty, které je následně možno snáze odebrat (Rocha-Santos et Duarte, 2015). Tato metoda nezachytí všechny mikroplasty ve vzorku a výsledky se výrazně liší i v závislosti na použitém druhu solného roztoku. Je tedy nutné opakování a kombinování což zvyšuje cenu a ekologickou zátěž testování.

Další možností separace je elutriace. Jedná se o proces, při kterém jsou prouděním kapaliny nebo plynu oddělovány částice dle své váhy (Claessens et al., 2013). Dále pak můžeme využít elektrostatických vlastností plastů. K tomu se využívá Korona-Walzen-Scheider elektrostatického odlučovače, například při třídění plastů od jiných materiálů (Felsing et al., 2018). Jako další metody je možné zmínit například vzduchovou flotaci (Zhou et al., 2018) nebo vysokotlakou extrakci za použití rozpouštědla - PFE (Fuller et Gautam, 2016).

Analytické metody

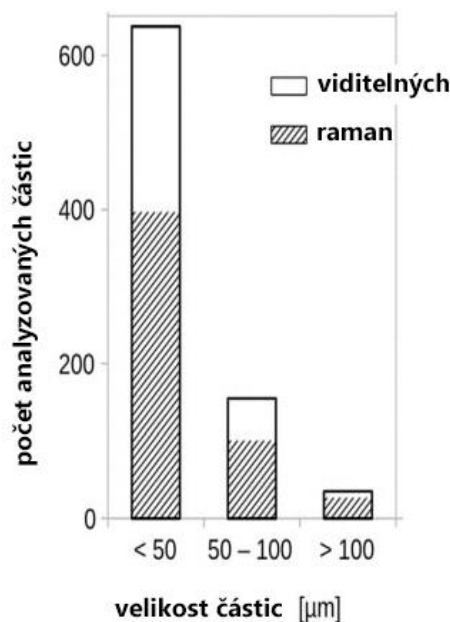
V současné době existuje několik analytických metod detekce mikroplastů. Monitoring za pomoci mikro-FTIR (Fourierovy transformační červené mikroskopie) v kombinaci s ATR (zeslabenou úplnou reflektancí) a Ramanovy mikroskopie. Dále je využívána py-GC/MS (pyrolýzní plynová chromatografie s hmotnostní detekcí). Tyto metody jsou schopny stanovit kvalitu/druh mikroplastu. Ke stanovení kvantity/počtu mikroplastů ve vzorku je možné využít barviva, jako je například bengálská červeně – Bengal Rose a v mém výzkumu použité fluorescenční barvivo Nile Red (Silva, 2018).

Faktorem pro výběr vhodné analytické metody je požadovaná velikost analyzovaných mikroplastů. Jak je ze schématu (Obr.č. 7) patrné, využíváme analýzy pomocí Ramanu a pyrolýzní plynové chromatografie pro částice <10 μm mikro-FTIR pro částice od 10 μm do 400 μm, FTIR-ATR pro částice >400 μm (Vollertsen, ©2016-2020).



Obr.č. 7: Závislost velikosti mikročástic a použité analytické metody (původní zdroj Vollertsen ©2016–2020; upraveno Wimmerová et al., 2020).

Jak ukazuje následující graf je vždy vhodné, pro zachycení co největšího množství částic ve vzorku, metody kombinovat.



Obr.č. 8: Porovnání mikroplastových částic zachycených vizuálně a Ramanovou spektrometrií k celkovému počtu a dle velikosti (Silva et al. 2017; upraveno autorkou práce)

3.2.4. Metody sledování ekotoxicity

Základním stavebním kamenem ekotoxikologie jako vědy je testování samotné ekotoxicity. To slouží jako hlavní indikátor působení studovaných látek na životní prostředí. Jedná se o experimentální metody, které hodnotí odpovědi organismů na expozici toxikantem. Dle použití je lze rozdělit na testy sledující toxické působení na člověka a na životní prostředí.

Testy toxicity známe již od počátku 17. století, ačkoliv byla aplikace látek prováděna na různých organizmech, rostlinách, zvířatech, hlavním cílem bylo výsledky využít pro člověka. Se vznikem ekotoxikologie byly vyvinuty také testy schopné pozorovat účinky na životní prostředí. Do předmětu zájmu se dostala i bioakumulace a biokoncentrace látek v tělech a tkáních organismů a její provázanost s potravními řetězci (Newman, 2010).

Biokoncentrace je proces akumulace látky z prostředí uvnitř bioty. Pro biokoncentraci vyhodnocujeme biokoncentrační faktor, ten je vyjádřen jako poměr mezi koncentrací chemické látky nalezené ve studované biotě a koncentrací látky nalezené ve vnějším prostředí (Jager et Hamers, 1997).

Biomagnifikace je vzrůst koncentrace látky v organismu, který je výsledkem konzumace kontaminované potravy. Stanovujeme ji biomagnifikačním faktorem, tedy poměrem látky v organismu ku její potravě.

Bioakumulace odpovídá vzrůstu koncentrace látky z příjmů a z eliminace organismů. Bioakumulační faktor určuje poměr koncentrace v organismu ku koncentraci v prostředí (Jager et Hamers, 1997).

Testy ekotoxicity lze dělit dle následujících kritérií:

Doba expozice:

Doba expozice označuje dobu působení látky na organismus. Testy tedy dělíme na akutní, subakutní a chronické.

Akutní hodnotí účinek po jednorázovém podání látky a doba trvání odpovídala přibližně 24 až 96 hodinám v závislosti na druhu organismu (Horák et al., 2012).

Subakutní testy nebo také subchronické vystavují organismus toxikantům opakovaně po dobu 28 až 90 dní. Dle těchto testů jsou stanovovány indexy ekotoxicity. Chronické testy slouží jako faktor hodnotící dlouhodobé působení látky. Takové testy mohou pokrývat celý životní cyklus organismu. U organismů se sledují hlavně růstové, reprodukční nebo genetické změny a odchylky od kontroly (Bláha, nedatováno).

Prostředí:

Pokud je vzorkem roztok nebo vodný výluh, používají se pro testy ekotoxicity akvatické testy s vodními živočichy (Kočí et Mocková, 2009). U pevných látek využíváme jejich směsi s půdou a následně pak půdních organismů (Hřibová, 2011).

Způsob vyhodnocení:

Při vyhodnocování testů můžeme sledovat různé faktory. Letální následek, tedy úmrtí jedinců vyhodnocujeme hlavně při akutních testech. Dále pak můžeme sledovat chování jedinců a jeho odchylky od kontroly. Inhibici růstu, tedy zpomalení nebo zastavení růstu hlavně u rostlin a řas. Reprodukce a rychlost rozmnožování při dlouhodobých testech a změny sledované na budoucích generacích, teratogenita, mutagenita a malformace, deformace a poškození plodu (Horák et al., 2012).

3.2.5. Indexy ekotoxicity

Pro kvantitativní charakteristiku účinků látek na organismy používáme výstupy těchto testů nazývané jako ekotoxikologické indexy. Ekotoxikologické indexy slouží pro porovnání, hodnocení a třídění do tříd dle nebezpečnosti látek. Lze je rozdělit na indexy vypočtené (LC_{50} , LD_{50} , EC_{50} apod.), nebo určené (NOEC, LOEC) (Anděl, 2011). Indexy rozdělujeme pro akutní a chronické testy. Pro akutní ekotoxicitu stanovujeme:

- LD_{50} – Letální dávka při které dochází k úhynu 50 % organismů ve vzorku (pevné vzorky),
- LC_{50} - Letální koncentrace při které dochází k úhynu 50 % organismů ve vzorku (plyn a kapaliny),
- EC_{50} – Účinná koncentrace, odezva u 50 % organismů (úhyn, změna chování),
- IC_{50} – Inhibiční koncentrace, inhibice u 50 % organismů.

Pro chronické (a subchronické) testy stanovujeme indexy:

- NOAEL –Nejvyšší dávka, kdy ještě není pozorovatelný vliv látky na organismus (*No Observed Adverse Effect Level*),
- LOAEL –Nejnižší dávka, kdy již je pozorovatelný vliv látky na organismus (*Lowest Observed Adverse Effect Level*).

Vliv = změna chování, inhibice růstu, úhyn (Horák, 2012).

3.2.6. Standardizace testů ekotoxicity

Pro kontrolu a porovnání výsledků testů mezi sebou je nutná jejich standardizace. Tedy testování za dodržení stejných podmínek v každém z případů. Díky tomu získáme objektivní výsledky a výzkum zůstane reprodukovatelný. Pro standardizace využíváme dané normy, ty stanovují složení, aplikaci, parametry pro testovací organismus, provedení testu a jeho trvání, i vyhodnocení (Anděl, 2011).

Oficiální normy jsou uváděny na úrovni mezinárodních organizací:

- OECD – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (*Organization for Economic Cooperation and Development*)
- ISO - Mezinárodní organizace pro normalizaci (*International Organization for Standardization*)
- CEN – Evropský výbor pro normalizaci (*European Committee for Standardization*)
- ASTM – Americká společnost pro testování a materiály (*American Society for Testing and Materials*)
- U.S. EPA – Agentura pro ochranu životního prostředí USA (*United States Environmental Protection Agency*) (Dandová, 2019).

3.2.7. Testy ekotoxicity

Dle vyhlášky 8/2021 Sb., o Katalogu odpadů a posuzování vlastností odpadů, se vlastnost odpadu H 14 - Ekotoxicita posuzuje provedením zkoušky, při které se jako

ekotoxický hodnotí odpad, u kterého dojde k překročení limitních hodnot uvedených v Tab.č. 1 a to alespoň pro jeden zkušební organismus. Pro porovnání těchto výsledků se nezohledňuje nejistota měření.

Tab.č. 1: Požadavky na výsledky zkoušek ekotoxicity (vyhláška 8/2021 Sb.).

Zkušební organismus	Doba působení	Limitní hodnoty
Bakterie <i>Aliivibrio fischeri</i>	15 minut a 30 minut	neprokáže se ve zkoušce inhibice světelné emise bakterií větší než 50 % při expozici 15 minut ani při expozici 30 minut
Perloočka <i>Daphnia magna</i> Straus	48 hodin	procento imobilizace perlooček nesmí ve zkoušce přesáhnout 50 %
Řasa <i>Desmodesmus subspicatus</i>	72 hodin	neprokáže se ve zkoušce inhibice nebo stimulace růstu řas větší než 50 % ve srovnání s kontrolou
Salát <i>Lactuca sativa</i>	120 hodin	neprokáže se ve zkoušce inhibice nebo stimulace růstu kořene salátu větší než 50 % ve srovnání s kontrolou

Provádění samotné zkoušky ekotoxicity je dáno přílohou č. 3 k této vyhlášce. Zkušební metody jsou uvedeny v následujících technických předpisech:

- Bakterie *Aliivibrio fischeri* – ČSN EN ISO 11348-2 (757734) – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) . část 2: Metoda se sušenými bakteriemi.
- Perloočka *Daphnia magna* Straus - ČSN EN ISO 6341 (757751) – Kvalita vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity.
- Řasa *Desmodesmus subspicatus* – ČSN EN ISO 8692 (757740) Kvalita vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas.
- Salát *Lactuca sativa* – ČSN EN ISO 11269-1 (836446) Kvalita půdy – Stanovení účinků znečišťujících látek na půdní flóru – Část 1: Metoda měření inhibice růstu kořene.

Po dobu 3 let ode dne nabytí účinnosti této vyhlášky mohou být používány pro hodnocení ekotoxicity ještě další organismy stanovené dle předchozí právní úpravy (Vyhláška 94/2016 Sb.). Těmito organismy je ryba *Poecilia reticulata* nebo

Brachydanio retio (96h, LC50 ≤ 10ml.l-1) a semeno *Sinapis alba* (IC50 ≤ 10ml.l-1). Dále pak platí i limitní hodnoty pro *Aliivibrio fischeri*, *Daphnia magna* a *Desmodesmus subspicatus* více než 20% a u *Lactuca sativa* více než 30%.

Pro zjednodušení prováděných testů je možné zakoupit již připravené kity, které odpovídají nárokům a normám. Těmi jsou například DAPHTOXKIT F magna (*Daphnia magna*), RAPIDOTOXKIT (*Thamnocephalus platyurus*) nebo PHYTOTOXKIT (*Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum*, *Sinapis alba*).

