



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

## POSOUZENÍ ÚČINKŮ PHB NA ORGANISMÁLNÍ A SUBORGANISMÁLNÍ ÚROVNI PROSTŘEDNICTVÍM E. FETIDA

ASSESSMENT OF PHB EFFECTS AT ORGANISMAL AND SUB-ORGANISMAL LEVELS THROUGH E.  
FETIDA.

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

**Bc. Kristína Demová**

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

**doc. MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**

**BRNO 2023**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1862/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany  
životního prostředí  
Studentka: **Bc. Kristína Demová**  
Studijní program: Environmentální chemie a technologie  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **doc. MVDr. Helena Zlámalová**  
**Gargošová, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Posouzení účinků PHB na organismální a suborganismální úrovni prostřednictvím *E. fetida*

### Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši týkající se využití zástupce půdních bezobratlých v testech ekotoxicity se zaměřením na *E. fetida*.
2. Realizovat vybrané ekotoxikologické testy s mikroplasty PHB na *E. fetida* (žížale hnojní).
3. Zavést metodu na stanovení vybraného biomarkeru oxidativního stresu a tuto využít při hodnocení tkání testovacích organismů.
4. Vyhodnotit získané výsledky a posoudit vhodnost využití biomarkeru pro hodnocení účinků vybraného biodegradabilního plastu.

### Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Kristína Demová  
studentka

-----  
doc. MVDr. Helena Zlámalová  
Gargošová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

V súčasnosti sa dostáva do popredia využívanie biodegradabilných plastov, ktoré vlastnosťami konkurujú syntetickým plastom a majú schopnosť sa úplne degradovať pôsobením mikroorganizmov. V reálnych podmienkach ich biodegradácia neprebieha vždy podľa očakávaní, a tak môžu tieto plastové častice pretrvávajúť v životnom prostredí dlhú dobu. Preto je overovanie nezávadnosti týchto plastov predmetom mnohých štúdií. Rovnako to bolo cieľom aj predloženej diplomovej práce, ktorá sa zaoberá vplyvom mikročastíc poly-3-hydroxybutyrátu (zástupca biodegradabilných plastov) na organizmus *Eisenia fetida* (zástupca pôdných organizmov). Jeho účinky boli posudzované pomocou klasických ekotoxikologických testov. Taktiež boli zavedené a realizované metódy na pozorovanie účinkov na suborganizmálnej úrovni – pomocou vybraných biomarkerov. Zo získaných výsledkov nebol preukázaný žiaden významný vplyv skúmaného biodegradabilného plastu na testovací organizmus *E. fetida*, ale zavedené metódy môžu byť do budúcnosti využiteľné pre získanie viacerých výsledkov k relevantnému posúdeniu efektu na suborganizmálnej úrovni organizmu.

## **ABSTRACT**

The use of biodegradable plastics, which are competitive with synthetic plastics and have the ability to be completely degraded by micro-organisms, is gaining ground. In real life conditions, biodegradation does not always proceed as expected, and these plastic particles may persist in the environment for long periods of time. Therefore, the verification of the safety of these plastics is the subject of many studies. This was also the aim of the present thesis, which deals with the impact of poly-3-hydroxybutyrate microparticles (representative of biodegradable plastics) on the organism *Eisenia fetida* (representative of soil organisms). Its effects were assessed using classical ecotoxicological tests. Methods to observe effects at the sub-organism level - using selected biomarkers - were also introduced and implemented. From the obtained results, no significant effect of the investigated biodegradable plastic on the test organism *E. fetida* was demonstrated, but the introduced methods can be used in the future to obtain more results to assess the effect at the sub-organismal level of the organism in a relevant way.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

biodegradabilné plasty, polyhydroxybutyrát, ekotoxikologické testy, *Eisenia fetida*, oxidačný stres, biomarkery

## **KEYWORDS**

biodegradable plastics, polyhydroxybutyrate, ecotoxicological tests, *Eisenia fetida*, oxidative stress, biomarkers

DEMOVÁ, Kristína. *Posouzení účinků PHB na organismální a suborganismální úrovni prostřednictvím E. fetida*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/147684>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Helena Zlámalová Gargošová.

## PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brně a môže byť využitá na komerčné účely len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študenta

## POĎAKOVANIE

Touto cestou by som rada poďakovala vedúcej práce pani doc. MVDr. Helene Zlámalovej Gargošovej, Ph.D. za odborné rady, trpezlivosť a ústretový prístup pri spracovaní diplomovej práce. Poďakovanie patrí aj konzultantke práce Ing. Petre Procházkovej za všestrannú pomoc, ochotu a optimizmus. Na záver chcem poďakovať svojej rodine a priateľovi, že mi boli obrovskou oporou počas celého štúdia.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>Ekotoxikológia</b> .....	<b>8</b>
2.1.1	Ekotoxikologické testy .....	8
2.1.2	Rozdelenie ekotoxikologických testov .....	9
2.1.3	Princíp prevedenia testu toxicity .....	9
2.1.4	Ekotoxikologické indexy .....	10
<b>2.2</b>	<b>Úrovně ekotoxikologických účinkov</b> .....	<b>10</b>
2.2.1	Ekotoxikologické testy na organizmálnej úrovni.....	10
2.2.2	Posúdenie ekotoxicity na suborganizmálnej úrovni.....	11
<b>2.3</b>	<b>Dážďovky ako pôdny testovací organizmus</b> .....	<b>17</b>
2.3.1	Pôda ako prostredie a produkt pre pôdne organizmy .....	17
2.3.2	Dážďovka hnojná ( <i>Eisenia fetida</i> ) .....	18
2.3.3	Ekotoxikologické testy na dážďovkách.....	22
2.3.4	Využitie biomarkerov dážďoviek .....	24
<b>2.4</b>	<b>Mikroplasty v životnom prostredí</b> .....	<b>25</b>
2.4.1	Mikroplasty a ich vplyv na pôdne ekosystémy.....	25
2.4.2	Bioplasty .....	27
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Použité prístroje a pomôcky</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>Testovaná látka a jej príprava</b> .....	<b>32</b>
3.2.1	Voľba koncentračnej rady testovanej látky .....	32
3.2.2	Referenčná látka.....	33
<b>3.3</b>	<b>Metodiky ekotoxikologických testov na organizmálnej úrovni</b> .....	<b>33</b>
3.3.1	Chov dážďoviek .....	33
3.3.2	Príprava artificálnej pôdy na testy .....	33
3.3.3	Príprava pred nasadením testu .....	34
3.3.4	Test akútnej toxicity .....	37
3.3.5	Test chronickej toxicity a reprodukčného správania.....	40
3.3.6	Dážďovky ako vzorky pre ďalšie využitie .....	42
<b>3.4</b>	<b>Zavedenie vybraných testov na suborganizmálnej úrovni</b> .....	<b>42</b>
3.4.1	Príprava vzoriek - homogenizácie tkaniva .....	42
3.4.2	Stanovenie koncentrácie proteínov Lowryho metódou.....	44
3.4.3	Stanovenie aktivity enzýmu katalázy .....	46
3.4.4	Stanovenie peroxidácie lipidov pomocou TBARS .....	47
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA</b> .....	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Ekotoxikologické testy na organizmálnej úrovni</b> .....	<b>50</b>
4.1.1	Test s referenčnou látkou.....	50
4.1.2	Test akútnej toxicity .....	51
4.1.3	Test chronickej toxicity .....	55

<b>4.2</b>	<b>Zavedené testy na suborganizmomálnej úrovni.....</b>	<b>58</b>
4.2.1	Koncentrácie proteínov stanovené Lowryho metódou.....	59
4.2.2	Aktivity enzýmu katalázy .....	59
4.2.3	Peroxidácia lípidov stanovená pomocou TBARS.....	62
<b>4.3</b>	<b>Zhodnotenie získaných výsledkov .....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>ZÁVER.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>ZOZNAM PRÍLOH.....</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>PRÍLOHY .....</b>	<b>78</b>

# 1 ÚVOD

Problematika nadmernej produkcie plastov sa spája s ťažkosťami pri ich likvidácii. Nie sú schopné sa prirodzene úplne rozložiť, iba dochádza k ich fragmentácii na menšie častice – mikro- a nanoplasty. V tejto forme sú schopné sa šíriť všetkými zložkami životného prostredia, čo môže mať vplyv na prítomné organizmy a celé ekosystémy. Za riešenie tohto problému sa považujú biodegradabilné plasty, ktoré sa majú v krátkej dobe za pomoci mikroorganizmov úplne rozložiť a nezaťažovať tak životné prostredie. Každá cudzorodá látka vstupujúca do životného prostredia však môže predstavovať potencionálne riziko a preto sú aj biodegradabilné plasty súčasťou mnohých výskumov.

Štatisticky významný efekt zástupcu biodegradabilných plastov – polyhydroxybutyrátu (PHB) – na vodný organizmus *Daphnia magna* bol potvrdený v mojej bakalárskej práci. Hoci štúdií zameraných na vplyv biodegradabilných mikroplastov v akvatickom prostredí nie je dostatok, značné medzery sú aj v štúdiách zameraných na terestrické usporiadanie. Preto bolo ideou sa v diplomovej práci zamerať na pôdny ekosystém.

Modelovým organizmom na testovanie toxicity látok v pôde je dážďovka, ktorá zohráva dôležitú úlohu v pôdnom ekosystéme. Dážďovky svojou činnosťou ovplyvňujú chemické vlastnosti a štruktúru pôdy, ale najmä procesy akým je rozklad organickej hmoty. Navyše majú schopnosť akumulovať kontaminanty pri požití alebo dermálnymi cestami. Dážďovky sú preto vhodnými indikačnými druhmi a využívajú sa v klasických ekotoxikologických testoch, kde sa prítomnosť toxikantov prejavuje narušením fyziologických funkcií – prežitie, rast, reprodukcia.

Nežiadúci efekt sa môže prejaviť aj na suborganizmolnej úrovni – predovšetkým vo forme oxidačného stresu organizmu. Ako nástroj včasného odhaľovania účinkov toxikantov slúžia rôzne biomarkery. Sú to merateľné parametre poukazujúce na biochemické zmeny vo vnútri organizmu. Oblasť využívania biomarkerov pôdnych bezstavovcov sa v súčasnosti značne rozvíja s cieľom stanovenia citlivejších metód, ktoré by mohli zachytiť včasné signály ešte skôr, ako sa toxický účinok prejaví na vyšších úrovniach biologickej organizácie.

Cieľom diplomovej práce bolo využiť tohto zástupcu pôdnych bezstavovcov – dážďovku hnojnú (*Eisenia fetida*) k realizácii ekotoxikologických testov s mikroplastmi PHB. Ďalej bolo úlohou po preštudovaní literatúry vybrať a zaviesť vhodnú metódu na stanovenie biomarkerov oxidačného stresu a využiť pri hodnotení tkaniva testovacích organizmov.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Ekotoxikológia

Toxikológia je interdisciplinárnym odborom, ktorý kombinuje poznatky z biológie, chémie, fyziky, matematiky či lekárstva. Všeobecne je známa ako veda o jedoch. Za jed sa považuje akákoľvek látka vyvolávajúca škodlivý účinok na organizmus. Toxikológia sa teda zaoberá štúdiom vplyvu jedovatých látok na človeka [1]. Naproti tomu je tu relatívne mladý odbor spájajúci toxikológiu s ekológiou – ekotoxikológia. V nej sa zameranie rozširuje na ostatné živé organizmy. Je ju preto možno všeobecne zadefinovať ako vedu, ktorá sa zaoberá vzťahmi medzi toxickými látkami, živými organizmami a prostredím. Študuje pôsobenie týchto látok na živé systémy a to na všetkých úrovniach – od bunky až po biosféru. Schopnosť látok, nepriaznivo vplývať na živé organizmy, sa označuje pojmom ekotoxicita [2]. Ekotoxicita sa najčastejšie rozlišuje v závislosti od expozície, a teda či ide o jednorazovú dávku alebo opakovanú expozíciu. Samotná akútna toxicita vystihuje iba konkrétny druh rizika a nevyplýva o celkových rizikách spájaných s danou látkou. Ale taktiež záleží na vlastnostiach danej látky a jej interakciami so živým systémom či okolím [1].

Vzhľadom k neustále sa zvyšujúcej chemizácii životného prostredia majú výstupy tohto odboru zásadný význam. Slúžia k odhadu či určaniu ekologických dopadov pri zavádzaní nových látok do životného prostredia pomocou laboratórnych testov, na druhej strane k hodnoteniu následkov činností a aktivít realizovaných v minulosti [2].

#### 2.1.1 Ekotoxikologické testy

Na hodnotenie ekotoxicity sa využívajú ekotoxikologické testy, zväčša so štandardizovaným – presne definovaným postupom. Jedná sa o laboratórne testy, v ktorých sa pozoruje vplyv chemickej látky (alebo zmesi látok) na prosperitu testovacieho systému (tkanivo, organizmus, spoločenstvo organizmov) v prirodzenom prostredí. Výsledkom je závislosť dávky toxikantu na odpovedi biosystému, ktorá je prezentovaná ekotoxikologickými indexami. Cieľom testovania je zistiť, či bude daná látka vykazovať toxický účinok. Toxickým účinkom sa rozumie akákoľvek zmena biosystému v porovnaní s variantou, ktorá by nastala bez pôsobenia toxikantu. Pozorovateľné sú hlavne zmeny na úrovni reakcií organizmu. Otázkou je tiež, do akej miery môže mať vplyv na poškodenie organizmu či celého ekosystému [2, 3].

Každý organizmus odpovedá na prítomnosť toxického látky rozličným spôsobom. Závisí to na množstve faktorov. Preto je dôležité pre správne posúdenie environmentálneho rizika testovanej látky využívať baterie testov. To znamená, že sa nevykonávajú testy len na jednom organizme, ale na rôznych druhoch reprezentujúcich funkčné zloženie ekosystému. Použitím viacerých druhov organizmov je možné detekovať skupiny toxikantov s vysokou spoľahlivosťou a získať tým komplexnejšie informácie. Zo všetkých získaných výsledkov tak možno presnejšie a objektívnejšie stanoviť celkovú toxicitu [2].

Aby bolo možné výsledky testov vzájomne porovnávať, využívajú sa štandardizované testy s presne definovanými podmienkami a postupom. Výhodou je reprodukovateľnosť testov. Štandardizované metodiky môžeme nájsť vo forme noriem, ktoré sú certifikované



medzinárodnými organizáciami. Pri ekotoxikologických testoch sa najčastejšie stretávame s ISO normami (The International Organization for Standardization) alebo OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Nevýhodou týchto testov však je, že presne definované podmienky často neodpovedajú podmienkam v prirodzenom prostredí organizmov, čo môže podstatne ovplyvňovať účinok látky v reálnom prostredí. Pre testovanie vplyvu látky v reálnych podmienkach sa môžu vykonávať terénne štúdie (priamo v teréne s reálnym ekosystémom), alebo poľné štúdie (nazývané aj mezokozmy, kedy ide o vymedzené výseky ekosystémov v reálnych podmienkach) [2].

### **2.1.2 Rozdelenie ekotoxikologických testov**

Ekotoxikologické testy sa delia na základe rôznych kritérií. K najčastejším patrí členenie podľa zložky životného prostredia, v ktorej sú testy vykonávané – na akvatické a terestrické. Čo sa týka doby expozície – ide o akútne, subchronické a chronické testy. O akútnych testoch hovoríme vtedy, keď efekt testovanej látky hodnotíme po krátkom čase – najčastejšie po 24 hodinách a testovaná látka je podaná jednorazovo. V subchronických testoch ide o dlhší časový interval, ktorý má zodpovedať 10 % z dĺžky života organizmu a organizmy sú testovanej látke vystavované opakovane. Chronické testy spočívajú v dlhodobej expozícii, kedy sa efekt testovanej látky pozoruje aj na ďalších generáciách, čím sú ich výsledky nenahraditeľné [2, 3].

Ďalej sa stretáme s delením podľa sledovanej odpovede – v bežných testoch je to mortalita, mobilita či hmotnosť, kdežto sa možno pozerať aj na fyziologické zmeny – ako aktivita enzýmov. Ďalšie typy testov sú podľa testovanej matrice, podľa druhu, spektra a trofickej úrovne testovacieho organizmu, alebo typu testovanej vzorky a spôsobu jeho prípravy [2, 3].

V neposlednom rade sa používa členenie podľa úrovne biologického materiálu, kedy sa testy vykonávajú od najnižšej suborganizmolnej až po najvyššiu úroveň ekosystémov [3].

### **2.1.3 Princíp prevedenia testu toxicity**

Postup pri testovaní látok v ekotoxikológii je presne daný. Podľa neho sa stanovuje koncentračná rada pre testovanie vybranej látky. Na začiatku sa vykonáva limitný test na zistenie, či látka vykazuje negatívne účinky. V prípade, že sa účinok neprejaví, uskutočňuje sa overovací test (potvrďuje poprípade vyvracia výsledky limitného testu). Ak sa odpoveď organizmu preukáže pozitívna (nad 10% úmrtnosťou, ktorá odpovedá prirodzenému úhynu), postupuje sa na orientačný test. Pri úhynе medzi 11–50 % sú výsledky poznamenané a v testovaní sa ďalej nepokračuje. Ak ide o mortalitu nad 50 %, vykoná sa orientačný test k definovaniu rozmedzia pôsobenia testovanej látky. Podľa získaných výsledkov sa následne zvolí koncentračná rada pre základný test. Najlepšie je, keď má minimálne 5 až 7 hodnôt, pričom najnižšia nevyvoláva žiadnu odozvu u testovacích organizmov a pri najvyššej hodnote reaguje 100 % organizmov. V prostriedku je koncentrácia blízka EC50 – hodnota vyvolávajúca efekt u 50 % organizmov [3].

Zároveň kvôli overeniu platnosti výsledkov prebiehajú testy kontrolné – bez testovanej látky. Overuje sa správnosť a dodržanie experimentálnych podmienok. Na základe výsledkov

z kontrolných testov sa vyhodnocuje test za validný alebo naopak. Podmienky platnosti vychádzajú z konkrétnych metodík [2, 3].

#### **2.1.4 Ekotoxikologické indexy**

Z vyššie vymenovaných sledovaných endpointoch sa stanovujú ekotoxikologické indexy a sú tak finálnymi výstupmi testov. Vďaka nim možno porovnávať účinky rôznych látok. Najčastejšie sa stretávame s parametrami odvodenými z krivky dávka-odpoveď. Z čoho vyplýva, že krivka popisuje závislosť odpovede testovacieho organizmu na dávke (popríklad koncentrácii) testovaného toxikantu [2].

Delia sa na indexy vypočítané a určené z vlastného pozorovania. Vypočítavajú sa pomocou interpolácie experimentálne získaných dát parametre ako – efektívna koncentrácia EC, letálna koncentrácia LC, alebo inhibičná koncentrácia IC. Za tieto skratky sa dopĺňa číselná hodnota, ktorá vyjadruje percentuálne zastúpenie organizmov, u ktorých daná látka vyvolala účinok, úhyn či inhibíciu v porovnaní s kontrolou [2, 3].

Medzi určené indexy patrí NOAEL (NOAEC) – najvyššia experimentálna dávka (koncentrácia), pri ktorej ešte nebol pozorovaný štatistický významný nepriaznivý účinok v porovnaní s kontrolou a LOAEL (LOAEC) – najnižšia experimentálna dávka (koncentrácia), pri ktorej už bol pozorovaný nežiadúci účinok. Vychádzajú zo štatistických analýz [2, 3].

## **2.2 Úrovně ekotoxikologických účinkov**

### **2.2.1 Ekotoxikologické testy na organizmálnej úrovni**

V ekotoxikológii sa uskutočňujú najčastejšie testy na úrovni organizmu. Testy prebiehajú na živých organizmoch so všetkými metabolickými funkciami. Pozorujú sa odozvy organizmov, ktoré sú viditeľné voľným okom. Okrem mortality jedincov, ide o fyziologické, behaviorálne reakcie a anatomicko-morfologické reakcie [2].

Medzi fyziologické prejavy sa zaraďuje napríklad znak poukazujúci na prosperitu organizmu v danom prostredí – rast. S tým sa spájajú parametre ako rast biomasy – rastové testy so žaburinkou menšou (*Lemna minor*), horčicou bielou (*Sinapis alba*), šalát záhradný (*Lactuca sativa*), alebo veľkosť/hmotnosť jedincov – testy toxicity s dážd'ovkou hnojnou (*Eisenia fetida*), slimákom (*Helix aspersa*). Ďalej ide o rozmnožovanie – reprodukčné schopnosti, kedy sa pozoruje počet narodených jedincov – reprodukčný test na chvostoskokoch (*Folsomia candida*) alebo perloočke veľkej (*Daphnia magna*) [2, 3].

Organizmus reaguje na podnety prostredia taktiež zmenou správania. Najčastejšie ide o poruchy mobility, čo sa spája so zníženou vitalitou až celkovým poškodením organizmu – akútny test na perloočke veľkej (*D. magna*). Ďalšími príkladmi sú netypické pohybové prejavy, či inštinktívne správanie. V niektorých prípadoch dochádza k zmenám v anatomickej stavbe či morfológii organizmu. Ide vtedy o silný vplyv toxikantu na organizmus a môže sa to prejaviť napríklad vznikom vývojových chýb alebo farebných zmien [2].

Tieto testy slúžia na vyhodnotenie akútnej až chronickej toxicity, a tým k poznaniu toxického efektu na rôznych populačných úrovniach. Tým vieme predpokladať scenáre, ktoré môžu nastať na vyšších úrovniach a tak nájsť vhodné riešenia na ich zamedzenie [2, 3].

### 2.2.2 Posúdenie ekotoxicity na suborganizmálnej úrovni

Biologický systém tvoria vzájomne prepojené organizačné úrovne (Obr. 1). Účinky prejavené na jednej úrovni môžu mať zároveň následky na úrovniach nižších alebo vyšších [4].



Obr. 1: Organizačné úrovne biologických systémov [5]

Tými častejšie využívanými testami v ekotoxikológii sú testy na organizmálnej úrovni. Pomocou nich vieme predpovedať dôsledky aj na vyšších úrovniach. No v súčasnosti sa čoraz viac dostávajú do popredia testy na úrovni buniek. Toxické účinky sa totiž prejavujú spravidla od tých najcitlivejších úrovniach – molekulárnej a biochemickej. Tieto počiatočné zmeny sa postupne môžu (ale nemusia) prejavovať do účinkov na úrovni jedinca až po celý ekosystém [4].

Oproti klasickým testom majú svoje výhody. Práve na suborganizmálnej úrovni sme schopní detekovať potenciálne nebezpečenstvo ešte skôr a pri nižších koncentráciách ako sa účinky prejavajú na úrovni celého organizmu. Takže vynikajú vysokou citlivosťou, rýchlosťou a tiež reprodukovateľnosťou [3].

Tieto testy sú považované za vhodný doplnok ku klasickým ekotoxikologickým testom. Majú veľký význam ako screeningové testy pri rozhodovaní o osude nových látok zavádzaných do životného prostredia, pretože oproti bežným testom sa znižujú náklady a pracovná záťaž testovacej procedúry [4].

O zmenách, ktoré sa v dôsledku pôsobenia testovaných látok odohrávajú vo vnútri organizmu – na suborganizmálnej úrovni – indukujú rôzne biomarkery [4].

#### 2.2.2.1 Biomarkery v ekotoxikológii

Pôvod biomarkerov je v oblasti medicíny a humánnej toxikológii, kde je biomarker definovaný ako charakteristika, prostredníctvom ktorej sa meria a hodnotí prirodzené biologické procesy alebo farmakologické reakcie na terapeutické činidlo. Ich pravidelné sledovanie poskytuje dôležité informácie o zdravotnom stave pacienta, na základe ich analýzy sa aplikujú diagnózy či liečebný režim, alebo slúžia k zisťovaniu funkčnosti liečebného protokolu [6].

Potreba vyvíjať citlivejšie testovacie metódy na predpoveď environmentálnych dopadov viedla k rozvoju a zavedeniu biomarkerov aj do ekotoxikológie. V ekotoxikológii je biologický marker, alebo biomarker definovaný ako biochemická a histologická odpoveď poukazujúca vychýlenie z normálneho stavu organizmu. Sú to merateľné parametre, ktorých zmeny sú včasnými varovnými signálmi vyvolanými expozíciou cudzorodej látky. Ide o meranie takých signálov, ktoré na úrovni celého organizmu ešte nie sú viditeľné. Tak slúžia ako prvotné indikátory toxického účinku [3, 4].

Vo všeobecnosti sa biomarkery klasifikujú ako biomarkery expozície, účinku a citlivosti. Biomarkery expozície poskytujú informáciu o prítomnosti a množstve toxickej látky, ktorá prenikla do organizmu. Biomarkery účinku poukazujú na vplyv toxikantu v cieľových tkanivách na základe merateľných biochemických, fyziologických či patologických zmien organizmu. Taktiež podávajú hodnotenie miery poškodenia organizmu. Biomarkery citlivosti poukazujú na toxikant pomocou vrodenej alebo získanej schopnosti organizmu špecificky reagovať na expozíciu konkrétnej látky. Biologické rozdiely medzi organizmami zapríčiňujú, že niektorí sú náchylnejší na efekt daného prostredia a tak môžu slúžiť ako markery citlivosti [3, 4]. Táto špecifickosť biomarkerov môže byť od vysoko špecifických – ako napríklad indukcia metalotioneínu kovom (Cd, Cu, Hg, Zn), až po tie ktoré nie sú špecifické – poškodenie imunitného systému alebo DNA [7].

Keďže sa jedná o sledovanie veľmi špecifických signálov organizmu, kedy môže ísť napríklad len o jeden biochemický dej, nie vždy je možné jednoznačne interpretovať tento efekt aj na úroveň celého organizmu [3]. Biochemické reakcie ktoré nastávajú v organizme nie vždy musia znamenať negatívny účinok na úrovni celého organizmu. Pomocou opravných a adaptačných mechanizmov sa organizmy môžu buď úplne alebo aspoň do určitej miery vyrovnáť s rastúcim stresom a tak minimalizovať dôsledok na vitalitu organizmu [4]. Táto schopnosť regenerácie organizmu však so zvyšujúcou sa dĺžkou expozície klesá. Preto sú tieto testy náročné v tom, že je dôležité testovať vždy viacero biochemických reakcií prebiehajúcich v organizme a následne efekty potvrdiť alebo vyvrátiť testami na organizmálnej úrovni – pre objektívne vytváranie záverov o bezpečnosti sledovanej látky [8].