3.2.8. Ve výzkumu testované organismy

Perloočky (*Cladocera*)

Perloočky jsou sladkovodní, převážně sladkovodní ale i mořští živočichové tvořící hlavní složku zooplanktonu. Dosahují velikosti do 6 mm. Pohybují se volně v celém vodním sloupci, i benticky u dna. Jako hlavní složku potravy využívají převážně fytoplankton, působí jako filtr a výrazně tak ovlivňují čistotu vody. Jsou známy i dravé formy perlooček, živících se vířníky a nálevníky (Spieker, 2004). Jsou důležitou součástí potravního řetězce ve vodních ekosystémech.

Tělo perlooček se skládá z hlavy, trupu a zadečku. Na hlavě jsou patrné složené oči případně naupliové oko a dva páry antén, sloužící k pohybu. Někteří zástupci mají různé dlouhé trny na hlavě nebo na zadečku. Takový trn slouží většinou k rychlejšímu pohybu jedinců. Tělo perlooček je kryto průhledným, nebo lehce zabarveným chitinovým krunýřem. Uvnitř krunýře se nachází krátké nožičky (Suthers et al., 2019).

Průhlednost těla zajišťuje dobrou viditelnost jednotlivých orgánů. Srdce, střeva, vajíčka a i čerstvě narození jedinci podobní dospělcům a dobře pozorovatelní pod mikroskopem. Mezi hlavní determinační znaky patří zatočení střeva. Na zadečkovém konci se nachází zasunovatelný postabdomen (vidlice s drápky a trny). Rozmnožování probíhá převážně partnerogenezí, méně často dochází k oplození a vzniku vajíček s pevným pouzdem ephippium/epifitu, zimního vajíčka schopného přežít nepříznivé podmínky prostředí. Epifity jsou neprůhledné a obsahují dvě vajíčka (Segers, 2004).

Daphnia magna (Straus, 1820)

Prvním zástupcem z řádu perlooček je *Daphnia magna*, česky hrotnatka velká. Jedná se o organismus testovaný dle standardů ČSN EN ISO 6341 a OECD 202. Testování je založeno na stanovení LC₅₀ a EC₅₀ po 24 nebo 48 hodinách. *Daphnia magna* je běžným sladkovodním druhem korýše, velmi dobře se kultivuje, je citlivý na výskyt toxických látek ve vodním prostředí a ve stojatých vodách plní funkci konzumenta řas a potravy pro ryby (Koláček, 2015).

Daphnia pulex (Leydig, 1860)

Druhým zástupcem perlooček použitým ve výzkumu je *Daphnia pulex*, hrotnatka obecná. Jedná se o velice běžný druh podobný *Daphnia magna*, od které se dá rozlišit v přirozeném prostředí menší velikostí, začervenalým zbarvením a kratším ostnem v zadečkové části (rybicky.net, ©2021).

Thamnocephalus platyurus (Packard, 1877)

Thamnocephalus platyurus je korýš z řádu žábbronožek. Pro tento druh je typický jejich výskyt na stanovištích s vysokou alkalitou, ve stojatých vodách Severní Ameriky a Mexika. Dospělí jedinec může dosahovat velikosti až 5 cm (Sládeček et al., 1997). Pro testování toxicity se využívají larvální stádia (nauplia). Jedinci nemají krunýř, jejich lupenité nohy slouží jednak k pohybu, tak i k dýchání a filtraci potravy (Sedlák, 2002). Pro tento organismus se dle normy ČSN ISO 14380 se zjišťuje mortalita a stanovuje LC₅₀ (Fargašová, 2009).

Sinapis alba L.

Před novelizací vyhlášky 8/2021 Sb. byla zástupcem vyšších rostlin se standardizovanou normou pro testování rostlina z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*, Burnett), hořčice bílá – *Sinapis alba*. *Sinapis alba* má malá žluto oranžová semena o velikosti 1,5 - 2,5 mm. Testování ekotoxicity z vodného výluhu je vyhodnocováno z vlivu na růst kořene a klíčivost semen po dobu 72 hodin (Věstník MŽP č. 4/2007).

Aliivibrio fischeri (Beijerinck 1889)

Jedná se o gramnegativní bakterii s tyčinkovitým tvarem a luminiscenčními vlastnostmi, která v mořských ekosystémech působí jako destruent. Test se provádí s čerstvými kultivovanými nebo se sušenými, lyofilizovanými bakteriemi. Výsledkem je porovnání luminiscence bakterie před a po expozici látkou takzvaným

luminometrem. Bakterie jsou vystaveny vzorkům v roztoku obohaceným o NaCl po dobu 15 a 30 minut, při 15 °C. Jako limitní se označuje inhibiční hodnota luminiscence 20 % (Kočí et Mocová, 2009).

4. Metodika

4.1. Použité přístroje a laboratorní materiál:

Chemikálie:

- Ethanol (technický líh), CAS: 200-578-6, >90 hm. % (Severochema, Česká Republika)
- Peroxid vodíku, CAS: 7722-84-1, 30 hm.% roztok p.a. (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- Nile Red, CAS: 7385-67-3, pro mikroskopii (Sigma-Aldrich Chemie, Německo)
- Ultračistá voda, výroba v zařízení PURELAB flex 1 (ELGA LabWater, Velká Británie)

Přístroje:

- Mikroskop optický MBL 2000-T Trinokular (A.KRÜSS Optronic, Německo)
- Mikroskop Dino-Lite AM4113FVT2, vlnová délka záření 375 nm (Dino-Lite, Nizozemí)
- Video okulár VOPC93 USB 2.0., rozlišení 3 megapixely (A.KRÜSS Optronic, Německo)
- Detekční svítidla s UV zářením, vlnová délka záření 395 nm (Vorel, Česká republika)
- Tablet PC Acer Iconia Tab W700 (Acer, USA)
- Podsvícená pracovní deska Artograph LightPad 930 LX (Microbiotest, Belgie)
- WTW multimetr 3420 IDS (WTW, Německo)
- Membránová vývěva LABOPORT N 86 KT.18 (KNF Neuberger SAS, Francie)
- Filtrační zařízení celoskleněné SARTORIUS (Sartorius AG, Německo)
- Digestoř Q-Cell 2 s HEPA filtry (MERCY, Česká republika)

- Software Vimicro USB2.0 UVC PC Camera (Microsoft, USA)
- Software DinoCapture (Windows, Microsoft, USA).
- Software ImageJ (Java, Windows, Microsoft, USA)

Laboratorní pomůcky, spotřební materiál:

- Filtry ze skelných mikrovláken Whatman GF/B 47 mm (WhatmanTM, Velká Británie)
- Bürkerova komůrka (Marienfeld, Německo)
- Podložní a krycí sklíčka
- Láhve úzkohrdlé se zábrusem skleněné, objem 1 l
- Petriho misky skleněné, průměr 60 mm
- Zkumavky skleněné s PTFE uzávěrem, 40ml
- Kádinky s výlevkou skleněná, 400ml
- Hliníková fólie
- Pipeta PET pro přesun organismů
- Nerezová lžička pro přenos mikroplastů
- Ochranné brýle
- Nůžky

Praktické práce byly realizovány ve výzkumné laboratoři Katedry aplikované ekologie, budova MCEV II., Fakulta životního prostředí, České zemědělské univerzity v Praze.

4.2. Příprava jedinců *Daphnia magna*

Při průvodním výzkumu a optimalizace metody byly využity epifitie z DaphToxKit F (Microbiotest, Belgie). Kit obsahuje roztoky pro přípravu standardizovaného roztoku (SFW *Standard Freshwater*) určeného pro kultivaci jedinců a následující testy. SFW roztok obsahuje čtyři typy solí: hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3) 64,75 mg/l, dihydrát chloridu vápenatého ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 294 mg/l, heptahydrát síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 123,25 mg/l a chlorid draselný (KCl) 5,75 mg/l.

Epifia byla za pomoci deionizované vody přemístěna na sítko, promyta a následně přendána do Petriho misky s 15 ml SFW. Kultivace jedinců probíhala v uzavřených miskách po dobu 72 hodin při $22 (\pm 1) ^\circ\text{C}$, za stálého svícení. Proces přípravy odpovídal ČSN EN ISO 6341.

Pro další práce však byli použiti jedinci *Daphnia magna*, kteří byli pro výzkum věnováni z chovů společnosti ALS Czech Republic, s.r.o., z pobočky v České Lípě, která je největší akreditovanou laboratoří pro stanovení ekotoxicity v České Republice. Důvodem pro odběr jedinců z komerční laboratoře byla skutečnost, že jedinci z epifií se líhli postupně a nebyl tak zaručen potřebný počet stejně starých jedinců pro testování v daném čase.



Obr.č. 9: DaphToxKit F (Microbiotest, ©2021)



Obr.č. 10: *Daphnia magna* (zvětšení 4x10)

4.3. Příprava jedinců *Daphnia pulex*

Jedinci *Daphnia pulex* byli získáni z komerčně prodávaného živého krmiva pro dravé druhy akvarijských rybiček (Petra-Aqua, s.r.o., Velké Přílepy, Česká Republika). Pro laboratorní testy byli vybráni pouze mladí viditelně neoplození jedinci.



Obr.č. 11: *Daphnia pulex* (zvětšení 4x10)

4.4. Příprava jedinců *Thamnocephalus platyurus*

Jedinci pro výzkum toxicity na druhu *Thamnocephalus platyurus* byli získáni opět z komerčního kitu ThamnoToxkit F (Microbiotest, Belgie). Tento kit rovněž obsahuje roztoky pro přípravu standardizovaného roztoku (SFW) určeného pro rehydrataci cyst, kultivaci jedinců a následující testy. SFW roztok obsahuje čtyři typy

solí: hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3) 96 mg/l, dihydrát síranu vápenatého ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 60 mg/l, heptahydrát síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 123 mg/l a chlorid draselný (KCl) 4 mg/l.

Rehydratace cyst byla provedena ve zkumavkách s 1 ml SFW při 30 minutovém protřepávání. Následně byly cysty přendány do Petriho misek s 10 ml SFW pro líhnutí. V uzavřených Petriho miskách se jedinci kultivovali po dobu 20 hodin při teplotě $22 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ za kontinuálního osvětlení. Tento proces přípravy je v souladu s ČSN ISO 14380 (757754).



Obr.č. 12: ThamnoToxkit F (Microbiotest, ©2021)



Obr.č. 13: *Thamnocephalus platyurus* (zvětšení 4x10)

4.5. Příprava živného roztoku pro testování

Pro výzkum bylo, na doporučení pracovníků akreditované laboratoře ALS Česká Lípa, pro testování použito přefiltrované vody z demonstrační vodní nádrže, která se nachází před budovou MCEV II, FŽP, ČZU v Praze. Tato nádrž slouží k zadržování dešťové vody svedené ze střechy budovy a jako kořenová čistírna odpadních vod.

Voda z biotopu byla odebrána do skleněných lahví se zábrusem a následně přefiltrována v digestoři za použití filtračního zařízení Sartorius (Sartorius AG, Německo), přes skleněný filtr Whatman GF/B 47 mm (WhatmanTM, Velká Británie). U přefiltrované vody bylo naměřeno pH 8, teplota 22 °C a obsah kyslíku 8,7 mg/l, resp. saturace kyslíkem 102 %. Roztok je dále označován jako živný roztok.

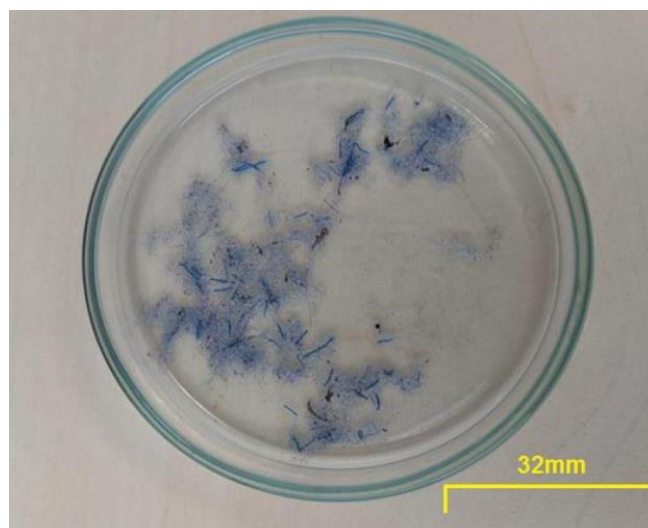
4.6. Příprava polyesterových vláken

Použitá polyesterová vlákna byla součástí výzkumu k diplomové práci „*Water pollution by Microplastics generated by Washing machine*“ realizované na FŽP, ČZU v Praze (García Viruez, 2020).

Tato vlákna byla získána z nového 100 % polyesterového trička modré barvy dle podobné metodiky, jako využívá Belzagui (2019). Tričko bylo vypráno v pěti stejných cyklech při teplotě 30 °C a 400 ot./min po dobu 37 minut, bez použití pracího prášku. Vlákna byla přefiltrována na bavlněnou látku a z té následně získána promytím deionizovanou vodou. Získaný vzorek byl vysušen při 45 °C.

Pro lepší viditelnost a detekci vláken pod mikroskopem s využitím UV světla byly vzorky obarveny roztokem Nile Red a ethanolu v koncentraci 0,01 mg/ml a následně opět vysušeny při 45 °C.

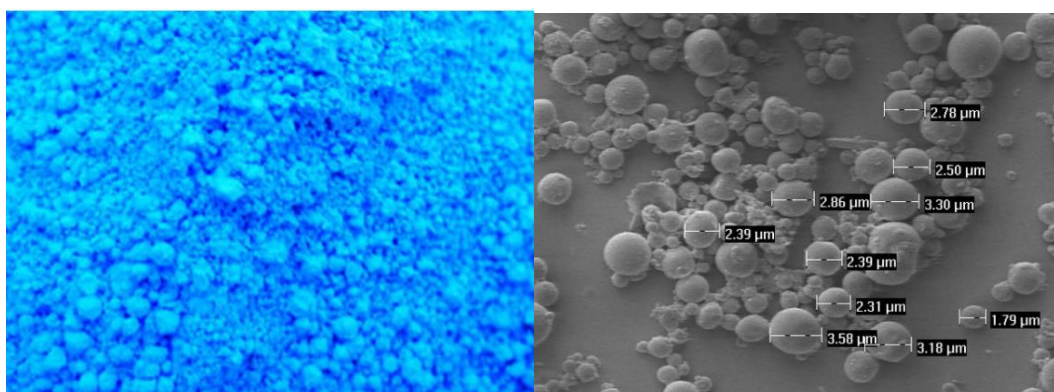
V rámci testů, realizovaných v této diplomové práci, byla polyesterová vlákna přidávána v obdobném množství se snahou vybrat vlákna menších rozměrů (maximální délka 5 mm), v případě potřeby byla ještě tato vlákna dále nastříhána.



Obr.č. 14: Polyesterová vlákna (do 5mm) (García Viruez, 2020)

4.7. Příprava FMB částic

Druhým typem testovaných mikroplastů byly částice směsného polymeru kulovitého tvaru FMB - Blue Fluorescent Polymer Microspheres (1.3g/cc - 1-5 μm), které byly zakoupeny od komerčního výrobce COSPHERIC (Cospheric LLC, USA).



Obr.č. 15: FMB částice 1-5 μm (Cospheric LLC, USA).

4.8. Metodika testu

Oba druhy *Daphnia* sp. byly umístěny ve skleněných kádinkách a *Thamnocephalus* ve zkumavce s PTFE víčkem. Víčko bylo z vnitřní strany obaleno hliníkovou fólií, aby bylo zabráněno nežádoucí expozici PTFE, kádinky byly zakryty hliníkovou fólií, aby bylo zabráněno kontaminaci mikroplasty z vnějšího prostředí. Kádinky s *Daphnia pulex* a *Daphnia magna* obsahovaly 300 ml živného roztoku a zkumavky pro *Thamnocephalus platyurus* 30 ml. V takto připravených

kádinkách/zkumavkách bylo vždy 30/15 jedinců a reprezentativní množství daného mikroplastu (přibližně 30 mm³ u *Daphnia* sp., 15 mm³ pro *Thamnocephalus*). Vzorky s *Daphnia pulex* a *Daphnia magna* byly po 48 hodinách dokrmeny 20 ml směsí řas *Desmodesmus subspicatus* 688 a *Parachlorella kesslerii* 253 (dodavatel sbírka autotrofních organismů CCALLA, Botanického ústavu AV ČR, v.v.i., Třeboň, Česká Republika) a následně byly příkrmovány stejnou směsí každých 7 dní. Po celou dobu testu byly vzorky na denním světle a zároveň na prosvětlovacích deskách svíceny 24 hodin denně.

Test pro *Thamnocephalus platyurus* byl ukončen po 72 hodinách, z důvodu krátké životnosti tohoto organismu. Testy s *Daphnia pulex* a *Daphnia magna* byly ukončeny po 21 dnech.

Pro všechny organismy byly připraveny kontrolní vzorky, do kterých nebyly přidány mikroplastové částice. Pro *Thamnocephalus platyurus* to byly tři uzavřené zkumavky po 15 jedincích s 30 ml živného roztoku. Pro *Daphnia pulex* a *Daphnia magna* to byla vždy jedna kádinka s 30 jedinci a 300 ml živného roztoku. Dafnie byly příkrmovány stejně jako vzorky s mikroplasty a překryty hliníkovou folií.

4.9. Test na semenech *Sinapis alba*

Test ekotoxicity na semenech *Sinapis alba* byl realizován za plného využití kitu PHYTOTESTKIT (Mikrobiotest, Belgie). Kit obsahuje uzavíratelnou testovací destičku z PVC, do kterých je umístěna pěnová destička, která je překrytá parafilmem. Na parafilm byl položen filtrovací papír o tloušťce 1,7 mm, na který bylo nalito 20 ml zkušební roztoku s mikroplasty. Následně byl vzorek překryt černým filtračním papírem o tloušťce 0.54 mm, na ten bylo umístěno 10 semen *Sinapis alba* a celá destička byla uzavřena průhledným víčkem.

Pro vzorky byly vytvořeny čtyři zkušební desky:

1. Vlákna 15 mm³ a živný roztok 20 ml,
2. FMB částice 15 mm³ a živný roztok 20 ml,
3. Živný roztok 20 ml,
4. Deionizovaná voda 20 ml.

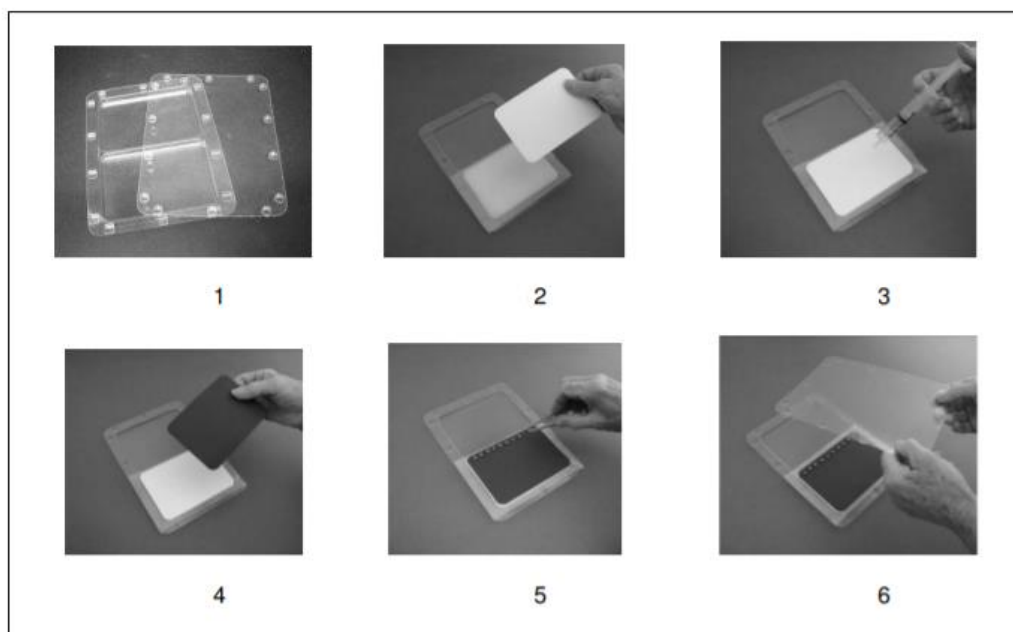
Takto byly vzorky ponechány po dobu 72 hodin při teplotě $22 \pm 1^\circ\text{C}$ na denním světle. Na konci testu byly destičky nafoceny a délka kořenu vyhodnocena v programu ImageJ (Java, Windows, Microsoft, USA). Pro stanovení EC_{50} (efektivní koncentrace, která způsobuje 50 % inhibici růstu kořene) bylo nutné minimálně u jednoho z testovaných vzorků zaznamenat vyšší relativní inhibici než 50 % a u ostatních koncentrací relativní inhibici jinou než 0 a 100 %

Relativní inhibice byla vypočítána dle vzorce:

$$H_i = \frac{d_{pk} - d_{pi}}{d_{pk}} \cdot 100\% \quad \Rightarrow \quad H_{1i} = \frac{2,45 - 0}{2,45} \cdot 100\% = 100$$

d_{pk} – průměrná délka kořene v kontrole

d_{pi} – průměrná délka kořene ve variantě s testovaným vzorkem



Obr.č. 16: PHYTOTESTKIT (Mikrobiotest, Belgie, ©2021; upraveno autorkou práce)



Obr.č. 17: Živný roztok a FMB částice na testovacím filtru.

4.10. Test na bakteriích *Aliivibrio fischeri*

Pro ekotoxikologické testy, které byly provedeny akreditovanou laboratoří DEKONTA, a.s. byly připraveny čtyři roztoky:

1. Deionizovaná voda 200 ml,
2. Živný roztok 200 ml,
3. FMB částice 15 mm³ a živný roztok 200 ml,
4. Vlákna 15 mm³ a živný roztok 200 ml.

Roztoky byly podrobeny testu na luminiscenčních bakteriích *Aliivibrio fischeri* a byla hodnocena jejich inhibice světelné emise dle standardního operačního postupu 06.0.12A.

4.11. Vizualizace výsledků

Pro získání informace o přítomnosti mikroplastů v trávicím ústrojí testovaných organismů bylo použito mikroskopu MBL 2000-T Trinokular (Krüss, Německo) při

zvětšením 4x10. Obraz byl přenesen video okulárem VOPC93 (Krüss, Německo) a nafocen v programu Vimicro PC Camera (Microsoft, USA). Pro zobrazení fluorescence mikroplastů byla využita externí UV svítidla o frekvenci 395 nm (Vorel, Česká republika) a UV kamera Dino-Lite s vlnovou délkou 375 nm, rozlišením 1280x1024 pix a zvětšením 10-70x (Dino-Lite, Nizozemí) a k ní kompatibilního počítačového programu DinoCapture (Windows, Microsoft, USA).

Organismy byly foceny v Bürkerově komůrce (Marienfeld, Německo), která během výzkumu umožňovala sledovat přítomnost mikroplastů uvnitř živých organismů. Po ukončení výzkumu byla přítomnost mikroplastů v trávicím traktu focena na vytvořených trvalých preparátech.

Délka kořene u testů na semenech *Sinapis alba* byla hodnocena programem ImageJ (Java, Windows, Microsoft, USA).

4.12. Vizualizace na filtrech

Experimentálně byla v několika málo případech vyzkoušena i vizualizace mikroplastových vláken dle metodiky Jemec et al. 2016.

6 jedinců ze vzorku pro *Daphnia magna* s vlákny a 6 jedinců z kontroly pro *Daphnia magna* byly nejprve usmrceny v ethanolu a přendány do Petriho misky na filtr ze skelných mikrovláken Whatman GF/B 47 mm (WhatmanTM, Velká Británie) napuštěný 15 ml 30 % H₂O₂. Uzavřené Petriho misky byly vysušeny při teplotě 80 °C po dobu 8 hodin. Výsledek byl zobrazen UV kamerou Dino-Lite s vlnovou délkou 375 nm (Dino-Lite, Nizozemí), se zvětšením 40x a k ní kompatibilního počítačového programu DinoCapture (Windows, Microsoft, USA).

4.13. Hypotézy práce

Pro účely diplomové práce byly stanoveny následující hypotézy:

H1: Mikroplasty jsou ekotoxické pro vybrané vodní organismy.

H2: Mikroplasty prokazatelně vstupují do organismů orální cestou.

H3: Mikroplasty mají vliv na dlouhodobé přežívání a rozmnožování organismů.

5. Výsledky

Dosaženými výsledky jsou údaje z testů ekotoxicity, akutní a chronické, získané pro jednotlivé organismy, dále zdokumentování výskytu mikroplastů uvnitř živých organismů a také srovnání ekotoxicity vzorků za pomoci testů na semenech *Sinapsis alba* a na bakterii *Aliivibrio fischeri*. V posledním kroku pak porovnání výsledků napříč testy.