Voľba správneho biomarkeru pri testovaní je veľmi dôležitá. Postup metodiky by mal byť spoľahlivý a špecifický (bez potenciálnych interferencií), aby bola zabezpečená kvalita výsledkov. Biomarker by mal byť vysoko citlivý na expozíciu testovanej látky, aby bolo možné zistiť spôsobené zmeny. Zároveň by mala byť analýza biomarkeru aj cenovo dostupná a ľahko vykonateľná pre jednoduchšiu reprodukovateľnosť [9].

Používanie biomarkerov ako nástrojov na hodnotenie účinkov znečistenia je čoraz častejší. Niektoré biomarkery sú zahrnuté už aj v programoch monitorovania životného prostredia. Za najčastejšie využívané biomarkery možno označiť biomarkery oxidačného stresu [8].

### **2.2.2.2 Biomarkery oxidačného stresu**

Pre pochopenie významu biomarkerov indukujúcich oxidačný stres u organizmov, je potrebné uviesť procesy odohrávajúce sa v organizmoch v súvislosti s týmito biomarkermi.

#### **Oxidačný stres**

Atómy alebo molekuly s jedným alebo viacerými nespárenými elektrónmi, ktoré sú schopné samostatnej existencie sa nazývajú voľné radikály. Sú reaktívne, iným látkam odoberajú elektrón a párujú ho so svojim nespáreným – tým ich oxidujú a preto nesú názov oxidanty. Môžu však pôsobiť aj redukčne – tak vznikajú voľné radikály odvodené od kyslíka (ROS). Príkladmi sú superoxidový aniónový radikál – superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ , vznikajúci jednoelektrónovou redukciou molekulárneho kyslíka) alebo hydroxylový radikál ( $\cdot OH$ , vznikajúci trojelektrónovou redukciou molekulárneho kyslíka) [10].

Voľné radikály môžu reagovať s významnými molekulami, akými sú lipidy, proteíny alebo nukleové kyseliny, a tým ich poškodzovať. Zároveň pri týchto prebiehajúcich reakciách môžu vznikajúť produkty, ktoré môžu následne spôsobovať sekundárne poškodenia. Efekt voľných radikálov v biologických systémoch je zväčša závislý od prítomnosti kyslíka. Odhliadnuc od jeho nevyhnutnosti pri syntéze ATP v organizme, je schopný tvoriť toxické reaktívne metabolity [11].

Tvorba a účinok ROS musí byť preto strážená pomocou obranných – antioxidantných systémov. Kontrola spočíva v tom, že antioxidanty vyrovnávajú hladinu ROS v organizme, a tým zabraňujú ich negatívnemu pôsobeniu. Toto sa prirodzene deje v organizme za normálnych podmienok, pretože voľné radikály vznikajú pri bežných metabolických aktivitách. Môže však nastať scenár, kedy antioxidantný systém zlyhá, pretože nie je schopný neutralizovať nadmernú produkciu ROS v organizme. Takýto nadmerný nárast ROS býva v prípadoch, keď je organizmus vystavený zvýšenému stresu. Vtedy sa vychýli rovnováha v organizme v prospech ROS a nastane stav zvaný oxidačný stres. To, ako výrazne môže oxidačný stres spôsobiť poškodenie závisí od viacerých faktorov. Dôležitý je jednak druh poškodzovanej molekuly, mechanizmus, ktorým k poškodzovaniu dochádza, ale aj typ oxidačného stresu [4, 11].

Výskumy z lekárskej oblasti, kde oxidačný stres môže byť spúšťačom rôznych ochorení (infekcie, Alzheimerova choroba, rakovina), viedli v posledných desaťročiach k záujmu o sledovanie tohto procesu v organizmoch. V ekotoxikológii sa oxidačný stres spája s reprodukčnou dysfunkciou ako aj s dĺžkou života, pričom kolísanie produkcie voľných radikálov ovplyvňujú napríklad sezónne výkyvy alebo zdroje potravy a okolité podmienky počas jednotlivých vývojových štádií. Ovplyvňujúcimi podmienkami či faktormi sa rozumejú napríklad teplota, nedostatok kyslíka, UV žiarenie a taktiež rôzne znečisťujúce látky. Množstvo ekotoxikologických štúdií využívajúcich oxidačné biomarkery koreluje účinky mikro- a nanočasticiam, pesticídom a polycyklickým aromatickým uhl'ovodíkom (PAH) na oxidačné procesy v organizme [4].

### **Biomarkery, ako indikátory oxidačného stresu**

Oxidačný stres v organizme môžeme identifikovať pomocou špecifických reakcií, ktoré sme schopní merať. Metódy a techniky sa neustále vyvíjajú a dostávajú sa v ekotoxikológii do popredia [4].

Podľa rozdelenia antioxidantných systémov môžeme rozdeliť aj biomarkery stanovované pri oxidačnom strese. Výsledný vplyv voľných radikálov na organizmus zahrňuje obranné odpovede ako napríklad – nárast aktivity antioxidantných enzýmov. Ďalej sa môžu alterovať koncentrácie neenzymatických látok, ktoré sú dôsledkom zvýšených prejavov toxicity oxidantov – inhibícia určitých enzýmov či vznik špecifických produktov oxidácie lipidov, proteínov alebo nukleových kyselín [4].

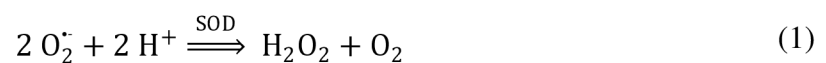
Antioxidantná obrana pozostáva z rady enzymatických a neenzymatických mechanizmov. Enzymatické antioxidanty, ktoré katalyzujú reakcie premieňajúce v konečnom dôsledku voľné radikály na vodu, sú predovšetkým superoxid-dismutáza (SOD), kataláza (CAT), glutatión peroxidáza (GPx), glutatión-S-transferáza (GST), cytochrómoxidáza a DT-Diaforáza.

Ku neenzymatickým systémom, ktoré pomáhajú eliminovať voľné radikály, sa zaraďujú glutatión (GSH), koenzým Q, bilirubín, ceruloplazmín, nikotínamid [4, 10].

Antioxidanty sa rozdeľujú podľa miesta ich najčastejšieho výskytu na dve základné skupiny: hydrofilné (cytoplazma), kde pôsobia napríklad kyselina močová alebo askorbová; lipofilné (membrány), ktorými predstaviteľmi sú karotenoidy alebo tokoferoly. Ich obsah je v tkanivách, rôznych orgánoch a druhoch organizmov rozličný [10].

- **Superoxiddismutáza (SOD)**

Superoxiddismutáza sa radí medzi najúčinnšie intracelulárne antioxidantné enzýmy a patrí do skupiny oxidoreduktáz. Špecificky katalyzuje dismutáciu superoxidového aniónového radikálu  $O_2^{\cdot-}$  na menej reaktívny  $H_2O_2$  a molekulový  $O_2$ , pričom  $H_2O_2$  je ďalej odstraňovaný katalázami a peroxidázami (rovnica 1) [10]:



Superoxidový anión je produkovaný počas prirodzeného aeróbného metabolizmu. V niektorých prípadoch však môže byť toxický a preto je SOD nevyhnutným enzýmom. Zohráva dôležitú úlohu pri inhibícii syntézy peroxydusitanu a mitochondriálnych dysfunkcií [12].

Je to enzým obsahujúci 1 alebo 2 rôzne atómy prechodného kovu (v určitom oxidačnom stupni) – metaloenzým. Tvorí teda niekoľko izoform: Cu/Zn-SOD (výskyt v cytoplazme, jej aktivitu neovplyvňuje oxidačný stres), Mn-SOD (výskyt v mitochondriách, oxidačný stres zvyšuje jej aktivitu), EC-SOD (Cu/Zn extracellular-SOD, s výskytom v extracelulárnych tkanivách) a forma Fe-SOD (výskyt v niektorých baktériách a rastlinách). Tieto kovy sa podieľajú na prechode elektrónových nábojov počas katalýzy  $O_2^{\cdot-}$  dismutačnej reakcie [13].

Aktivita SOD sa považuje za rýchly a spoľahlivý biomarker oxidačného stresu. Väčšina postupov na stanovenie sa uskutočňuje nepriamymi metódami. Môže ísť o metódu založenú na reakcii xantínoxidázy s xantínom, pričom vzniká superoxidový radikál. Ten následne reaguje s tetrazoliovou soľou za tvorby červeno sfarbeného formazánu. Proces prebieha pri 37 °C a výsledný produkt sa detekuje spektrofotometricky pri 505 nm. Aktivita SOD vyplýva zo stupňa inhibície prebiehajúcej reakcie [12].

- **Kataláza (CAT)**

Kataláza je hlavný enzým zodpovedný za rozklad peroxidu vodíka na vodu a molekulárny kyslík. Peroxid vodíka v organizme vzniká dvojelektrónovou redukciou kyslíka, takže sa zaraďuje medzi reaktívne formy kyslíka a môže spôsobovať poškodenie buniek [10].

Mechanizmus účinku katalázy (2) znázorňujú 2 kroky: disociáciou sa kataláza najprv oxiduje na medziprodukt hypervalentného železa (zlúčenina I, oxoferrylporfyrínový kationový radikál, dvojelektrónový oxidačný produkt hemovej skupiny), zlúčenina I následne reaguje s druhou molekulou  $H_2O_2$  a redukuje sa späť na molekuly katalázy, vody a kyslíka [14].



Kataláza má jednu z najvyšších rýchlostí premeny zo všetkých enzýmov. Navyše dokáže detoxikovať aj iné nebezpečné látky, rozkladať peroxydusitan a oxidovať oxid dusnatý (voľný radikál) na dusičnany [14]. U živočíchov sa vyskytuje vo všetkých hlavných tkanivách, s najvyššou aktivitou v pečeni a erythrocytoch. Zvyčajne sa nachádza v bipolárnom prostredí buniek v organelách – peroxizómoch [15].

Podľa štruktúry a sekvencie sú katalázy delené do 3 typov: typické katalázy (najrozšírenejšie), katalázy-peroxidázy (menej účinná, no pôsobí aj ako peroxidáza) a mangánové katalázy (narozdiel od prvých dvoch neobsahuje hemové prostetické skupiny). Pre typické katalázy je charakteristické, že ide o tetramér štyroch polypeptidových reťazcov, pričom každý má dĺžku viac ako 500 aminokyselín. To, čo umožňuje enzýmu reagovať s peroxidom vodíka sú štyri porfyrínové hemové skupiny [15].

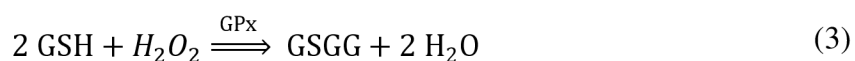
Aktivitu katalázy je možné určiť v rôznych biologických vzorkách, ako sú napríklad erythrocyty, plazma alebo tkaninové homogenáty. Techniky na stanovenie zahŕňajú kolorimetrické metódy, chemiluminiscenciu, plynovú chromatografiu, vysokoučinnú kvapalinovú chromatografiu, polarimetriu a iné. Avšak najčastejšou je UV-Vis spektrofotometria, hlavne vďaka jednoduchosti, časovej a finančnej nenáročnosti. Podstatou je meranie hladiny katalázy po heterolytickom štiepení peroxidu vodíka obsiahnutého vo vzorke. Aktivita enzýmu je potom úmerná rozdielu absorbancií v priebehu času [12].

- **Glutatiónpoxidáza (GPx)**

Skupinou enzýmov, ktoré taktiež katalyzujú rozklad peroxidov sú peroxidázy. Okrem toho sa podieľajú aj na ďalších bunkových funkciách – od ochrany pred oxidačným poškodením až po riadenie bunkových procesov (apoptóza, rast a signalizácia) [16].

Glutatiónpoxidáza GPx sa vyskytuje v živočíšnych bunkách a môže byť vo forme Se-dependentná a Se-independentná. Tieto dve formy sa od seba odlišujú počtom podjednotiek a katalytickým mechanizmom. Se-independentná forma (glutathion-S-transferáza GST) je katalyzátorom detoxikácie rôznych xenobiotík. Se-dependentná (GPx) pozostáva zo 4 podjednotiek a každá vo svojom aktívnom centre obsahuje 1 atóm selénu. Vyskytuje sa v cytoplazme a mitochondriách buniek, najvyššia aktivita je v pečeni [10].

Úloha enzýmov GPx spočíva v redukcii peroxidu vodíka za pomoci GSH (ktorý je redukovanou formou glutatiónu a v bunkách je prítomný vo vysokej koncentrácii) na vodu. Súčasne GPx oxiduje GSH za vzniku oxidovaného glutatiónu GSSG. Redukcia prebieha podľa reakčnej rovnice (3):



Tiež je schopný redukovať hydroperoxydy lipidov a iné rozpustné hydroperoxydy po ich uvoľnení z membránových lipidov [10].

Na vyhodnotenie aktivity glutatiónpoxidázy v biologických tkanivách je možné použiť dve metódy. Prvá zahŕňa priame meranie glutatiónu (GSH) polarografickou analýzou. V druhej metóde sa oxidovaný glutatión GSSG redukuje glutatiónereduktázou (GR) a NADPH za vzniku NADP<sup>+</sup>, čo je spojené s poklesom absorpcie pri 340 nm. To poskytuje spektrofotometrické monitorovanie a aktivita GPx je priamoúmerná rýchlosti poklesu absorpcie [17].

- **Glutatión (GSH)**

V ekototoxikologických testoch najčastejšie využívaným neenzymatickým oxidantom je glutatión. Patrí k intracelulárnym tiolom a pozostáva zo sulfhydrylovej skupiny (SH) a nízkomolekulárneho tripeptidu, ktorý je zložený z glycínu, cysteínu a kyseliny glutámovej. Jeho koncentrácia v bunkách je relatívne veľká a všeobecne najvýznamnejší zdroj tvorí pečeň. Vyskytuje sa v dvoch formách, a to v redukovanej (GSH) a oxidovanej (GSSG), pričom prevahu má jeho redukovaná forma [10, 18].

Významne zasahuje do detoxikačných mechanizmov ako kofaktor niekoľkých enzýmov (GPx, GST), ale je aj súčasťou iných enzýmov (glyoxyláza). V týchto podobách sa podieľa na antioxidačných procesoch proti reaktívnym formám kyslíka a dusíka [10, 18].

Glutatión možno stanoviť pomocou jednoduchšej a presnej kolorimetrickej metódy, kedy kolorimetrický substrát DTNB (kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová) reaguje s voľnou tiolovou skupinou GSH za vzniku výrazne sfarbeného produktu. Tým sa kvantitatívne určí GSH prítomný vo vzorke [18].

### **Biomarkery, ako produkty oxidačného poškodenia**

Okrem vyššie spomenutých typov antioxidačných markerov sa ako parametre oxidačného stresu využívajú biomarkery, ktoré predstavujú dôsledky pôsobenia ROS. Ide napríklad o peroxidáciu lipidov, oxidáciu proteínov alebo oxidatívne poškodenie nukleových kyselín [10, 13].

- **Peroxidácia lipidov**

Lipidy v bunke plnia základné funkcie (zásobáreň energie, stavebné štruktúry membrán, signálne molekuly) a preto ich poškodenie môže viesť až k bunčnej smrti [13]. Lipidy sú primárnymi cieľmi pre ROS, kedy ich oxidačné účinky vedú k peroxidácii lipidov [4]. Tento proces je v podobe radikálovej reťazovej reakcie, katalyzovanej prevažne iónmi prechodných kovov, ktorá najviac poškodzuje nenasýtené mastné kyseliny lipidov či zlúčeniny lipofilného charakteru [19]. Proces začína odobrátím atómu vodíka z lipidu za vzniku lipidového radikálu. Iniciátorom môže byť hydroxylový alebo alkoxylový radikál. Lipidový radikál reaguje s kyslíkom, pričom vzniká lipidový peroxyradikál, ktorý odoberá vodík z inej molekuly lipidu a vytvára nové radikály. Tým je reakcia rozvíjaná [10]. Základnými produktami sú hydroperoxydy, ktoré rozkladajú dvojité väzby a deštruujú membránové lipidy za tvorby sekundárnych produktov – epoxidových mastných kyselín, alkánov a alkénov, alebo



hydroxyaldehydov. Vo všeobecnosti sú vysoko reaktívne a pre organizmus toxické. Najznámejší príklad je zo skupiny hydroxyaldehydov – malondialdehyd (MDA) [19].

Zvýšená peroxidácia lipidov môže v mitochondriálnej membráne znižovať fluiditu, čo znamená zvýšené uvoľňovanie molekúl do extracelulárneho prostredia, poruchy membránových receptorov a až ruptúru membrány [13, 19].

Spomínaný malondialdehyd patrí k hlavným biomarkerom peroxidácie lipidov v tkanivách organizmov. Ide o reaktívnu molekulu z troch atómov uhlíka a dvoma aldehydovými skupinami v polohe 1 a 3 (Obr. 2) [19].



Obr. 2: Štruktúrny vzorec MDA [19]

K stanoveniu MDA, ako najhojnejšieho sekundárneho produktu peroxidácie lipidov, je zavedených mnoho metód. Príkladom je metóda využívajúca reakciu MDA s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Je založená na stanovení vznikajúcich červenoružových aduktov, ktoré sa kvantifikujú pomocou UV-Vis spektrofotometrie [12]. Metóda sa považuje za nenáročnú a nenákladnú ktorá má v súčasnosti mnoho modifikácií. Finančne náročnejšou môže byť stanovenie pomocou HPLC, plynovej chromatografie alebo sa tiež využíva fluorometrické stanovenie založené na tvorbe fluoreskujúcich molekúl, ktoré vytvára MDA s proteínmi [19].

## 2.3 Dážďovky ako pôdny testovací organizmus

### 2.3.1 Pôda ako prostredie a produkt pre pôdne organizmy

Pôda je zložitý systém pozostávajúci z 3 zložiek, a to z pevnej fázy, pôdneho roztoku a pôdneho vzduchu. Pevná zložka sa skladá z anorganického podielu, ktorý tvoria minerály – od najhrubších častíc (štrk, piesok) až po najjemnejšie frakcie pôdy (ílly). Podľa veľkosti častíc sa rozlišuje textúra – zrnitosť, od čoho sa následne odvíjajú pôdne druhy. Druhý podiel pevnej zložky je organický a zahŕňa živé organizmy (edafon – zahŕňa= fytoedafon + zooedafon) a neživú organickú hmotu, ktorá tvorí okolo 84 % celkovej organickej hmoty. Priestory medzi pevnými časticami vyplní voda – ako pôdny roztok. Zrnitosť pôdy, obsah organickej hmoty, ale taktiež rozmiestnenie a veľkosť pórov ovplyvňuje schopnosť vody viazať sa v pôde. Pôdny vzduch pozostáva najmä z plynov N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub>. Zloženie pôdneho vzduchu a predovšetkým zastúpenie atmosférického kyslíka udržiava funkčnosť ekosystému – oxidatívne metabolické procesy organizmov (dýchanie, zisk energie). Tieto jednotlivé zložky medzi sebou interagujú, čím určujú charakteristické fyzikálno-chemické vlastnosti pôdy [20, 21].

Tento systém vytvára prostredie pre život pôdnych organizmov. Tie sa v pôde rozptyľujú podľa vyhovujúcej teploty, pH, či prítomnosti vody. Za najdôležitejšiu možno považovať obsah vody v pôde, ktorá je súčasťou všetkých živých sústav a je zodpovedná za transport rozpustených látok a živín. Ale veľkú úlohu zohráva taktiež teplota, ktorá ovplyvňuje fyziologické funkcie ale aj biologické procesy. Zdrojom tepla v pôde je slnečné žiarenie a biologická aktivita. Pôda

má vlastný metabolizmus, ktorý je poháňaný činnosťou organizmov a s okolitým prostredím je v neustále sa obnovujúcej dynamickej rovnováhe [20].

Za všetok rozklad organickej hmoty sú zodpovedné pôdne organizmy. Mnohé pôdne organizmy sú flexibilné a spĺňajú v ekosystéme viacero funkcií – môže byť konzumentom I. radu (požierajúci rastlinnú zložku), ale aj konzumentom II. radu (požierajúci iné organizmy) a taktiež deštruentom (požierajúci a rozkladajúci mŕtvu organickú hmotu). Najaktívnejšou a najpočetnejšou zložkou sú mikroorganizmy (prierez tela < 0,1 mm), a to predovšetkým baktérie, prvoky, hlístice. Podľa ich veľkosti a spôsobu života sa zaraďujú do mikroedafónu. So zväčšujúcou veľkosťou sa organizmy zaraďujú do mezofauny (0,1–2 mm) a makrofauny (2–20 mm), kde patrí ďalší vysoko rozšírený pôdny organizmus – dážďovky. Avšak tie najväčšie druhy dážďoviek možno zaradiť do megafauny (> 20 mm), ktorá je niektorými autormi ešte odlišovaná [20, 21].

Dážďovky v ekosystémoch zohrávajú množstvo nezastupiteľných úloh. Vyskytujú sa na všetkých kontinentoch, okrem Antarktídy. Oproti iným pôdnym organizmom sú druhovo chudobnejšie. Každý druh dážďoviek uprednostňuje iný druh pôdy, ale vo všeobecnosti preferujú neutrálne a alkalické pôdy [21].

### **2.3.2 Dážďovka hnojná (*Eisenia fetida*)**

Dážďovky patria medzi organizmy ktorých celý životný cyklus je spätý s pôdou – geobionti. Sú to konzumenti a zároveň deštruenti, čo z nich činí organizmy vhodné pre posudzovanie kvality popri prípade ekotoxicity pôdy a látok, ktoré sa do nej dostávajú [20, 21].

V práci je pre ekotoxikologické testy využitá *Eisenia fetida* (dážďovka hnojná), ktorá taxonomicky patrí do kmeňa obrúčkavcov (*Annelida*), triedy máloštetinavcov (*Oligochaeta*) a čeľade dážďovkovité (*Lumbricidae*) [22].

#### **Morfológia a anatómia**

Telo dážďovky je úzkeho valcovitého tvaru (dĺžka v priemere 15 cm a šírka 3–5 mm), je rozdelené na približne 100–120 krátkych segmentov. V prvom segmente sa nachádzajú ústa a tesne nad nimi sa nachádza lalok – prostómium, ktorý napomáha pri vŕtaní v pôde a tiež pri orientácii. Posledný segment je análny, ktorým sa vylučuje nestrávená potrava spolu s ostatnými zvyškami pôdy. Segmenty sú inak rovnakej veľkosti a oddelené sú väzivovými prepážkami [22, 23].

Celé telo dážďovky je tvorené dutinou naplnenou tekutinou (coelom), ktorá umožňuje dážďovke meniť svoj tvar a vtisnúť sa aj cez rôzne úzke štrbiny [22]. Povrch tela pokrýva tenká a elastická stena z kolagénu. Jej súčasťou sú rozmiestnené senzorické bunky zabezpečujúce príjem vonkajších podnetov. Keďže dážďovka je fotofóbny organizmus, ide aj o bunky fotoreceptorické (faosomy) k rozlišovaniu svetla a tmy. Taktiež sú tam prítomné žľazy vylučujúce hlien. Jeho pomocou je udržiavaný vlhký povrch tela, čo slúži k lepšiemu pohybu pôdou či ochrane voči škodlivým baktériám, ale taktiež k dýchaniu. Hlien pomáha absorbovať kyslík a po prechode cez kožu ho kapiláry umožňujú difundovať do krvného obehu. Oxid uhličitý sa následne z krvi rozpúšťa späť do kože [23, 24].

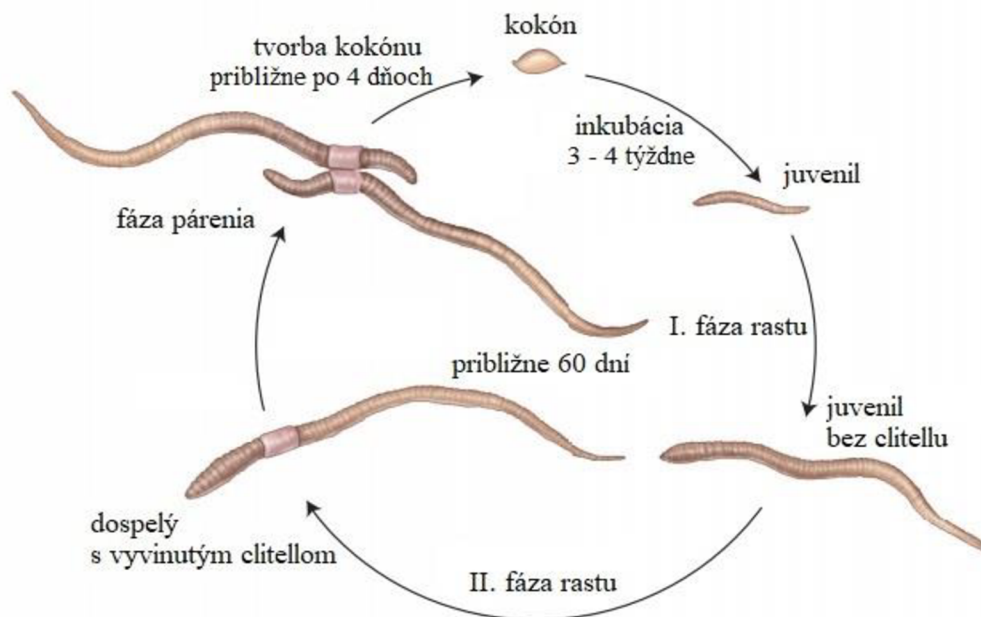
Pod epidermou leží svalová vrstva, ktorá sa skladá z kruhových svalových vlákien (ovinuté okolo každého segmentu) a pozdĺžnych svalových vlákien (po celej dĺžke tela). Dva ďalšie svaly (pár uhlových a jeden navíjací sval) sa nachádzajú na krátkych štetinách (nazývaných setae), ktoré vystupujú zo segmentov. Vymenované druhy svalov sú zodpovedné za pohyb, pričom je dôležitá schopnosť využitia svalov každého segmentu individuálne [23, 24].