Testy akutní toxicity byly vyhodnocovány pro *Thamnocephalus platyurus* a testy chronické toxicity byly vyhodnocovány pro *Daphnia magna* a *Daphnia pulex*.

5.1. Výsledky akutních testů:

5.1.1. *Thamnocephalus platyurus*:

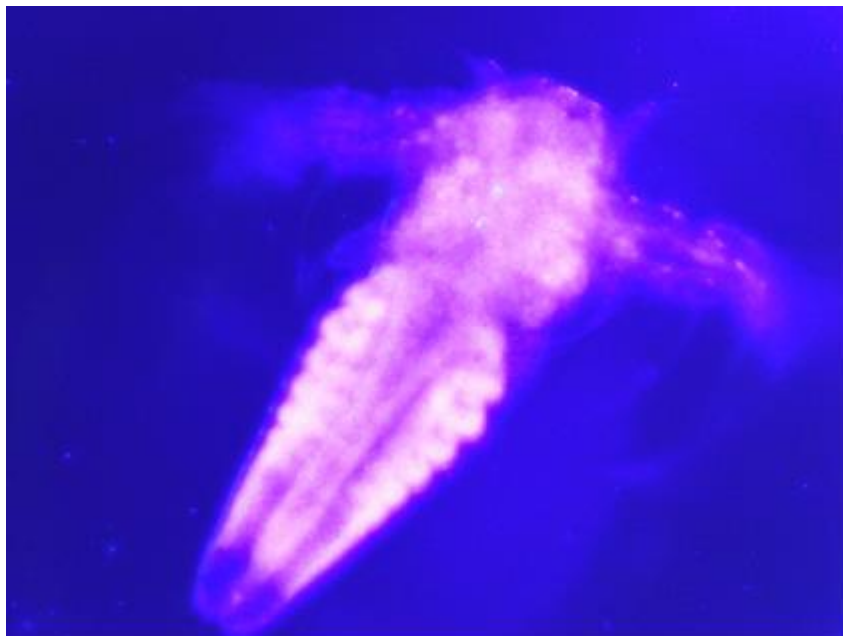
Tab.č. 2: Počty jedinců *Thamnocephalus platyurus* v průběhu výzkumu.

varianta	Původní stav	Stav po 24h	Stav po 48h	Stav po 72h
K1	30	30	30	0
K2	30	30	30	0
K3	30	30	30	0
VI1	30	30	30	0
VI2	30	30	30	0
VI3	30	30	30	0
FMB1	30	30	30	0
FMB2	30	30	30	0
FMB3	30	30	30	0

Oba použité druhy mikroplastů pro *Thamnocephalus platyurus* nevykázaly žádné ekotoxické účinky. Ve 24 hodinovém testu dle kritérií ČSN ISO 14380 (757754) nebyla zaznamenána žádná imobilizace či úmrtí jedinců, v žádném ze vzorků. Stejně výsledky vykazovaly vzorky i po 48 hodinách. K úmrtí jedinců došlo ve všech vzorcích po 72 hodinách, vč. vzorků kontrolních, protože jedinci nebyly již schopni se dále rozmnožovat a přežít po delší dobu. Dle pořízených fotografií bylo ale zřejmé, že jedinci v době svého života bez problémů přijímaly FMB částice. Přítomnost vláken v tělech jedinců nebyla jednoznačně prokázána.



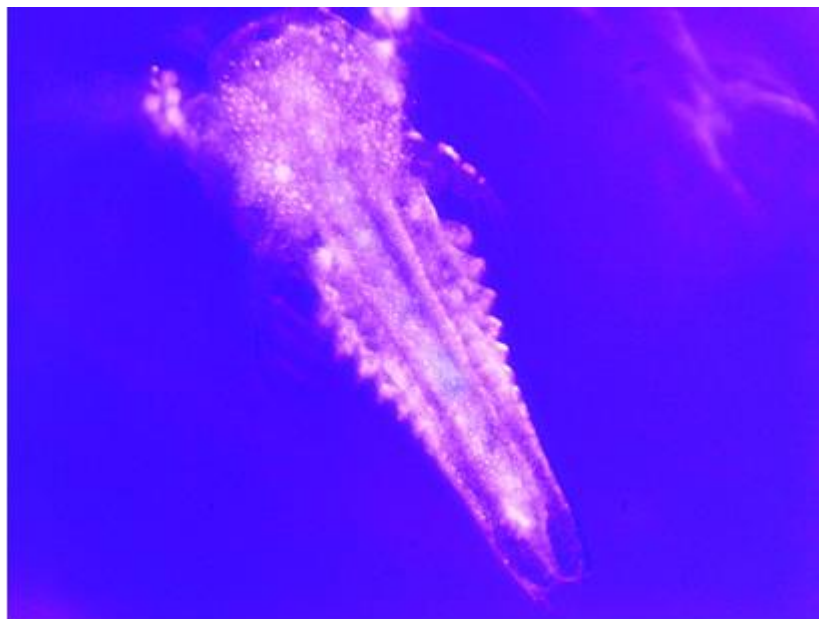
Obr.č. 18: *Thamnocephalus platyurus*, kontrolní vzorek (zvětšení 4x10)



Obr.č. 19: *Thamnocephalus platyurus*, kontrolní vzorek pod UV světlem (zvětšení 4x10)



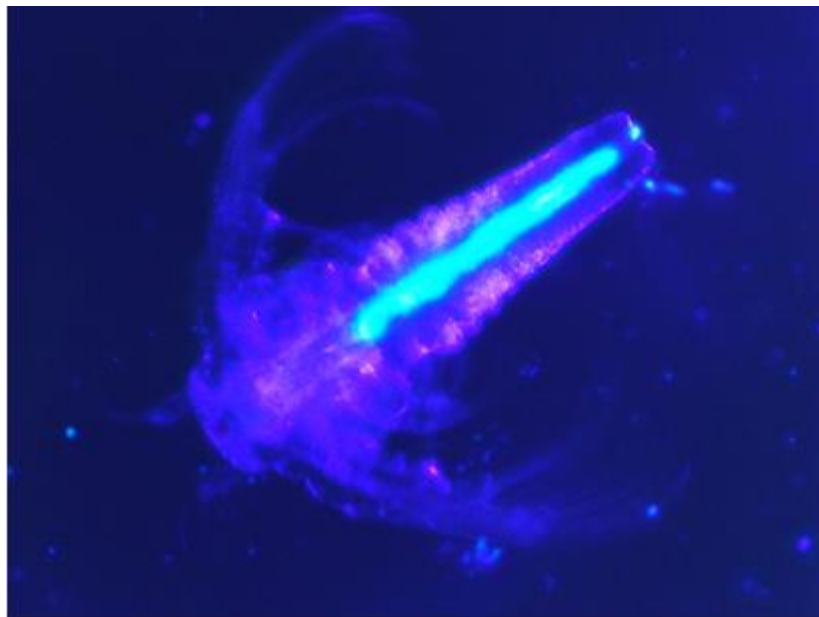
Obr.č. 20: *Thamocephalus platyurus*, vlákna (zvětšení 4x10)



Obr.č. 21: *Thamocephalus platyurus*, vlákna pod UV světlem (zvětšení 4x10)



Obr.č. 22: *Thamnocephalus platyurus*, FMB částice (zvětšení 4x10)



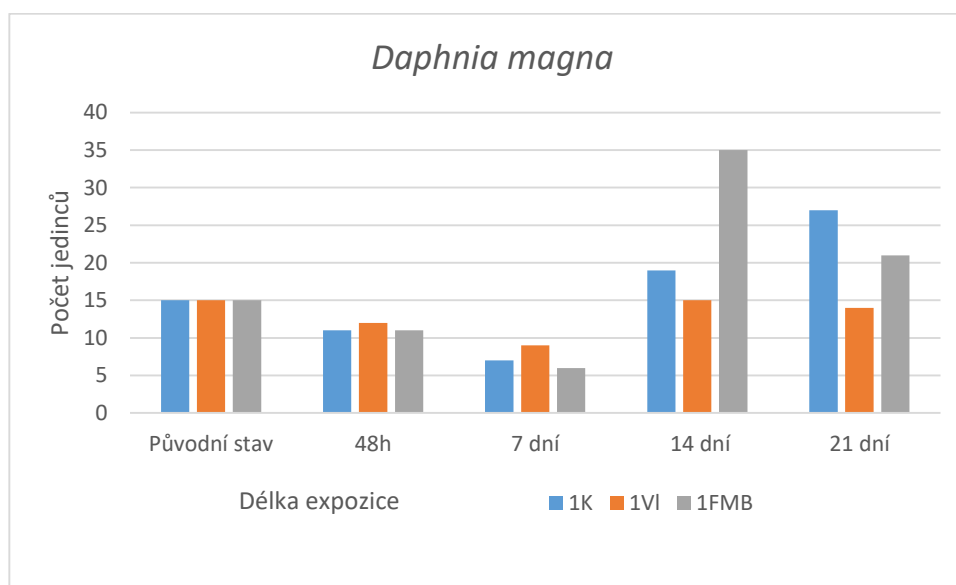
Obr.č. 23: *Thamnocephalus platyurus*, FMB částice pod UV světlem (zvětšení 4x10)

5.2. Výsledky chronických testů:

5.2.1. *Daphnia magna*:

Tab.č. 3: Počty jedinců *Daphnia magna* v průběhu výzkumu

varianta	Původní stav	Stav po 48 hodinách	Stav po 7 dnech	Stav po 14 dnech	Stav po 21 dnech
1K	15	11	7	19	27
1VI	15	12	9	15	14
1FMB	15	11	6	35	21

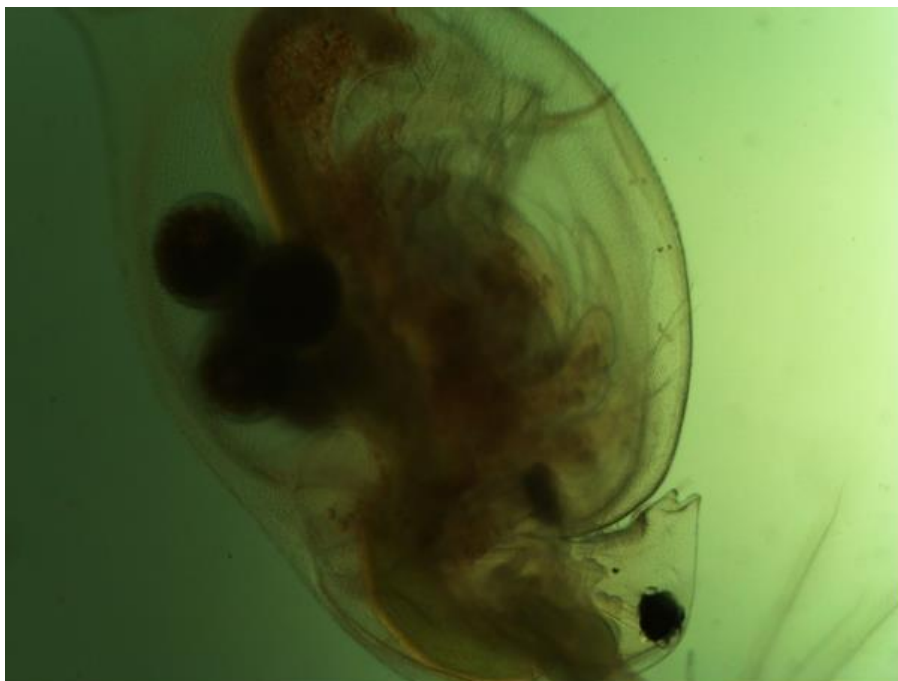


Graf č. 1: Počty jedinců ve vzorcích v průběhu výzkumu.