Neprerušene celým telom prechádza nervová, cievna a tráviaca sústava. Základom CNS je nervový prstenec (v 3. a 4. segmente) tvorený gangliami, na ktoré je napojená nervová šnúra smerujúca k zadnému koncu tela. Podnety zachytené receptormi (svetlo, teplo, vibrácie, dokonca i chute) sú vedené cez senzorické vlákna až do nervovej šnúry, odkiaľ sú odražené motorické impulzy do svalov [25]. Tráviaci trakt tvorí trubica spájajúca ústny otvor a konečník. Od ústnej dutiny cez hltan a následne pažerák sa potrava dostáva do žalúdka, kde v dôsledku kontrakcii kruhových svalov dochádza k mletiu a drveniu častíc pôdy zmiešaných s organickou hmotou. Výsledný materiál postupuje cez črevo, ktoré je hlavným miestom trávenia. Prostredníctvom posledného segmentu tela – konečníka – sú vylučované akékoľvek nerozpustné a nestrávené častice potravy, či pôdy [26]. Úlohu obličiek nahrádzajú nefridie – orgány vyskytujúce sa takmer v každom segmente a prostredníctvom týchto pórov sú vylučované metabolické odpady [22].

Dážďovky sú obojpohlavné živočichy – hermafrodity, sú vybavené zároveň mužským genitálnym otvorom na 18. segmente ventrolaterálnej strany a na 14. segmente ženským pohlavným orgánom. Pohlavná dospelosť dážďovky je vizuálne identifikovateľná 14.–16. segmentom uzavretým žľazovým tkanivom – zvaným clitellum (hovorovo opasok). Ku kopulácii dôjde po zoradení jedincov v opačných smeroch, kedy prostredníctvom hlienovej trubice vyprodukovanej opaskom dochádza k výmene spermii. Pri následnom odvíjaní trubica prechádza ženským reprodukčným pórom odkiaľ zbiera vajíčka. Trubica sa uzavrie – vytvorí sa z nej kokón, v ktorom dôjde k oplodneniu a vývinu vajíčka. Kokóny sú oválne svetložlté obaly na ochranu vajíčok a z nich sa neskôr priamo liahnu dážďovky [27, 28].

### **Spôsob života**

Celý životný cyklus dážďovky sa odohráva v pôde a pozostáva z viacerých štádií, ktoré sú zobrazené na obrázku (Obr. 3). Popísaný cyklus je konkretizovaný na druh *E. fetida*, pričom odlišnosť od iných druhov je len doba trvania jednotlivých štádií. Zdroje informácií sú z dvoch štúdií vykonávaných v umelom prostredí, kde bol cyklus dážďovky pozorovaný [29].



Obr. 3: Životný cyklus *E. fetida* – pri teplote 25 °C (upravené podľa [30])

Cyklus začína pri oplodnení vajíčok, ktoré sa vyvíjajú v ochrannom puzdre zvanom kokón. Jeden kokón môže obsahovať až 20 vajíčok. Kokóny sú spočiatku svetložlté a ku koncu majú hnedú farbu. Inkubačná doba sa pohybuje v rozmedzí 3–4 týždne v závislosti na teplote prostredia a po vyliahnutí prichádza štádium juvenilov. Priemerný počet vyliahnutých potomkov sú 2–3 na jeden kokón a liahnu sa s veľkosťou 0,5–1,5 cm. Juvenilné štádium končí do 60 dní, kedy dosiahnu pohlavnú zrelosť vývinom clitellu. Prichádza fáza párenia a tvorba kokónov nastáva už 4 dni po párení. Tak sa cyklus opakuje [29, 31].

Väčšina druhov sa rozmnožuje po celý rok, avšak teplota prípustná pre tvorbu kokónov neklesá pod 3 °C. Počet kokónov závisí okrem teploty aj od druhu dážďovky a množstva živín, pričom jedinec je schopný za rok vyprodukovať od 3 do 100 kokónov [28, 29].

Dážďovky sa môžu v umelých chovoch dožívať až 12 rokov. V prirodzenom prostredí sa to odvíja od okolitých podmienok a predátorov. Najčastejší druh v našich klimatických podmienkach – dážďovka zemná (*Lumbricus terrestris*) sa môže dožívať do 6 rokov, alebo dážďovka hnojná (*E. fetida*) sa dožíva maximálne 4 roky [28, 31].

Medzi hlavné činitele ovplyvňujúce aktivitu dážďoviek patrí teplota, kvalita potravy, vlhkosť pôdy či pH. Aktivita sa vždy zvyšuje s príchodom jari, pretože teplota určuje rýchlosť ich metabolizmu [32]. Väčšine druhov žijúcich v Česku a Slovensku vyhovujú teploty medzi 10–15 °C. Pre dážďovky druhu *E. fetida* je vyhovujúca teplota v rozmedzí 20–25 °C. Spodná hranica je v blízkosti bodu mrazu, preto sú schopné prečkať chladné mesiace v pôde [28, 31]. Dospelým jedincom, ale aj kokónom neprekážajú ani tak nízke teploty ako hrozba vysušenia mrazom. Preto sa sťahujú do väčších hĺbok. To pomáha aj v suchých obdobiach, pretože je tam vyššia vlhkosť [28]. Miestam s nízkou vlhkosťou sa dážďovky vyhýbajú, aby nedošlo k vyschnutiu ich pokožky. Obsah vody v pôde by sa mal pohybovať v rozmedzí 40–60 % maximálnej vodnej kapacity pôdy [21, 28].

Dážďovky uprednostňujú skôr hlinité až hlinitopiesčité typy pôd, pričom pH by malo byť optimálne 6–7. Vo všeobecnosti je pokožka dážďovky citlivá na náhle zmeny iónových koncentrácií. *E. fetida* a jej veľmi podobný a často zamieňaný druh *E. andrei* sa prirodzene vyskytujú v zamokrených miestach s pokrývkou opadaných listov. Charakteristické sú pre ne aj prostredia vytvorené človekom – komposty [21, 28].

Aktivity dážďoviek ovplyvňuje tiež kvalita potravy, ktorá je rozhodujúcim faktorom pre ich vývoj. Označujú sa za detritofágov, ich potrava pozostáva z rozkladajúcej sa vegetácie (listy, koreňky, semená) a z odumretých častí živočíchov, často spolu so živými mikroorganizmami a taktiež výkalmi obsiahnutými v pôde. Dážďovky premieňajú organickú hmotu počas trávenia za prítomnosti enzýmov na jednoduchú, a difundovateľnú formu. Označujú sa preto za pôdných dekompozitorov. Získavajú tým organické látky a iné nepotrebné látky vylúčia späť do pôdy, čo môžu ďalej využívať rastliny [21, 28].

Na podklade vyššie spomínaných podmienok môžeme druhy dážďoviek rozdeliť do 3 kategórií, ktoré definujú ich základné znaky, lokáciu v pôdnom profile, potravu, či tvar a farbu tela. Rozdiely je možné porovnať v nasledujúcej tabuľke (Tab. 1) [21, 32, 33].

Tab. 1: Kategórie dážďoviek

	EPIGEICKÉ	ENDOGEICKÉ	ANETICKÉ
výskyt v pôdnom profile	povrchové vrstvy	podpovrchové vrstvy	hlbinné nory (do 6 m)
miesto výskytu	podstielky, prevažne lúky a lesy	ornice, huminové minerálne pôdy	poľnohospodárske pôdy, hlinité sprae
pohyb pôdnym profilom	nezahrabávajú sa – pohybujú sa tesne pri povrchu až niekoľko cm pod povrchom	pod povrchom tvoria horizontálny systém chodieb	tvoria vertikálne a hlboké chodby
potrava	rastlinný odpad na povrchu pôdy + odumretá organická hmota	materiál pod povrchom pôdy: korene + rastlinné zvyšky	sťahujú si rôzne rastlinné zvyšky a iný organický materiál z povrchu pôdy
veľkosť	3-12 cm	do 15 cm	najdlhšie: 15-45 cm
sfarbenie	červenohnedý pigment	bledé až priehľadné	červenohnedý pigment – viac pigmentovaná predná ako zadná časť
dĺžka života	dlhá: 4-8 rokov	stredná: 3-5 rokov	krátka: 1-2 roky
význam v ekosystéme	rozklad a fragmentácia podstielky = primárne rozkladače, vhodné pre vermikompostovanie	ďalšie spracovanie organického materiálu a recyklácia živín v ňom = sekundárne rozkladače	premiešavanie pôdných vrstiev a rozklad rastlinného odpadu, nory tvoria systém kanálov - prevzdušňovanie a pohyb vody v pôde
príklady európskych druhov	<i>Eisenia fetida</i> , <i>Eisenia andrei</i> , <i>Lumbricus rubellus</i> , <i>Dendrobaena rubida</i>	<i>Octolasion cyaneum</i> , <i>Allobophora caliginosa</i> , <i>Allobophora rosea</i>	<i>Lumbricus terrestris</i> , <i>Allobophora longa</i> , <i>Aporrectodea tra pezoides</i>

## Ekologický význam dážďoviek

Dážďovky majú v pôdných ekosystémoch dôležitú úlohu. Pri svojom pohybe pôdnym profilom vytvárajú tunely, čo napomáha prevzdušňovaniu a kypreniu pôdy. Vďaka hlienu, ktorý dážďovkám napomáha pri pohybe pôdou, zostávajú tunely stabilné. Tieto vzduchové priestory poskytujú lepšiu absorpciu vstupujúcej vody a tiež jej uchovávanie. Tým sa tvorí lepšia štruktúra a obmedzujú sa riziká s vodnou eróziou. Tunely napomáhajú tiež koreňom rastlín prenikať do hlbších miest s optimálnejšími podmienkami pre rast [28, 33]. Rastlinstvu pomáha aj prírodné hnojivo produkované dážďovkami. Organický materiál totiž po prechode tráviacim traktom obsahuje väčšie množstvo dusíka, fosforu, draslíka a iných mikroelementov oproti nestrávenej pôde. Zúrodňujú tým pôdu [21].

Pohybom tiež premiešavajú zložky pôdy, čiže minerálnu hmotu zo spodných vrstiev presúvajú na povrch a odumierajúce organické zbytky z povrchovej vrstvy vťahujú do svojich tunelov a následne rozkladajú. Takže okrem už spomínaných fyzikálnych zmien, menia aj chemické vlastnosti pôdy. Nevýhodou však je, že s presúvaním pôdných častí sú schopné presúvať aj polutanty prítomné v danej lokalite a rozširovať ich [28, 34].

Veľmi obľúbené sú dážďovky pri kompostovaní, ich využitie v tomto procese sa označuje ako vermikompostovanie. Vzniká kvalitný kompost, ktorý je vhodnou a udržateľnou alternatívou k chemickým hnojivám. Má potrebné vlastnosti pre rastliny a plodiny, preto je súčasťou ekologického poľnohospodárstva. *E. fetida* je najbežnejším druhom využívaným k vermikompostovaniu [35].

Môžu byť taktiež nápomocné pri sanácii niektorých typov kontaminácií tým, že stimulujú mikrobiálnu populáciu a tým zrýchľujú degradáciu organických kontaminantov. Ich ekologický význam spočíva aj v tom, že sú dôležitou súčasťou potravinového reťazca. Pre celú radu živočíchov sú hlavným zdrojom potravy [34, 36].

### 2.3.3 Ekotoxikologické testy na dážďovkách

Testy vykonávané prostredníctvom dážďoviek sa označujú ako kontaktné, čo znamená že testovací organizmus prichádza celým svojim telom do kontaktu s testovanou látkou aplikovanou v pôde. Kvôli reprodukovateľnosti testov býva namiesto prirodzenej pôdy používaná pôda umelo pripravená, pričom jej zloženie je metodicky dané [37].

Dážďovka sa ako modelový organizmus využíva na monitorovanie znečistenia životného prostredia už od roku 1984. Sú dôležitým indikátorom kvality pôdy, pretože sa jedná o veľmi citlivé organizmy. Vďaka ich priamemu dermálnemu kontaktu s pôdou a požívaní pôdných častíc môžu byť ľahko ovplyvnené znečisťujúcimi látkami. Majú schopnosť akumulovať veľké množstvo anorganických a organických kontaminantov. Navyše ich chov je uskutočniteľný v laboratórnych podmienkach a ich rozmnožovací cyklus je pomerne rýchly. A tieto vlastnosti robia z dážďoviek prioritný organizmus v pôdných testoch ekotoxicity. Medzi najčastejšie používané druhy patrí práve *E. fetida* [20, 38].

Medzi základné metodiky testov ekotoxicity patria: test únikového chovania (ISO 17512-1) [39], test akútnej toxicity (OECD 207) [40], test chronickej toxicity (OECD 222) [37], alebo test bioakumulácie látok v pôdnych máloštetinavcoch (*Oligochaete*) (OECD 317) [41].

### **Test únikového chovania**

V teste únikového chovania ide o rýchle hodnotenie dostupnosti kontaminantu v pôdach. Jeho princípom je vystavenie určitého počtu dospelých jedincov pôde, ktorú chceme testovať alebo ktorá je kontaminovaná testovanou látkou a pôde kontrolnej, ktorá je nekontaminovaná. Tieto podiely pôdy sú umiestnené v jednej testovacej nádobe, tak aby mohli jedinci medzi nimi prechádzať. Používa sa dvojkomorový systém, kde sa za pomoci prepážky rozdelí nádoba na testovanú a kontrolnú pôdu a po odstránení prepážky jedince medzi pôdnymi sekciami prechádzajú. Druhým typom systému je viackomorový, ktorý je v kruhovom usporiadaní (spravidla rozdelený na 6 sekcii) a jedince z centrálnej komôrky prechádzajú do ďalších sekcii. Porovnáva sa preferencia kontaminovanej pôdy s pôdou kontrolnou na základe percentuálneho počtu jedincov, ktorý sa presunuli do podielu kontrolnej pôdy – unikli. Keďže je test krátkodobý, jedince nie sú počas testu kŕmené. Proti úniku jedincov je potrebné nádoby uzavrieť a zahrnúť prístup vzduchu. Testovacie nádoby sú umiestnené do klimatizovanej miestnosti o stálej teplote ( $20 \pm 2$  °C) a osvetlení (400–800 lux) [39].

### **Test na stanovenie akútnej toxicity**

Najčastejším testom, ktorý býva prvým krokom ku zisťovaniu toxicity látky je test akútnej toxicity. Tento test spočíva vo vystavení dážd'oviek rade koncentrácií testovanej látky, ktorá je vmiešaná do umelo pripravenej pôdy (alebo tiež možné vykonať na filtračných papieroch). Test prebieha 14 dní pri konštantnej teplote ( $20 \pm 2$  °C) a osvetlení (400–800 lux). Po 7 a 14 dňoch sa kontroluje počet uhynutých jedincov a na záver aj hmotnosť žijúcich. Sú zaznamenávané zreteľné zmeny v správaní jedincov. Tieto výsledky sú porovnávané s kontrolnou pôdou, ktorá neobsahuje testovanú látku. Na základe zistenej mortality jedincov v jednotlivých koncentráciách je určená hodnota LC50 pre testovanú látku [40].

### **Test na stanovenie chronickej toxicity a reprodukčného správania**

Chronický test je časovo náročnejší, no výhodou je zisk hodnotných informácií o účinku látky aj na schopnosť reprodukcie a potomstvo. Získané výsledky z chronického testu tak majú väčšiu výpovednú hodnotu ako výsledky z akútneho testu. Chronický test prebieha za rovnakých podmienok 56 dní, pričom prvé 4 týždne sú dospelé jedince každých 7 dní prikrmované a je udržiavaná potrebná vlhkosť pôdy. Po 4 týždňoch sú dospelé jedince z testovacích nádob odobrané s kontrolou mortality a hmotnosti. Druhá polovica testu je vyhradená pre liahnutie a vývoj juvenilných jedincov, ktorých počet je po ukončení testu zaznamenaný. Z toho je stanovená reprodukčná schopnosť jedincov v závislosti od koncentrácie testovanej látky. Finálnymi výsledkami sú hodnoty EC<sub>x</sub> a NOEC [37].

Vyššie zhrnuté metodiky testov na dážd'ovkách poukazujú na vplyv testovanej látky alebo matrice na dospelé jedince. Škodlivé látky však môžu vplývať významne už na juvenilné organizmy, u ktorých môže byť citlivosť odlišná od citlivosti dospelého jedinca. Tieto testy tak zachytávajú vplyv látky na organizmus buď len v juvenilnom štádiu, alebo sa test môže rozšíriť

a pokračovať pri pozorovaní celého životného cyklu dážďovky. J. Žaltauskaitė [42] skúmal vplyv kadmia a olova na juvenilny *E. fetida* a zároveň aj následky na parametre nasledujúcich životných cyklov. Počas 14 týždňov sa na organizmoch pozorovali endpointy ako mortalita, rast, reprodukčné dospievanie a produkcia kokónov. Bolo potvrdené, že so zvyšujúcou sa koncentráciou a časom expozície oba kovy nepriaznivo ovplyvnili prežívanie mláďat, alebo ich vývoj – najmä rýchlosť rastu a pohlavného dozrievania, pričom u niektorých nebola dosiahnutá pohlavná dospelosť vôbec [42].

Ekológ J. Scott-Fordsmand [43] poukázal pri hodnotení vplyvu toxicity nanočastíc oxidu meďnatého na životný cyklus *E. fetida*, že juvenilny sú obzvlášť citlivé prvých 28 dní po vyliahnutí. Takéto testy celého životného cyklu tak dokážu detekovať najzraniteľnejšie štádiá a objasniť ich citlivosť. Aby nedošlo k podceneniu dôsledkov pri testovaní danej látky na populáciu dážďoviek, je do testovaní preto vhodné zahrnúť aj mladé organizmy [43].

### 2.3.4 Využitie biomarkerov dážďoviek

Rovnako ako je dážďovka populárnym modelovým organizmom v klasických testoch toxicity, je obľúbená aj v testoch na suborganizmálnej úrovni. Biomarkery sledované u dážďoviek poskytujú dôkazy o expozícii alebo účinku polutantov, a to možno následne využiť pri hodnotení znečistenia pri monitorovaní životného prostredia. K znečisťovaniu pôdných ekosystémov v súčasnosti najviac prispievajú chemické zlúčeniny, ako pesticídy a hnojivá, ale aj vypúšťanie rôznych priemyselných odpadových vôd, či šírenie ťažkých kovov a plastov. Tieto, ale aj mnohé ďalšie sú cieľom štúdií na tomto organizme [44].

Najčastejšie sa štúdie zameriavajú na efekty rôznych typov pesticídov. V štúdií čínskych autorov [45] bol skúmaný vplyv azoxystrobínu na *E. fetida*. Azoxystrobin je v súčasnosti rozšírený a používa sa ako fungicíd. Testovanie prebiehalo v umelých pôdach, kde sa najprv potvrdila toxicita v základných testoch (na reprodukcii a mortalite) a následne boli stanovované biomarkery SOD, CAT, GST. Ich aktivita bola počas expozície zvýšená, čo naznačuje ich podiel na zmierňovaní oxidačného stresu. Zároveň došlo k peroxidácii lipidov [45]. Dážďovky boli využité aj v iných štúdiách testovania pesticídov, napríklad insekticíd thiacloprid významne poškodil DNA za súčasného zvýšenia aktivity GST, CAT a SOD [46], herbicíd QYR301 pôsobil už pri najnižších dávkach a spôsobil poškodenie DNA a lipidovej membrány (prejavené na MDA) [47], alebo herbicíd butachlór preukázal u jedincov oxidačný stres pomocou sledovania CAT, GST a MDA [48].

Testujú sa aj vplyvy anorganických látok, napríklad Cd a jeho kombinácia s pyrénom, kedy samostatne Cd zvýšil aktivitu enzýmov SOD a CAT, navyše jeho prítomnosť predĺžila účinok pyrénu, preto sa ukazuje ako nápomocný nástroj k monitorovaniu pôd kontaminovaných PAH [49]. Vplyv octanu olovnatého, kvôli širokej distribúcii olova v pôdnom prostredí, sa prejavil peroxidáciou lipidov, avšak hodnoty CAT, ktoré boli súčasne stanovované neboli výrazne odlišné. Čo môže naznačovať menší význam ochrany enzýmom CAT [50].

Oxidačný stres u *E. fetida* bol prejavovaný taktiež po expozícii polystyrénových mikroplastov (PS-MP). Pozorovalo sa, že aktivita SOD sa zvyšovala ako priama reakcia na zvyšujúce sa hladiny superoxidových aniónových radikálov po vystavení dážďoviek PS-MP. Mohlo to



vyvolať hromadenie týchto častíc v črevách jedinca, kde boli po vyšetrení pozorované zväčšené črevné bunky [51].

Štúdie sa tiež zameriavajú na chemické látky, ktoré sú súčasťou produktov osobnej starostlivosti (napr. parfémy, šampóny, krémy, ..) a často vstupujú do pôdneho prostredia. Napríklad boli dážďovky vystavené pôde kontaminovanej HCCB (1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexametyl-cyklopenta-y-2-benzopyrán, syntetické pižmo), kedy sa výrazne zvýšili hodnoty MDA, ktoré môžu naznačovať škodlivé účinky testovanej látky [52]. Alebo látka triclosan, ktorá slúži ako antimikrobiálna prísada, vyvolala potenciálne poškodenia už pri nízkych koncentráciách, spôsobila oxidačný stres (SOD, CAT) a poškodenie DNA [53].

Z vyššie uvedených výsledkov štúdií je zrejmé, že využitie biochemických reakcií (biomarkerov) na stanovenie vplyvu rôznych pôdnych polutantov na organizmus *E. fetida* je značne rozšírené a môže byť dôležitým ukazateľom pri monitorovaní znečistenia.

## **2.4 Mikroplasty v životnom prostredí**

Toxikanty vyprodukované antropogénnymi činnosťami vstupujú do životného prostredia rozličnými cestami. Pri úmyselných vstupoch ide o rôzne aplikácie za presne definovaným účelom, ako napríklad priemyslové chemikálie – z ekotoxikologického hľadiska dôležité aplikácie hnojív či pesticídov, alebo aplikácie liečiv. Neúmyselné vstupy bývajú vedľajším produktom ľudských aktivít a ich regulácia je omnoho problematickejšia [2, 20].

Obsah toxikantu v ovzduší je základným parametrom ovplyvňujúcim vstup látky do ekosystémov. Ovzdušie spolu s vodou vytvára transportnú sieť a toxikanty tak jednoducho prechádzajú medzi jednotlivými zložkami životného prostredia. Počas ich distribúcie prostredím zároveň dochádza k rôznym transformačným procesom (napr. oxidačné procesy, hydrolýza, fotolýza či degradácia), kedy sa menia vlastnosti toxikantu [2, 20].

Týmto spôsobom sa organizmy ustavične dostávajú do styku s látkami, ktoré sú pre ne neprirodzené, čo značí isté nebezpečenstvo. Za takéto látky sa považujú aj mikroplasty [2].

### **2.4.1 Mikroplasty a ich vplyv na pôdne ekosystémy**

Na zozname aktuálnych celosvetových environmentálnych problémov nechýba problematika likvidácie odpadov, ktorej závažnosť sa neustále zvyšuje. Najviac riešenou skupinou sú bezpochyby plastové odpady. Vďaka vysokej odolnosti materiálu dlhodobo pretrvávajú v životnom prostredí a nie sú schopné sa rozložiť. Bez mikrobiálnej aktivity sa ich počas rozkladu môže pohybovať od stoviek až po milióny rokov. No keďže ide o ekonomicky výhodný materiál s výnimočnými vlastnosťami, zamedzenie jeho produkcie je nepredstaviteľné [20, 54].

Plasty sú však schopné fragmentácie na menšie čiastočky – mikroplasty (pod 5 mm; MP) až nanoplasty (pod 0,001 mm; NP). V tejto forme plastové čiastočky prenikajú do zložiek životného prostredia. Nájdeme ich v najodľahlejších častiach sveta [54].

Väčšina vykonávaných štúdií sa zaoberá MP a NP, ktoré končia vo vodných ekosystémoch. Zatiaľ čo pôda (hlavne poľnohospodárska) je bezpochyby taktiež výrazným zachytávačom MP,

štúdií a výskumov v tejto oblasti nie je ani z ďaleka toľko, ako u vodných ekosystémov [55]. Ekológ D. He vo svojej štúdií uviedol, že zo všetkých publikácií na výskyt a vplyv MP bolo v rokoch 2004–2018 len 3,8 % zameraných na MP v pôde. To poukazuje na fakt, že vplyv MP v pôdnom prostredí nie je dostatočne preskúmaný a táto téma by sa nemala podceňovať [56].

Potenciálnych vstupov MP do pôdy je mnoho – cez odpad a jeho následnú degradáciu, cez priemyselné vody alebo cez obrusovanie pneumatík. V poľnohospodárskych pôdach sú zdrojom hlavne aplikácie čistiarenských kalov na hnojenie alebo používanie odpadových vôd k zavlažovaniu [38, 56]. Fragmentované mikroplasty sú schopné ľahko sa transportovať pôdnym prostredím a taktiež pôdnou vodou, čím sa dostávajú až do podzemných vôd [55].

Tak ako každá cudzorodá látka, tak aj mikroplasty ovplyvňujú svojou prítomnosťou štruktúru a funkcie pôdy, bez odhliadnutia od vplyvu na pôdnu biotu. Je to zapríčinené najmä rôznymi aditívami na zlepšovanie vlastností materiálu, či aj schopnosťou plastov a mikroplastov adsorbovať na svoj povrch rôzne nebezpečné kontaminanty [55]. Schopnosť vyvolávať zmeny je závislá aj napríklad od tvaru mikročastice, pričom mikrovlákná majú väčší vplyv na fyzikálne vlastnosti pôdy ako častice v tvare guľôčok. Tiež bolo dokázané, že prítomnosť MP ovplyvňuje evaporáciu pôdnej vody a tým aj na jej kolobeh systémom. Vplyv mikročastíc závisí od rôznych podmienok (chemické zloženie a koncentrácia MP, zloženie pôdy) [38, 55].

Dôležité sú prebiehajúce interakcie mikroplastov so živými organizmami. Kvôli svojej forme majú mikroplasty schopnosť sa v organizme koncentrovať. Práve akumulácia je závažným problémom, pretože to znamená postup mikročastíc skrz potravinový reťazec do vyšších trofických úrovni [2, 20].