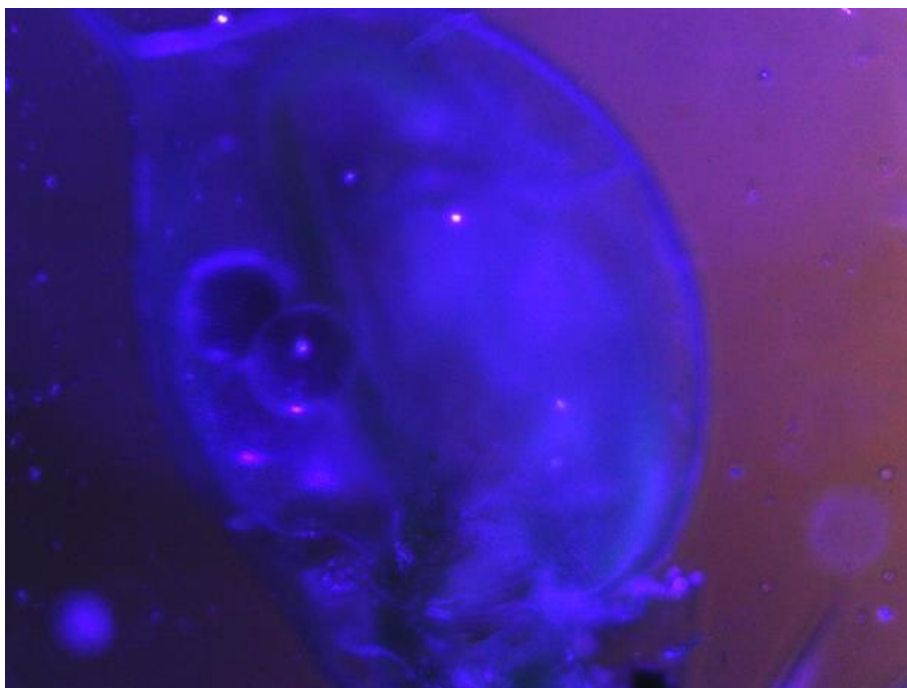
Daphnia magna vykazovala obdobné výsledky ve vzorcích s mikroplasty i v kontrolním vzorku. Z tohoto důvodu se nedá jednoznačně potvrdit toxicita mikroplastů ani u *Daphnia magna*. Výsledky však ukazují na patrnou dlouhodobou stimulaci dafnií, reagujících příznivě na přítomnost FMB částic, zvýšením počtu životaschopných a nedeformovaných jedinců po 14 dnech testu na více než dvojnásobek. Menší výkyvy v porovnání s kontrolou a FMB částicemi byly zaznamenány u vzorku s vlákny.

U FMB částic byla zároveň dále prokázána jejich přítomnost přímo uvnitř trávicího systému obou druhů dafnií. I přesto, jedinci ve všech vzorcích bez problému přijímaly potravu. U několika jedinců byl zaznamenán také výskyt vláken. S ohledem na jejich rozměry a polohu umístění a používané rozlišení se však nedá jednoznačně konstatovat, zda byly přítomny přímo v trávicím traktu nebo byly namotány na těla jedinců.

Toxicitu mikroplastů nebylo možné dále jednoznačně vyhodnotit dle ČSN EN ISO 6341 (757751) z důvodu více než 20 % úmrtnosti jedinců v kontrolním vzorku.



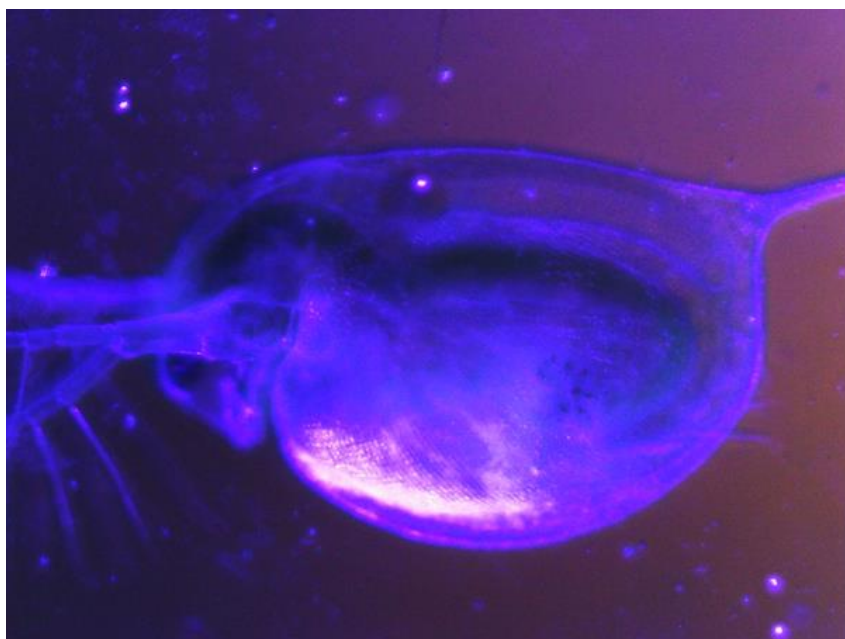
Obr.č. 24: *Daphnia magna*, kontrolní vzorek (zvětšení 4x10)



Obr.č. 25: *Daphnia magna*, kontrolní vzorek pod UV světlem (zvětšení 4x10)



Obr.č. 26: *Daphnia magna*, vlákna (zvětšení 4x10)



Obr.č. 27: *Daphnia magna*, vlákna pod UV světlem (zvětšení 4x10)



Obr.č. 28: *Daphnia magna*, FMB částice (zvětšení 4x10)

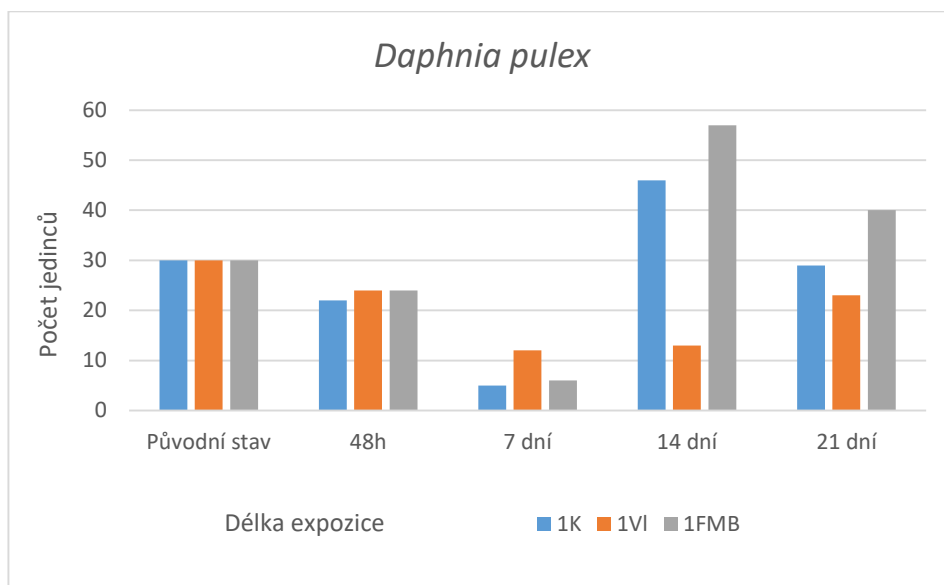


Obr.č. 29: *Daphnia magna*, FMB částice pod UV světlem (zvětšení 4x10)

5.2.2. *Daphnia pulex*:

Tab.č. 4: Počty jedinců *Daphnia pulex* v průběhu výzkumu.

varianta	Původní stav	Stav po 48 hodinách	Stav po 7 dnech	Stav po 14 dnech	Stav po 21 dnech
1K	30	22	5	46	29
1VI	30	24	12	13	23
1FMB	30	24	6	57	40

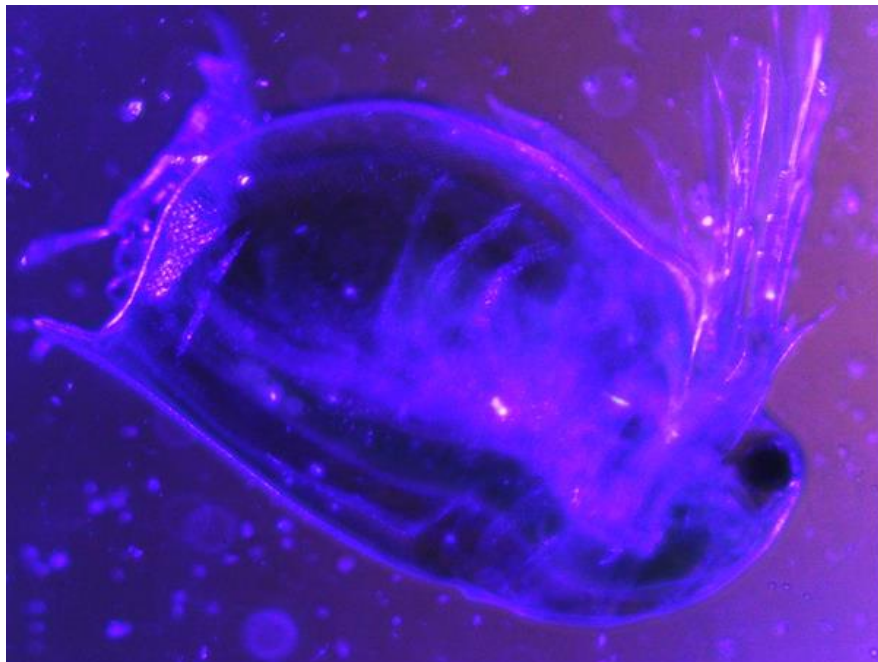


Graf č. 2: Počty jedinců ve vzorcích v průběhu výzkumu.

Daphnia pulex vykazovala podobné výsledky jako *Daphnia magna*. Ve všech vzorcích došlo k velkému výkyvu početnosti, po 7 dnech a opětovnému nárůstu na původní počet. Nejméně úspěšný v návratu k původnímu počtu byl opět vzorek s vlákny. Oproti tomu jedinci ve vzorku s FMB částicemi i po velkém výkyvu zaznamenali nárůst populace dokonce výrazně vyšší (o 37,93 %) než v kontrolním vzorku.



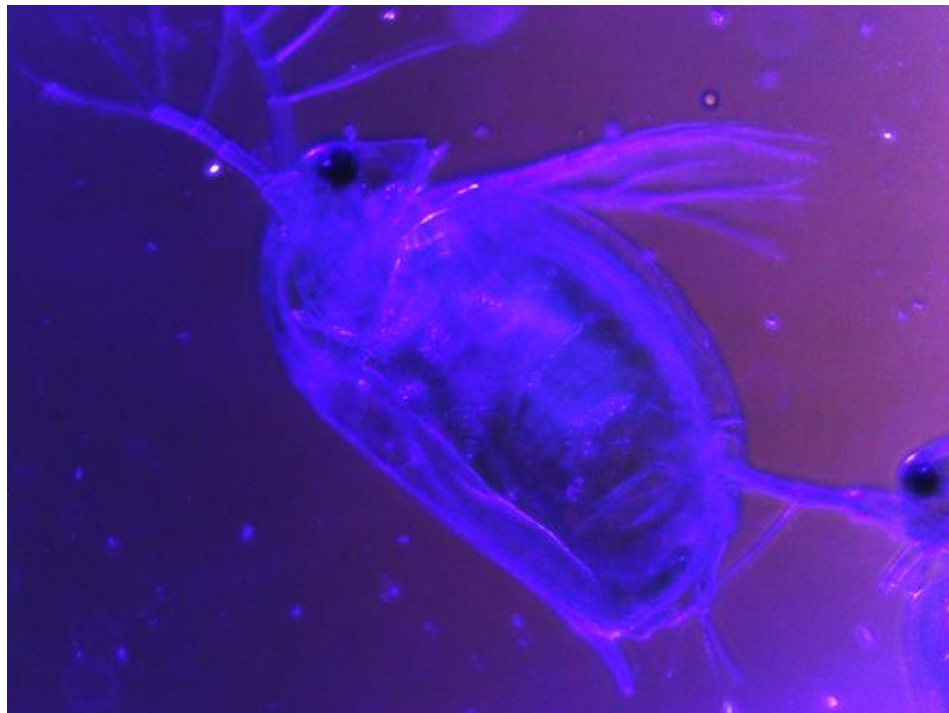
Obr.č. 30: *Daphnia pulex*, kontrolní vzorek (zvětšení 4x10)



Obr.č. 31: *Daphnia pulex*, kontrolní vzorek pod UV světlem (zvětšení 4x10)



Obr.č. 32: *Daphnia pulex*, vlákna (zvětšení 4x10)



Obr.č. 33: *Daphnia pulex*, vlákna pod UV světlem (zvětšení 4x10)



Obr.č. 34: *Daphnia pulex*, FMB částice (zvětšení 4x10)



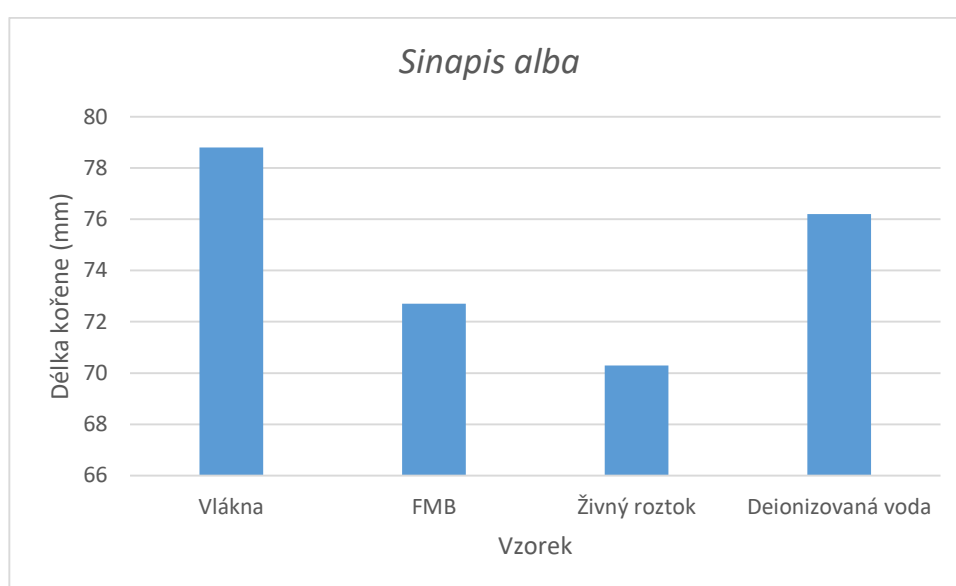
Obr.č. 35: *Daphnia pulex*, FMB částice pod UV světlem (zvětšení 4x10)

5.3. Výsledky srovnávacích testů

5.3.1. *Sinapis alba*

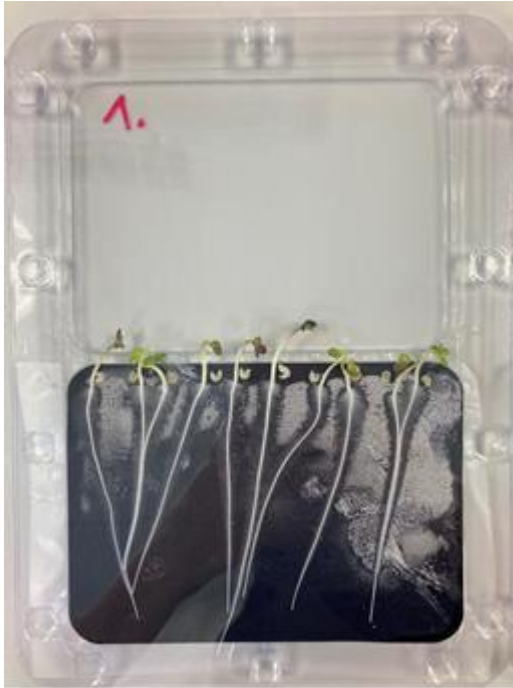
Tab.č. 5: Naměřená délky kořenů *Sinapis alba* (mm) pro jednotlivé varianty testů.

varianta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vláčna	67	84	76	77	79	96	80	79	84	66
FMB	68	57	73	70	71	69	73	88	83	75
Živný roztok	54	75	69	76	70	74	77	79	58	71
Deionizovaná voda	80	69	87	83	68	87	65	68	87	68

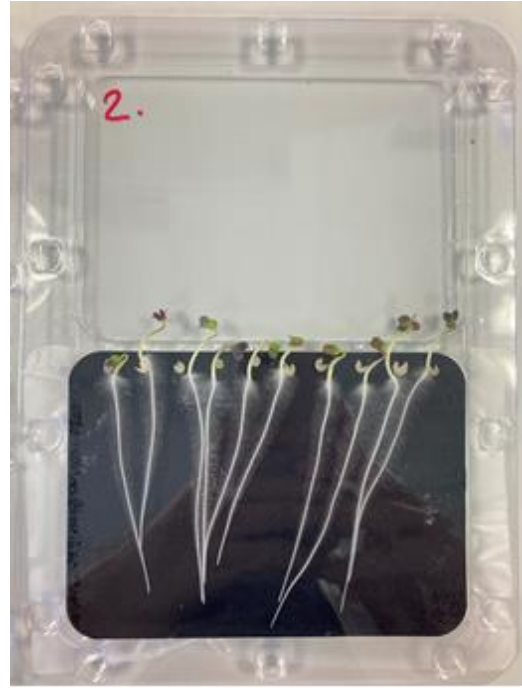


Graf č. 3: Průměrné délky kořene *Sinapis alba* (mm) pro jednotlivé vzorky.

U testu na semenech *Sinapis alba* nebyla pozorována výrazná inhibice růstu kořene ani snížená klíčivost mezi jednotlivými vzorky. V grafu č. 3 průměrných hodnot můžeme vidět, že nejmenší stimulaci vykázal živný roztok, který byl ale použit i u vláken a FMB částic. Dle vzorce pro výpočet EC_{50} nebyla zjištěna relativní inhibice u žádného z vzorků.



Obr.č. 36: *Sinapis alba*, vlákna a živný roztok



Obr.č. 37: *Sinapis alba*, FMB částice a živný roztok



Obr.č. 38: *Sinapis alba* a živný roztok



Obr.č. 39: *Sinapis alba* a deionizovaná voda

5.3.2. *Aliivibrio fischeri*:

Mikroplasty byly pro srovnání podrobeny ekotoxikologickému testu na bakterii *Aliivibrio fischeri*. Ani zde se nebyla potvrzena toxicita žádného ze vzorků (výsledky menší než 20 % inhibice světelné emise bakterií při 15 a 30 minut).

Tab.č. 6: Výsledky pro test na *Aliivibrio fischeri* (Biotechnologická laboratoř DEKONTA, a.s., protokol o zkoušce 535/2020)

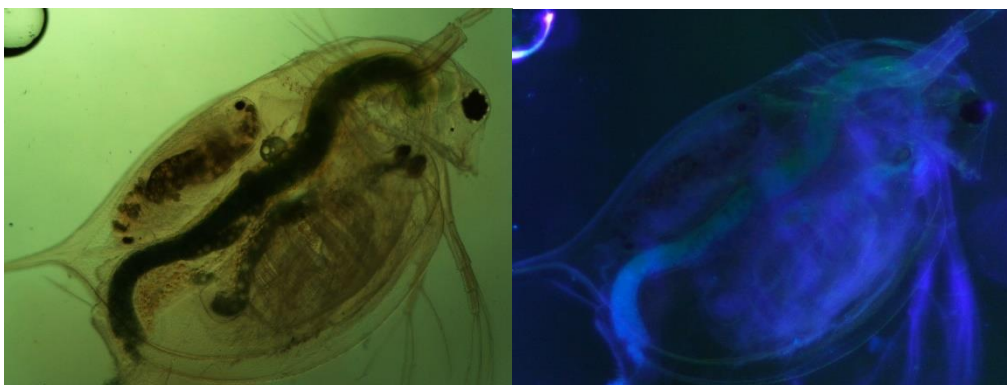
Varianta	Matrice	<i>A. fischeri</i> H ₅ (%)	<i>A. fischeri</i> H ₁₅ (%)	<i>A. fischeri</i> H ₃₀ (%)
deionizovaná voda	voda	8,86	13,11	14,42
živný roztok	voda	3,82	4,37	7,42
živný roztok + FMB částice	voda	1,56	1,93	0,85
živný roztok + vlákna	voda	2,25	2,41	2,55

5.4. Výsledky v porovnání mezi jednotlivými organismy

Celkově lze na základě dosažených výsledků konstatovat, že nebyla potvrzena toxicita ani u jednoho s testovaných mikroplastů.

Thamnocephalus platyurus, který byl použit pouze pro sledování akutní ekotoxicity, signifikantně potvrdil, že použité mikroplasty nejsou ve vodním prostředí toxické. U FMB částic můžeme s jistotou říci, že ani jejich požití a setrvání v trávicím traktu nebylo pro tento druh toxické.

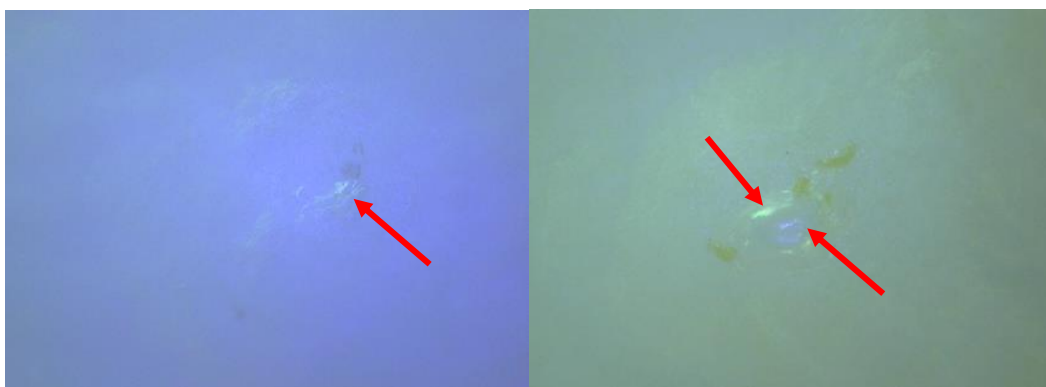
Druhy *Daphnia magna* a *D. pulex* dále nepotvrdily jak akutní, tak chronické toxicity obou testovaných mikroplastů. Opět bylo možné sledovat přítomnost FMB mikročástic v trávicích soustavách jedinců. Částice byly prokazatelně přítomny i uvnitř gravidních/rodicích jedinců.



Obr.č. 40: Vlevo *Daphnia magna* s mladým jedincem, vpravo stejný případ po UV světlem, ve střevě dospělé jsou patrné FMB částice (zvětšení 4x10)

5.5. Zobrazení výsledků na filtrech

Z obrázku je patrné, že uvnitř jedinců *Daphnia magna* jsou přítomna vlákna, problematické však zůstává posouzení, zdali se nachází uvnitř trávicí soustavy jedinců nebo jsou například namotána na krunýř a nedošlo tedy k jejich přímému požití.



Obr.č. 41: Vlákno a *Daphnia magna*



Obr.č. 42: Vlákno a *Daphnia magna*

6. Diskuze

Velká část mé práce na výzkumu se zaměřovala hlavně na zvládnutí metodiky. Práce na studiu mikroplastů zatím není standardizována, procházela jsem tedy dlouhým procesem jak s živými organismy, tak s výběrem a přípravou samotných mikroplastů. Měla jsem možnost vyzkoušet různé metody v závislosti na již existujících výzkumech a vybrat ty, které jsou dle mého názoru vhodné a funkční v laboratorních podmínkách na FŽP, ČZU.

Životnost různých druhů organismů využívaných při testech ekotoxicity se liší. Stejně tak jsou rozdílné způsoby chování u jedinců kultivovaných z epifíí/cyst, a vzniklých partenogenezí (Arbačiauskas et Lampert, 2003). Komerčně vytvořené kity pro zjednodušení testů ekotoxicity obsahují epifia nebo cysty, což výrazně prodlužuje jejich použitelnost, neboť vajíčka chráněná chitinovou schránkou mají dlouhou životnost (Fargašová, 2009). Na druhou stranu zpravidla nezaručují vylíhnutí potřebného počtu jedinců v daném čase. Otázkou také zůstává porovnávání testů mezi sebou s přihlédnutím právě na způsob kultivace (epifia x partenogeneze).

V mém výzkumu jsem měla možnost porovnávat ekotoxicitu mikroplastů jednak akutní (24h a 48h), tak u jedinců *Daphnia magna* a *pulex* i chronickou (21dnů). Oba tyto výsledky potvrdily, že mikroplasty nejsou pro vybrané organismy toxické. U chronických testů bylo možné sledovat toxicitu na různé generační úrovni. Toxicita se neprokázala ani při další „srovnávacích testech na semenech *Sinapsis alba* a u mořských bakterií *Aliivibrio fischeri*.