V prehľadnej štúdií autorky E. Liwarska-Bizukojc [55] boli analyzované údaje o vplyve MP na pôdne prostredie, pričom viaceré uvedených výsledkov ekotoxikologických testov potvrdzuje účinky mikročastíc rôznych plastov na pôdne organizmy. Pre príklad, aké rôzne endpointy sa v testoch s MP skúmajú, sú tu uvedené niektoré výsledky. Miera prežitia spolu s fyziologickými zmenami vplyvom polystyrénu PS (1, 2 a 5  $\mu\text{m}$ ) bola testovaná u háďatiek (*Caenorhabditis elegans*), u ktorých sa prejavila zvýšená frekvencia ohýbania tela a tiež rýchlosť plazenia. Pričom tie menšie častice preukázali výraznejší vplyv. U tohto organizmu sa preukázal výrazný vplyv na reprodukciu po vystavení časticiam polyetylentereftalátu PET (<250, 250–630  $\mu\text{m}$ ). Účinky mikročastíc polyvinylchloridu PVC (80–250  $\mu\text{m}$ ) sa pozorovali na chvostoskokoch (*Folsomia candida*), kedy došlo k inhibícii rastu a reprodukcii, ktorá sa znížila počas 28-dňového testu až o 70,2 %. Polyetylén PE (<45  $\mu\text{m}$ , 45–200  $\mu\text{m}$ ) u chvostoskokoch v zasa narušoval schopnosť a rýchlosť pohybu [55].

Čo sa týka záujmového organizmu dážďovky *E. fetida*, uskutočňovali sa napríklad testy, kde sa pozorovala akumulácia mikročastíc polybromovaných difenyléterov PBDE (<75  $\mu\text{m}$ ), alebo mikročastíc PS ( $\leq 250 \mu\text{m}$ ), kedy bolo požitie častíc potvrdené vo výlučkoch. Na PS sa skúmali aj histopatologické zmeny, kde bolo potvrdené poškodenie DNA. Druh dážďovky *L. terrestris* bol použitý k testovaniu transportu častíc PE (710–850  $\mu\text{m}$ , 1180–1400  $\mu\text{m}$ , 1700–2000  $\mu\text{m}$ ) pôdou. Z experimentu vyplýva, že najmenšie častice boli najviac transportované a boli nájdené aj vo výlučkoch, kdežto tie väčšie sa tam nenachádzali. Transportovali sa aj pasívne (prichytením na pokožku dážďovky) a boli objavené v norách až do hĺbky 10 cm). Na

mikročasticiach polyetylénu s nízkou hustotou LDPE (50–150  $\mu\text{m}$ ) boli vykonávané testy zamerané na úmrtnosť a rýchlosť rastu, v ktorých bol potvrdený vplyv mikročastíc [55]. Ďalšie príklady testovaných efektov MP na dážd'ovky na základe zosumarizovaných výsledkov viacerých štúdií a kritických prehľadov sú súhrnne uvedené v tabuľke (Tab. 2) [55, 57, 58].

Tab. 2: Súhrnný prehľad vplyvov rôznych typov MP na dážd'ovky

Druh	Typ MP	Veľkosť	Koncentrácia	expozícia (d)	Efekt
<i>Eisenia fetida</i>	LDPE	250 $\mu\text{m}$	62,5; 125; 250; 500; 100 mg/kg	28	zmeny v aktivite GST, CAT
	LDPE	100-200 $\mu\text{m}$	0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 g/kg	28	akumulácia MP, zmeny v aktivite CAT, MDA, zvýšená AChE
	PET, PVC	< 2 mm	0,1; 0,25; 0,5; 1 % plastov/pôda	28-56	bez negatívneho vplyvu na hmotnosť a úmrtnosť
	PS	100, 1300 nm	100; 1000 $\mu\text{g/kg}$	14	zmeny v aktivite GSH, SOD, hromadenie PS v črevách
	PE	180-300 $\mu\text{m}$	1000 mg/kg soil	21	poškodenie mužských reprodukčných orgánov, trávenie MP
	PS	830-2000 $\mu\text{m}$	0,25% plastov/pôda	14-28	akumulácia MP
	PE	< 150 $\mu\text{m}$	0-500 g/kg	14-28	zvýšená úmrtnosť, znížená hmotnosť a reprodukcia
	PE, PS	$\leq$ 300 $\mu\text{m}$	1; 5; 10; 20 % plastov/pôda	14	požitie potvrdené, bez prejavu oxidačného stresu
<i>Lumbricus terrestris</i>	PP, PET	250 $\mu\text{m}$	2,5; 5; 7 % plastov/pôda	2	akumulácia MP
	PE	40,7 $\mu\text{m}$	0; 0,1; 1 % plastov/pôda	35	zmeny SOD
	PS	0,05-0,1 $\mu\text{m}$	0,025; 0,5; 10 % plastov/pôda	7	strata hmotnosti, zmena v mikrobióme
	PE	250-1000 $\mu\text{m}$	62,5; 125; 250; 500; 1000 mg/kg	28	bez výrazného vplyvu na hmotnosť a mortalitu

Z uvedených príkladov je zrejmé, že plastové mikročastice nemusia organizmu spôsobovať priamo smrť, ale ich požitie môže mať rôzne chronické následky. Najčastejšie sú to fyziologické či metabolické zmeny po vystresovaní organizmu [54].

Medzi možné riešenia v tejto problematike patria separácia a následná recyklácia odpadov, zadržiavanie, zmiernovanie či obmedzovanie. Do tohto sa zaraďuje aj edukatívna činnosť, pretože ešte pred vhodným nakladaním s odpadom, je potrebné vedieť ho správne separovať. Účinným riešením je obmedzovanie ich používania, ako napríklad v kozmetických prípravkoch, či množstva jednorazových výrobkov [54]. V súčasnosti je mnoho výskumov zameraných na potencionálnu náhradu – „bioplast“, ktorý by mal vyriešiť problémy klasických petrochemických plastov [59].

## 2.4.2 Bioplasty

Bioplasty sú propagované ako udržateľnejšia alternatíva k tradičným nerozložiteľným plastom na báze ropy [60]. Vlastnosťami sa približujú ich náprotivkom, v niečom aj vynikajú. Ako výhody sa uvádzajú najmä šetrenie fosílnych zdrojov nahradzovaním biomasou, znižovanie uhlíkovej stopy či skleníkových plynov [61]. V roku 2019 tvorili bioplasty len 1 % z celkovej

produkcie plastov (2 milióny ton). Je to najmä kvôli vysokým výrobným nákladom. S neustálym vývojom v tejto oblasti sa očakáva postupný rast produkcie [60].

Bioplasty môžeme všeobecne definovať ako plasty, ktoré sú syntetizované z biologického materiálu, ktoré sú biologicky rozložiteľné, alebo spájajú obe tieto vlastnosti [61].

Keď je plast vyrobený z biologického materiálu, nie je vyrobený ako tradičné plasty z neobnoviteľných fosílnych zdrojov (ropa, zemný plyn), ale je buď len v určitom podiele, alebo úplne z obnoviteľných surovín – z rastlinných zložiek (kukurica, pšenica, sója alebo cukrová trstina). Väčšina z nich však nie je 100% z prírodnej biomasy a aby plast niesol tento názov, postačuje ak obsahuje iba 20 % surovín z prírodných surovín [62]. Pridávajú sa rôzne chemické aditíva – na výhodnejšie vlastnosti (tepelná odolnosť, bariérové vlastnosti), alebo aj na rýchlejší rozklad [60]. Patri sem napríklad PET, PE či PTT (polytrimethylentereftalát) na biologickej báze [61].

Označenie biologicky rozložiteľný (biodegradabilný) sa vzťahuje k záverečnej fáze životnosti bioplastu. Po jeho využití je schopný úplne sa rozložiť v prirodzenom prostredí pomocou prítomných mikroorganizmov. Zaraďuje sa sem napríklad polykaprolakton PCL [61].

Často sa stretávame aj s pojmom kompostovateľný, ktorý tiež popisuje konečnú fázu bioplastu. V tomto prípade sa bioplast v biologických procesoch rozkladá na základné prírodné látky za pomoci ľudského zásahu v definovanom priestore a čase. Kompostovateľnosť sa od biodegradovateľnosti líši v špecificky vytvorených podmienkach. Kompostovateľné produkty netvoria žiadne viditeľné alebo toxické zvyšky. Naopak tvoria komplexný produkt, ktorý je prospešný a ďalej využiteľný vďaka množstvu živín. Rozlišuje sa kompostovanie domáce – za nekontrolovateľných podmienok a spravidla trvá dlhšiu dobu. Kdežto priemyselné kompostovanie je účinnejšie, pretože prebieha pri optimálnych a kontrolovaných podmienkach – zvýšenej teplote, prevzdušňovaní a zavlažovaní – čo napomáha zvýšiť rýchlosť mikrobiálnych procesov. Do skupiny kompostovateľných plastov patrí najznámejší bioplast – kyselina polymliečna PLA [62].

Tieto pojmy bývajú často medzi sebou zamieňané a pri tom sú výrazne odlišné. To že je produkt vyrobený na prírodnej báze neznamená že bude aj biologicky rozložiteľný. Schopnosť biodegradácie nesúvisí s pôvodom produktu, ale závisí skôr na chemickej štruktúre. Biologicky rozložiteľné môžu byť aj výrobky z fosílnych palív. Zároveň môžu byť bioplasty biodegradabilné, ale nemusia byť kompostovateľné [61, 62].

#### **2.4.2.1 Biologicky rozložiteľné plasty**

Biologicky rozložiteľná môže byť akákoľvek látka, ktorá je biologicky – prostredníctvom mikroorganizmov (baktérie, huby, riasy) rozložená na jednoduchšie zložky ako je oxid uhličitý a voda. To, aby bioplast spĺňal označenie biologickej rozložiteľnosti však nie je časovo podmienené [63].

Na základe ich pôvodu sa rozlišujú na tri skupiny. Prvú skupinu tvoria biodegradabilné plasty prírodného pôvodu – biologické, ktoré pochádzajú z polysacharidov (škrob, celulóza), bielkovín (kazeín, pšeničný lepok) a lipidov (rastlinné oleje, živočíšne tuky). Do tejto skupiny

sa zaraďujú aj polyestery syntetizované mikroorganizmami popri prípade rastlinami (polyhydroxyalkanoáty PHA), alebo polymerizáciou monomérov na prírodnej báze (PLA). V druhej skupine sú petrochemické plasty – produkované syntézou monomérov odvodených z petrochemickej rafinácie, príkladmi sú alifatické polyestery, aromatické kopolyestery alebo polyvinylalkohol (PVA). Posledná skupina je kombináciou biologických a petrochemických plastov (Mater-Bi) [64].

Proces degradácie sa zameriava hlavne na biotické javy. No počas biodegradácie súčasne prebiehajú aj abiotické javy, ktoré majú na proces veľký vplyv. K zrýchleniu biodegradačného procesu, a teda k mikrobiálnej aktivite napomáha dostatočný prísun kyslíka, vlhkosť, svetlo a optimálna teplota [65, 66]. Biodegradácia pozostáva z 3 hlavných krokov. Prvý sa označuje biodeteriorácia, v ktorom sa materiál rozkladá na menšie frakcie prostredníctvom biotickej aktivity (za abiotického vplyvu). Mikroorganizmy na povrchu plastu vytvárajú biofilm, čím ovplyvňujú povrchovú pórovitosť. To mení mechanické vlastnosti a uľahčuje prístupu vody s následnou hydrolýzou. Ďalším krokom je enzymatické pôsobenie mikroorganizmov – depolymerizácia, počas ktorého sa štiepia polymérne reťazce [65]. Tretí krok zahŕňa procesy mineralizácie a asimilácie, kedy monoméry a oligoméry z rozštiepeného polyméru môžu vstupovať do cytoplazmy, kde sú metabolizované za uvoľnenia energie a metabolitov (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O a CH<sub>4</sub>). Typickými abiotickými javmi, ktoré napomáhajú biodegradácii sú mechanická, tepelná, UV a chemická degradácia [66].

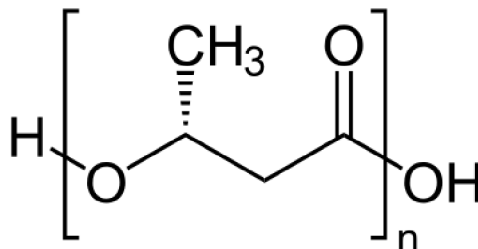
Medzi najčastejšie spomínaných zástupcov mikroorganizmov v štúdiách patrí zo skupiny cyanobaktérií: *Oscillatoria subbrevis* a *Phormidium lucidum*; veľkú skupinu tvoria baktérie: *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* a *Streptomyces*; riasy: *Anabaena spiroides*, *Scenedesmus dimorphus* a *Navicula Embula*; na koniec *predstaviteľia húb*: *Gloeophyllum trabeum* a *Zalerion maritimum*, *Penicillium citrinum*. Zaujímavý je aj fakt, že plastami sa môžu živiť larvy molí (*Plodia interpunctella* alebo *Galleria mellonella*) – sú to tzv. voskové červy, pre ktoré charakteristickou obživou sú produkty včiel (peľ, včelí vosk). Z ich schopnosti tráviť včelí vosk je odvodená aj schopnosť tráviť napríklad PE plast a premieňať ho na etylénglykol [54].

Biodegradabilné plasty sa najviac uplatňujú ako obalové materiály, domáce potreby, alebo aj v záhradníckom a poľnohospodárskom sektore (napríklad kvetináče, rôzne plastové nádrže a zavlažovacie zariadenia, či mulčovacie fólie). Rozširuje sa aj použitie v elektronike – pri vývoji mobilných telefónov, slúchadiel, počítačových klávesníc a podobne [63].