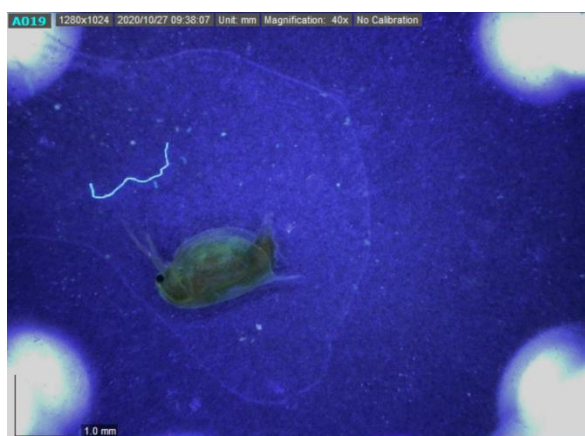
Při akutních testech toxicity se organismy nepřikrmují. V přirozeném prostředí se ale obvykle setkávají s dlouhodobou expozicí látky. Proto, aby bylo možné potvrdit potenciální účinek plastových částic v přírodním prostředí, byla použita i vhodnější metoda dlouhodobé expozice. Pro přežití organismů během chronických testů je standartní jejich dokrmování (Baird et al., 1990; Zhao et Wang, 2010; Sieratowicz et al., 2011). U zooplanktonu, jako je *Daphnia magna*, jsou hlavní potravou zelené řasy, které mohou kolonizovat a růst na povrchu plastových materiálů (Gross et al., 2016; Kumar et al., 2017). Bylo dokonce zjištěno i zvýšení produkce řasy a jejich přírůstků díky přítomnosti mikroplastů (Zhao et al. 2020, Canniff et Hoang 2018). Tento předpoklad by mohl zdůvodňovat vyšší nárůst populace, dosažených v rámci mé práce, ve vzorcích s FMB částicemi.

Dále bylo experimentálními pracemi potvrzeno, že organismy nehromadí mikroplasty uvnitř svých těl. Po 24 hodinách v čistém médiu je viditelně vyloučí (Kokalj et al. 2017), což bylo prokázáno i v mém výzkumu viz Obr.č.29 (Výsledky).

Samotná vizualizace mikroplastů je složitý a nestandardizovaný proces, odhalit jejich přítomnost v trávicí soustavě je neméně problematické. V laboratorních podmínkách je možné použít obarvené mikroplasty. Samotné použití barviva a jeho možný výluh a toxicita pro sledované organismy může způsobovat sporné výsledky testů. Obdobně nelze kombinovat například optickou analýzu s fluorescenčním barvivem Nile Red a následnou detekcí na Ramanu (Wimmerová et al., 2020).

Pozření mikroplastových částic organismy nepopíratelně závisí na jejich druhu, tvaru a velikosti. U druhu *Daphnia magna* byly v trávicí soustavě pozorovány částice o maximální velikosti až 528 μm , vlákna o délce 1,4 mm (Jemec et al., 2016) a korálky o velikosti 106 μm (Frydkjær et al., 2017). Předpokládá se korelace mezi velikostí/tvarem částic a preferenci jednotlivých organismů k jejich pozření (Kokalj et al., 2017).

V mé práci byl pozorován vliv v domácnosti vyprodukovaných vláken (García, 2020). Jedná se o příklad mikroplastových vláken, která se reálně mohou vyskytovat v životním prostředí. Stanovení jejich velikosti a následné zobrazení se tímto však výrazně komplikuje a znesnadňuje i nastavení metodiky, aby bylo možné sledovat pozření vláken jedinci. Hlavním problémem je nestandardizovaná velikost vláken, což je možný důvod neúspěchu. Jak je patrné z obrázku níže (Obr.č.43), byla velikost některých vláken pro pozření organismy příliš velká.



Obr.č.43: Porovnání velikosti mikroplastového vlákna a jedince druhu *Daphnia magna* (zvětšení 4x10)

Dále nebylo možné prokázat přítomnost vláken uvnitř trávicí soustavy. Viz Obr.č.44, kde se může pravděpodobně jednat o vlákno zamotané v krunýři organismu, případně o odraz chitinu obsaženého v krunýři.



Obr.č.44: *Daphnia magna* s možnou přítomností vláken (zvětšení 4x10)

Experimentálně byla vyzkoušena i jiná metoda zobrazení dle popisu z článku dle (Jemec et al., 2016), ale ani ta se neprokázala jako směrodatná. Její použití navíc bylo zároveň komplikovanější a pro její použití bylo nutné usmrcení jedinců.

Některé výzkumy poukazují na fakt, že „špičaté“ částice jako fragmenty nebo vlákna, jsou méně úspěšné v pozření organismy, než hladké částice, kuličky a korálky. Z důvodu obtížnějšího pohlcování špičatých částic (Frydkjær et al., 2017). A další potvrzují pozření vláken, například druhem *Daphnia magna* a *Artemia franciscana* (Kokalj et al., 2017). S jednoznačným výskytem vláken uvnitř trávicí soustavy organismů se setkáváme i v dalších výzkumech (Jemec et al., 2016).

V mém výzkumu se tento fakt nepotvrdil, i když některé výstupy, jak už bylo řečeno, jsou sporné a bylo by vhodnější pokus opakovat, například se standardizovanou velikostí vláken, nebo za použití doprovodné (srovnávací) vizualizační techniky.

Ekotoxicita mikroplastů může souviset i s vazbou toxických látek na povrchu mikroplastů. Což paradoxně může v prostředí působit kladně i záporně. Některé výzkumy poukazují na možnost detoxikace prostředí mikroplasty právě jejich vazbou toxických látek (Heidrich et al., 2019).

Dle mého názoru je dalším krokem, v testování ekotoxicity mikroplastů, studování jejich schopnosti sorpce toxických látek a následná aplikace na větších organismech. Jedincích s delší životností a tedy možností sledování chronických změn

inhibice, akumulace mikroplastů v orgánech, jejich vylučování a dlouhodobého osudu mikroplastů, zejména jejich stárnutí a rozpadu, v životním prostředí.

Výzkumem byly navrženy tři hypotézy:

H1 - Mikroplasty jsou ekotoxické pro vybrané vodní organismy, bakterie a vyšší rostliny. Tato hypotéza nebyla potvrzena, nebyla naměřena akutní ani chronická toxicita mikroplastů vůči vodním mikroorganismům. Toxicita nebyla prokázána ani v doprovodných, srovnávacích testech na bakteriích a vyšších rostlinách.

H2 - Mikroplasty prokazatelně vstupují do organismů orální cestou. Tato hypotéza byla potvrzena pro FMB částice, ale byla neprůkazná pro mikroplastová vlákna polyesteru.

H3 - Mikroplasty mají vliv na dlouhodobé přežívání a rozmnožování organismů. Dle mého výzkumu se dá předpokládat že ano, ale míra tohoto vlivu musí být potvrzena dalším výzkumem.

7. Závěr a přínos práce

Cílem práce bylo hodnocení ekotoxicity mikroplastů na vybraných sladkovodních organismech. Dle dosavadních výzkumů a dat je patrné, že mikroplasty jsou hrozbou, kterou však prozatím nejsme schopni adekvátně hodnotit. Za využití různých druhů a modifikací testů ekotoxicity byly použité mikroplasty stanoveny jako netoxické. Výsledkem práce však nebylo jen toto zjištění, ale i samotné vytvoření funkční metodiky pro testování ekotoxicity mikroplastů pro vodní organismy.

Zobrazení částic uvnitř trávicího traktu živých organismů, tedy přímé působení, ne jen expozice v rámci vodního prostředí, je důležité pro další výzkum. Nyní je možné zaměřit se na další faktory, které sebou různorodost mikroplastů může nést, například na možnou adsorbci toxických látek (mikropolutantů) na povrch mikroplastových částic a tím i zajištění jejich distribuce v prostředí. Dále pak na studium chronických účinků na organismy, a to nejen vodní. V neposlední řadě také dlouhodobý osud těchto látek, jejich možnou akumulaci a dopady na životní prostředí a zdraví.

8. Přehled literatury a použitých zdrojů

- Arbačiauskas, K., Lampert, W. 2003: *Seasonal adaptation of ex-ephippio and parthenogenetic offspring of Daphnia magna: differences in life history and physiology*. Functional Ecology. 17:431-437
- Anděl, P. 2011: *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Liberec: Evernia. 265 s. ISBN 978-903787-9-7.
- Auta, H.S., Emenike, C.U., Fauziah. S.H. 2017: *Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions*. Environment International. 102:165-176
- Baird, D.J., Barber, I., Calow, P. 1990: *Clonal variation in general responses of Daphnia magna Straus to toxic stress*. I. Chronic life-history effects. Functional Ecology. 4:399-407
- Belzagui, F., Crespi, M., Álvarez, A., Bouzán, C.G., Vilaseca, M. 2019: *Microplastics' emissions: Microfibers' detachment from textile garments*. Environmental Pollution. 248:1028-1035.
- Bílková, M. 2015: *Mikroplasty v akvatických ekosystémech*. Ekotoxikologie vodních ekosystémů. Seminární práce. Nепublikováno.
- Bláha, L. Nedatováno: *Testování ekotoxicity - biotesty*. Studijní materiály. Brno: RECETOX.
- Canniff, P.M., Hoang, T.C. 2018: *Microplastic ingestion by Daphnia magna and its enhancement on algal growth*. Science of The Total Environment. 633:500-507
- Claessens, M., Van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, M. B., Janssen, C. R. 2013: *New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms*. Marine Pollution Bulletin. 70:227–233.
- Costa, J.P., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T.A.P. 2017: *Chapter 1-microplastics - occurrence, fate and behaviour in the environment*. Comprehensive Analytical Chemistry. 75:1-24
- Cox, K. D., Covernton, G. A., Davies, H. L. 2019: *Human consumption of microplastics*. Environmental Science and Technology. 53: 7068-7074.
- Dandová, K., 2019: *Hodnocení ekotoxicity odpadů*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta životního prostředí, Praha, 57 s (bakalářská práce). „nepublikováno“. Dep. SIC ČZU v Praze.

- Daphnia pulex. (online) [cit. 2021.03.03], dostupné z https://animaldiversity.org/accounts/Daphnia_pulex/
- de Souza Machado, A.A., Kloas, W., Zarfl, C., Hempel, S., Rillig, M. C. 2018. *Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems*. *Global Change Biology*. 24:1405–1416.
- Derraik, J.G.B. 2002: *The pollution of the marine environment by plastic debris: a review*. *Marine Pollution Bulletin* 44: 842–852.
- Eerkes-Medrano, D., Thompson, R.C., Aldridge, D.C. 2015: *Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs*. *Water Research*. 75:63–82.
- Fargašová, A. 2009: *Ekotoxikologické biotesty*. Bratislava: Perfekt. 317 s. ISBN 978-80-8046-422-6.
- Felsing, S., Kochleus, C., Buchinger, S., Brennholt, N., Stock, F., Reifferscheid, G. 2018: *A new approach in separating microplastics from environmental samples based on their electrostatic behavior*. *Environmental Pollution*, 234:20–28.
- Frydkjær, C.K., Iversen, N., Roslev, P. 2017: *Ingestion and egestion of microplastics by the cladoceran Daphnia magna: effects of regular and irregular shaped plastic and sorbed phenanthrene*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 99:655-611.
- Fuller, S., Gautam, A. 2016: *A Procedure for Measuring Microplastics using Pressurized Fluid Extraction*. *Environmental Science and Technology*, 50:5774–5780.
- García Viruez, J.L. 2020: *Water pollution by microplastics generated by washing machine*. *Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta životního prostředí, Praha*. 76 s. (diplomová práce). „nepublikováno“. Dep. SIC ČZU v Praze.
- Gross, M., Zhao, X., Mascarenhas, V., Wen, Z. 2016: *Effects of the surface physico-chemical properties and the surface textures on the initial colonization and the attached growth in algal biofilm*. *Biotechnology for Biofuels*. 9:2-14.
- Heinrich, P., Braunbeck, T. 2019: *Microplastic testing in vitro: Realistic loading of pollutants, surfactant-free solid surphase-dosing and bioanalytical detection using a sensitivity-optimised EROD assay*. *Toxicology in Vitro*. 54:194–201.
- Hoffman, D. J. 2003: *Handbook of ecotoxicology*. 2nd edition. Lewis publishers. 1290 s. ISBN 1-56670-546-0.

- Horák, J., Linhart, I., Klusoň, P. 2012: *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Praha : VŠCHT. 187 s. ISBN 80-7080-548.
- Hrotnatka obecná. (online) [cit. 2021.03.03], dostupné z https://rybicky.net/atlasostatnich/hrotnatka_obecna
- Hřibová, Š. 2011: *Využití alternativních testů ekotoxicity pro posouzení kontaminovaných environmentálních matric*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická. (bakalářská práce). „nepublikováno“. 55 s.
- Jemec, A., Horvat, P., Kunej, U., Bele, M., Krzan, A. 2016: *Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean Daphnia magna*. Environmental Pollution. 219:201-209.
- Jemec Kokalj, A., Kunej U., Skalarb. T. 2018: *Screening study of four environmentally relevant microplastic pollutants: Uptake and effect on Daphnia magna and Artemia franciscana*. Chemosphere. 208:522-529.
- Judy, J. D., Williams, M., Gregg, A., Oliver, D., Kumar, A., Kookana, R., Kirby, J. K., 2019: *Microplastics in municipam mixed-waste organic outputs induce minimal short to long-term toxicity in key terrestrial biota*. Environmental Pollution. 252:522–531.
- Kočí, V. 2006: *Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí*. Chemické listy. 100 s.
- Kočí, V., Mocová, K. 2009: *Ekotoxikologie pro chemiky*. Praha : VŠCHT. 199 s. ISBN 978-80-7080-699-9.
- Koelmans, A. A., Nor, N. H. M., Hermsen, E., Kooi, M., Mintenig, A. M., De France, J. 2019: *Microplastics in freshwaters and drinking water: critical review and assessment of data quality*. Water Research. 155: 410-422.
- Koláček, T. 2015: *Využití hrotnatky Daphnia magna v ekotoxikologických biotestech*. Živa. 6:131.
- Kožišek F., Kazmanová, H. 2019: *Mikroplasty v životním prostředí a zdraví*. Vodní hospodářství.
- Kumar, R.V., Kanna, G.R., Elumalai, S. 2017: *Biodegradation of polyethylene by green photosynthetic microalgae*. Journal of Bioremediation and Biodegradation. 8:381.
- Lambert, S., Scherer, Ch., Wagner, M. 2017: *Ecotoxicity testing of microplastics: Considering the heterogeneity of physicochemical properties*. Integrated Environmental Assessment and Management. 13:470-475.

- Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. Věstník MŽP. č. 4/2007.
- Mikroplasty. (online) [cit. 2021.03.03], dostupné z <https://echa.europa.eu/cs/hot-topics/microplastics>
- Newman, M.C. 2010: *Fundamentals of ecotoxicology 3rd ed.* Taylor and Francis Group. ISBN 978-1-4200-6704-0
- Pivokonský, M. 2018: *Plasty v pitné vodě - realita nebo Fake News.* Akademie věd České republiky. [online]. 2018 [cit. 2021-03-15]
- Pivokonský, M., Čermaková, L., Novotná, K., Peer, P., Cajthaml, T., Janda, V., 2018: *Occurrence of microplastics in raw and treated drinking water.* Science of the Total Environment. 643:1644–1651.
- PlasticsEurope - Plastics - the Facts, 2016. (online) [cit. 2021.03.03], dostupné z <https://www.plasticseurope.org/application/files/4315/1310/4805/plastic-the-fact-2016.pdf>
- Prata, J.C. 2018: *Airborne microplastics: Consequences to human health?* Environmental Pollution 234:115-126,
- Prata, J.C., Reis, V., Matos, T.V., Costa, P., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T. 2019: *A new approach for routine quantification of microplastic using Nile Red and automated software (MP-VAT).* Science of The Total Environment. 690:1277-1283.
- Rillig, M.C. 2012: *Microplastic in Terrestrial Ecosystems and the Soil?* Environmental Science and Technology. 46:6453-6454.
- Rocha-Santos, T., Duarte, A. C. 2015: *A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment.* Trends in Analytical Chemistry. 65:47–53.
- Sedlák, E. 2002: *Zoologie bezobratlých, 2. vyd.* Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2002, 336 s.
- Sieratowicz, A., Kaiser, D., Behr, M., Oetken, M., Oehlmann, J. 2011: *Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for *Desmodesmus subspicatus* and *Daphnia magna*.* Journal of Environmental Science and Health. 46: 1311-1319.
- Silva, A. B., Bastos, A. S., Justino, C. I. L., da Costa, J. P., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T.A.P. 2018: *Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry – a review.* Analytica Chimica Acta. 1017:1-19

- Sládeček, V., Sládečková, A., Ambrožová, J.: *Thamnocephalus platyurus jako testovací organismus*. Sborník konference „Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí“, Chelčice, 1997, s. 96 - 99.
- Spieker, J. 2004: *Was lebt im Schwimmteich?* Der Schwimmteich. 3:76 -79.
- Suthers, I., Rissik, D., Richardson, A. 2019: *Plankton Guide to Their Ecology and Monitoring for Water Quality*. ISBN 9780367030162
- Truhaut, R. 1997: *Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2:151-173.
- Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., Janssen, C. R. 2013: *Microplastic pollution in deep-sea sediments*. Environmental Pollution. 182:495–499.
- Vethaak, A.D., Leslie, A. 2016. *Plastic Debris Is a Human Health Issue*. Environmental Science and technology. 13:6825-6826
- Vollertsen, J. 2016-2020: *Overview of methods and challenges for microplastic analysis*. Prezentace projektu BASEMAN, Aalborg University.
- Vyhláška č. 94/2016 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů.
- Vyhláška 8/2021 Sb., o katalogu odpadů a posuzování vlastností odpadů (Katalog odpadů).
- Wagner, M., Scherer, Ch., Alvarez-Muñoz, D. 2014: *Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know*. Environmental Sciences Europe. 26:1
- Wang, Z., Lin, T., Chen, W., 2019: *Occurrence and removal of microplastics in an advanced drinking water treatment plant (ADWTP)*. Science of the Total Environment 700:3740-3751.
- Wimmerová, L., Henzlová, L., Lexa, M., 2020: *Mikroplasty ve vodách – jejich analýza a toxicita pro vodní organismy*. Vodní hospodářství.
- Wright, S.L., Thompson, R.C., Galloway, T.S. 2013: *The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review*. Environmental Pollution 178: 483–492.
- Yule, C.M., Sen, Y.N. 2004: *Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region*. Kuala: Academy of Sciences of Malaysia. 274 - 283.
- Zhao, Ch.M., Wang, W.X. 2010: *Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to Daphnia magna*. Environmental Toxicology. 30:885-892

Zhao, S., Zettler, E.R., Amaral-Zettler, L.A. 2020: *Microbial carrying capacity and carbon biomass of plastic marine debris*. The ISME Journal. 15:67-77

Zhou, Q., Zhang, H., Fu, C., Zhou, Y., Dai, Z., Li, Y., Luo, Y. 2018: *The distribution and morphology of microplastics in coastal soils adjacent to the Bohai Sea and the Yellow Sea*. Geoderma, 322:201–208.

9. Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obr.č. 1: Faktory vstupující do předmětu zájmu při studiu mikroplastů (Lambert et al. 2017; upraveno autorkou práce).....	15
Obr.č. 2: Tvary mikroplastů (Vollertsen, ©2016-2020; upraveno autorkou práce)	15
Obr.č. 3: Tvary mikroplastů a jejich početnost v 55 publikovaných studiích (Koelmans et al. 2019; upraveno autorkou práce).....	16
Obr.č. 4: Typy mikroplastů a jejich početnost v 55 publikovaných studiích (Koelmans et al. 2019; upraveno autorkou práce).....	16
Obr.č. 5: Schéma vazeb mezi odpověďmi na různých organizačních úrovních (Newman, 2010; upraveno autorkou práce)	17
Obr.č. 6: Potenciální možnost vazby škodlivých perzistentních látek na mikroplasty (Pivokonský, 2018)	18
Obr.č. 7: Závislost velikosti mikročástic a použité analytické metody (původní zdroj Vollertsen ©2016–2020; upraveno Wimmerová et al., 2020)	22
Obr.č. 8: Porovnání mikroplastových částic zachycených vizuálně a Ramanovou spektrometrií k celkovému počtu a dle velikosti (Silva et al. 2017; upraveno autorkou práce).....	22
Obr.č. 9: DaphToxKit F (Microbiotest, ©2021).....	32
Obr.č. 10: <i>Daphnia magna</i> (zvětšení 4x10).....	33
Obr.č. 11: <i>Daphnia pulex</i> (zvětšení 4x10).....	33
Obr.č. 12: ThamnoToxkit F (Microbiotest, ©2021).....	34
Obr.č. 13: <i>Thamnocephalus platyurus</i> (zvětšení 4x10).....	34
Obr.č. 14: Polyesterová vlákna (do 5mm) (García Viruez, 2020).....	36
Obr.č. 15: FMB částice 1-5 µm (Cospheric LLC, USA).....	36
Obr.č. 16: PHYTOTESTKIT (Microbiotest, Belgie, ©2021; upraveno autorkou práce).....	38
Obr.č. 17: Živný roztok a FMB částice na testovacím filtru.....	39
Obr.č. 18: <i>Thamnocephalus platyurus</i> , kontrolní vzorek (zvětšení 4x10).....	42
Obr.č. 19: <i>Thamnocephalus platyurus</i> , kontrolní vzorek pod UV světlem (zvětšení 4x10)....	42
Obr.č. 20: <i>Thamnocephalus platyurus</i> , vlákna (zvětšení 4x10).....	43
Obr.č. 21: <i>Thamnocephalus platyurus</i> , vlákna pod UV světlem (zvětšení 4x10).....	43

Obr.č. 22: <i>Thamnocephalus platyurus</i> , FMB částice (zvětšení 4x10).....	44
Obr.č. 23: <i>Thamnocephalus platyurus</i> , FMB částice pod UV světlem (zvětšení 4x10).....	44
Obr.č. 24: <i>Daphnia magna</i> , kontrolní vzorek (zvětšení 4x10).....	46
Obr.č. 25: <i>Daphnia magna</i> , kontrolní vzorek pod UV světlem (zvětšení 4x10).....	46
Obr.č. 26: <i>Daphnia magna</i> , vlákna (zvětšení 4x10).....	47
Obr.č. 27: <i>Daphnia magna</i> , vlákna pod UV světlem (zvětšení 4x10).....	47
Obr.č. 28: <i>Daphnia magna</i> , FMB částice (zvětšení 4x10).....	48
Obr.č. 29: <i>Daphnia magna</i> , FMB částice pod UV světlem (zvětšení 4x10).....	48
Obr.č. 30: <i>Daphnia pulex</i> , kontrolní vzorek (zvětšení 4x10).....	50
Obr.č. 31: <i>Daphnia pulex</i> , kontrolní vzorek pod UV světlem (zvětšení 4x10).....	50
Obr.č. 32: <i>Daphnia pulex</i> , vlákna (zvětšení 4x10).....	51
Obr.č. 33: <i>Daphnia pulex</i> , vlákna pod UV světlem (zvětšení 4x10).....	51
Obr.č. 34: <i>Daphnia pulex</i> , FMB částice (zvětšení 4x10).....	52
Obr.č. 35: <i>Daphnia pulex</i> , FMB částice pod UV světlem (zvětšení 4x10).....	52
Obr.č. 36: <i>Sinapis alba</i> , vlákna a živný roztok.....	54
Obr.č. 37: <i>Sinapis alba</i> , FMB částice a živný roztok.....	54
Obr.č. 38: <i>Sinapis alba</i> a živný roztok.....	54
Obr.č. 39: <i>Sinapis alba</i> a deionizovaná voda.....	54
Obr.č. 40: Vlevo <i>Daphnia magna</i> s mladým jedincem, vpravo stejný případ po UV světlem, ve střevě dospělce jsou patrné FMB částice (zvětšení 4x10).....	56
Obr.č. 41: Vlákno a <i>Daphnia magna</i>	56
Obr.č. 42: Vlákno a <i>Daphnia magna</i>	56
Obr.č.43: Porovnání velikosti mikroplastového vlákna a jedince druhu <i>Daphnia magna</i> (zvětšení 4x10).....	58
Obr.č.44: <i>Daphnia magna</i> s možnou přítomností vláken (zvětšení 4x10).....	59
Tab.č. 1: Požadavky na výsledky zkoušek ekotoxicity (vyhláška 8/2021 Sb.).....	26
Tab.č. 2: Počty jedinců <i>Thamnocephalus platyurus</i> v průběhu výzkumu.....	41
Tab.č. 3: Počty jedinců <i>Daphnia magna</i> v průběhu výzkumu.....	45

Tab.č. 4: Počty jedinců <i>Daphnia pulex</i> v průběhu výzkumu.....	49
Tab.č. 5: Naměřená délky kořenů <i>Sinapis alba</i> (mm) pro jednotlivé varianty testů.....	53
Tab.č. 6: Výsledky pro test na <i>Aliivibrio fischeri</i> (Biotechnologická laboratoř DEKONTA, a.s., protokol o zkoušce 535/2020).....	55
Graf č. 1: Počty jedinců ve vzorcích v průběhu výzkumu.....	45
Graf č. 2: Počty jedinců ve vzorcích v průběhu výzkumu.....	49
Graf č. 3: Průměrné délky kořene <i>Sinapis alba</i> (mm) pro jednotlivé vzorky.....	53