#### 2.4.2.2 PHB

Medzi najslubnejšie materiály ktoré majú byť vhodnou alternatívou patrí poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB, označovaný ako PHB). Je to bakteriálny polyester – prirodzene sa vyskytujúci a biologicky rozložiteľný polyester patriaci do skupiny polyhydroxyalkanoátov (PHA), ktoré tvoria veľkú skupinu termoplastických polymérov. Ide o lineárny polyester pozostávajúci z monomérov hydrokyselín pospájaných esterovou väzbou. Monomérne jednotky PHA sa delia do dvoch skupín, a to podľa počtu atómov uhlíka s krátkym a stredne dlhým reťazcom. Práve dĺžka reťazca hrá rolu vo finálnych vlastnostiach polyméru. PHB sa radí do skupiny s krátkym reťazcom (scl-PHA), pretože je v rozmedzí 3–5

atómov uhlíka. Vyznačuje sa dobrými mechanickými vlastnosťami, ktoré sa približujú ropným polymérom, napríklad termoplastickými vlastnosťami PE. Je to tuhý materiál, no krehký, s vysokým stupňom kryštalinity. To je zapríčinené metylovou funkčnou skupinou a esterovou väzbovou skupinou (Obr. 4) [67, 68].



Obr. 4: Chemická štruktúra poly(3-hydroxybutyrátu) [67]

Teplota skleneného prechodu je v rozmedzí -5 až 20 °C. Je rozpustný v širokej škále rozpúšťadiel (chlórovaných uhľovodíkoch), ale nerozpustný vo vode. Je možné ho vyprodukovať v rôznych tvaroch a štruktúrach (filmy, guľôčky, vlákna). Teplota topenia je 179 °C, nad ktorou začína degradovať a po roztavení nie je lepkavý, čo je výhodné pri používaní v priemyselných aplikáciách [68].

Vlastnosti možno porovnať s druhou skupinou – mcl-PHA pozostávajúcej zo 6 – 14 atómov uhlíka. Polyméry mcl-PHA sú typické nižšou kryštalinitou a zvýšenou flexibilitou, čo je podobné elastomérom. Tiež disponujú nižšou teplotou skleneného prechodu a majú nižšiu molekulovú hmotnosť [67].

Vďaka týmto užitočným vlastnostiam má široké uplatnenie v priemyselnom a poľnohospodárskom odvetví (na extenzívne uvoľňovanie hnojív a agrochemikálií), ale aj v medicínskej oblasti (výroba absorbovateľných stehov, obvazy a náplasti, aplikované pri opravách šliach, chrupaviek a taktiež vo farmakológii) [69].

### Syntéza PHB

PHB bol prvýkrát izolovaný z bakteriálneho kmeňa *Bacillus megaterium* v roku 1926. Odvtedy sa potvrdilo, že je biosyntetizovaný a akumulovaný množstvom špecializovaných bakteriálnych kmeňov [70].

V súčasnej dobe existuje viac ako 300 druhov baktérií, ktoré môžu syntetizovať PHB, ale len niekoľko z nich bolo použitých v priemyselnom meradle. Patria sem *Cupriavidus necator*, *Azohydromonas lata* a *Azotobacter vinelandii*. Pri optimálnych podmienkach fermentácie môže až 90 % sušiny buniek môžu tvoriť PHB materiály. Ďalšími študovanými kmeňmi sú: *Bacillus spp.*, *Nocardia spp.*, *Pseudomonas spp.* a *Rhizobium spp.* [71].

PHB je syntetizovaný v bunkách mikroorganizmov ako produkt sekundárneho metabolizmu. K jeho produkcii dochádza počas rastovej fázy, alebo keď je organizmus vystavený stresovým podmienkam – pri nevyvážených alebo vyčerpaných zásobách základných živín (dusík, fosfor, horčík alebo kyslík). V takých prípadoch si prirodzenou reakciou si vytvárajú zásobný zdroj uhlíka a energie vo forme intracelulárnych granúl PHB polyméru [67, 70].

Detailnejšie je možné proces syntézy PHB popísať prostredníctvom troch po sebe nasledujúcich enzymatických reakcií. Najprv  $\beta$ -ketotioláza katalyzuje tvorbu väzby C-C kondenzáciou dvoch acetyl-CoA skupín za vzniku acetoacetyl-CoA. Tento produkt je následne redukovaný na (R)-3-hydroxybutyryl-CoA. Tretia reakcia tejto dráhy je vedená enzýmom PHB syntáza, ktorý katalyzuje polymerizáciu (R)-3-hydroxybutyryl-CoA za vzniku PHB polyméru [67].

Na priemyselné získanie PHB možno použiť množstvo rôznych kombinácií substrátov v niekoľkých fermentačných procesoch. Rozdeľujú sa na diskontinuálne procesy, kde patrí vsádzková kultivácia, fed-batch kultivácia a opakovaná fed-batch kultivácia a druhými procesmi sú kontinuálne, kedy sa využívajú kontinuálne vsádzkové systémy využívajúce jedno-, dvoj-, alebo viacstupňové procesy. Základom všetkých procesov je v prvom kroku vytvoriť podmienky prísunom potrebných živín na rast aktívnych buniek (buď kontinuálne alebo diskontinuálne). Po skončení prísunu živín a ich vyčerpaní sa spustí sekundárny metabolizmus na podporu biosyntézy polymérov. Pre vysokú efektivitu nie je možné pracovať za konštantných podmienok, ale používať viacstupňové procesy [67].

K finálnemu zisku PHB je potreba ekonomickej a účinnej metódy, kde výťažok bude vysoký o vysokej čistote a pri zachovaní vlastností polyméru. Keďže sú produkované intracelulárne, musia sa extrahovať použitím organických rozpúšťadiel alebo alkalických roztokov, čo zvyšuje náklady výrobného procesu. Obvykle používané rozpúšťadlá na tento účel sú chlórované uhľovodíky (chloroform), ktoré sú však toxické a drahé. Následná separácia PHB od rozpúšťadla sa vykonáva buď odparením rozpúšťadla alebo vyzrážaním [72].

V súčasnosti prebieha množstvo výskumov pre zlepšenie priemyselnej výroby PHB, čo sa týka nákladov na substrát pre baktérie. Je to z dôvodu, že tento bioplast sa javí ako bezpečná a perspektívna náhrada do budúcnosti, no náklady na výrobný substrát a proces extrahovania výsledného produktu sú približne desaťkrát vyššie ako pri konvenčných polyméroch. Vstupné suroviny sú najnákladnejšie, pritom až takmer 80% z nich predstavuje zdroj uhlíka a živín potrebných pre rast mikroorganizmov. Preto je snaha hľadať lacnejšie alternatívy, ktoré budú zároveň vyhovujúce organizmom. Používajú sa obnoviteľné zdroje (celulóza, škrob, sacharóza) alebo rôzne odpadové materiály (glycerol, melasa, srvátka). Taktiež môže ísť o odpady z poľnohospodárstva (mliečny odpad, obilniny, okopaniny), čo môže byť nápomocné aj k likvidácii takýchto agrozvyškov. Môže ísť aj o rôzne odpadné priemyselné vody obsahujúce organické látky (papierne). Využívanie takýchto zdrojov na výrobu PHB bolo preukázané ako rozumné a perspektívne [73].

### **Degradácia PHB**

Keďže sa zaraďuje medzi biologicky rozložiteľné polyméry, produkt je po skončení svojej životnosti degradovaný za aeróbnych alebo anaeróbnych podmienok. Zodpovedné sú za to niektoré baktérie a huby (napr. *Pseudomonas*, *Actinomadura*, *Microbispora*, *Saccharomonospora*, *Streptomyces*). Najprirodzenejším prostredím na rozklad je pôda. Degradácia PHB organizmami vytvára netoxické metabolity. S princípu predbežnej opatrnosti je tento biopolymér, ale aj ostatné biodegradabilné polyméry súčasťou mnohých výskumov, kedy sa kontroluje vplyv ich životného cyklu na pôdne ekosystémy. Tieto poznatky vzhľadom na stále rozvíjajúce sa odvetvie ešte stále nie sú dostačujúce [74].

### 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Experimentálna časť diplomovej práce pozostávala z dvoch častí. V prvej časti boli realizované vybrané ekotoxikologické testy na organizme *E. fetida* po vystavení mikroplastu PHB. Išlo o testy akútne a chronické podľa štandardných metodík OECD. V druhej časti bolo úlohou zavedenie metódy na stanovenie vybraného biomarkeru oxidačného stresu. Metódu následne otestovať na vzorkách tkanív testovacieho organizmu.

#### 3.1 Použité prístroje a pomôcky

- predvážky, váhy, analytické váhy AND GF 300
- automatické pipety, pipety
- ultrazvukový vodný kúpeľ
- analytické sítá (veľkosť ôk: 63  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$ )
- pH meter Lovibond Sensodirect pH110
- indukčná varná doska
- trepačka GFL 3005
- centrifúga ROTINA 420R
- mraznička s ultranízkou teplotou  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Eppendorf Innova U360 ULT)
- vortexový mixér
- homogenizátor HG-15A (Witeg Labortechnik GmbH)
- spektrofotometer SPECORD 40 BU
- bežné laboratórne vybavenie

#### 3.2 Testovaná látka a jej príprava

Vybraná testovaná látka – poly-3-hydroxybutyrát (v práci značený PHB,  $\rho = 1,23\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ,  $M_w = 450,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), bola do testov dodaná od firmy TianAn Biologic Materials Co., Ltd (Ningbo, China). V testoch boli používané 2 veľkostné frakcie: väčšia frakcia s veľkosťami častíc PHB v rozmedzí 63–125  $\mu\text{m}$  a menšia frakcia s veľkosťami častíc PHB  $\leq 63\text{ }\mu\text{m}$ .

Príprava tohto plastu spočívala v sitovaní suspenznej zmesi PHB na potrebné veľkostné frakcie. Sústava sít pozostávala z troch častí. Na vrchu bolo sito s veľkosťami ôk 125  $\mu\text{m}$ , na ktoré bolo presypané určité množstvo PHB častíc nedefinovaných rozmerov. Pomocou Milli-Q vody bola vytvorená suspenzia. Tá bola následne pretláčaná cez sito smerujúc na spodné sito s menšími veľkosťami ôk – 63  $\mu\text{m}$ , kde bola suspenzia rovnako pretlačená do záchytnej časti sústavy. Takto získané zmesi o požadovanej veľkosti častíc PHB boli prevedené do dvojlitrových kadičiek a boli ponechané k odpareniu vody v digestore. Vysušená sypká zmes mohla byť použitá na testovanie.

##### 3.2.1 Voľba koncentračnej rady testovanej látky

Do testov akútnej aj chronickej toxicity bola zvolená koncentračná rada: 6,25; 12,5; 25; 50 a 100 mg/kg. Táto rada sa odvíja od predchádzajúcich testovaní mikroplastov na organizme *E. fetida* [75, 76]. Ku každej koncentrácii boli vykonávané 4 opakovania.



### 3.2.2 Referenčná látka

Referenčné látky sa používajú v ekotoxikologických testoch na vyhodnotenie správnej citlivosti laboratórnych testovacích organizmov a adekvátnosti laboratórnych podmienok. Taktiež slúži na kontrolu vlastného prevedenia testu. Na testovanie pôdnych bezstavovcov sa odporúča využitie kyseliny boritej [77]. Na začiatku boli skúšané koncentrácie v rozmedzí 0–4000 mg/kg  $H_3BO_3$ . Po dokončení testu však pri koncentráciách 3500 a 4000 mg/kg bola úmrtnosť 100%, preto bola zvolená nasledujúca koncentračná rada: 0, 200, 400, 600, 1200, 1800 mg/kg. Na každú koncentráciu pripadli 4 opakovania.

### 3.3 Metodiky ekotoxikologických testov na organizmálnej úrovni

#### 3.3.1 Chov dážďoviek

Laboratórium ekotoxikológie disponuje vlastným chovom dážďoviek. Pre použitie jedincov do testov je potrebná ich určitá kvalita, vek a hmotnosť, ale je tiež vhodné vedieť pôvod organizmov. Z týchto dôvodov je vlastný chov výhodou. Chov prebieha v laboratórnych podmienkach pri teplote 22 °C a s dostatočným prísunom vzduchu. Pravidelne je kontrolovaná vlhkosť substrátu a je im dodávaná potrava. Potravou vhodnou pre dážďovky sa rozumejú zvyšky z ovocia, zeleniny, poprípade ovsené vločky. Podmienky chovu dážďoviek sú odrážané od normy OECD 222 [37].

#### 3.3.2 Príprava umelo pripravenej pôdy na testy

Testy v kontaktnom usporiadaní bývajú uskutočňované buď v prirodzenej alebo umelo pripravovanej pôde. Umelá, alebo umelo pripravovaná pôda je bežne používanou v laboratórnych testoch a bola zvolená aj pre naše testy. Umelo pripravovaná pôda bola do všetkých testov pripravovaná podľa metodiky OECD, ktorá definuje jej presné zloženie [37]. Jednotlivé zložky, z ktorých pozostáva, museli byť na začiatku vhodne pripravené – úplne vysušené a následne preosiate na požadované veľkosti (Obr. 5). Zloženie umelo pripravenej pôdy bolo nasledovné:

- 10 % rašeliny ( $\leq 2$  mm)
- 20 % kaolín
- 70 % piesok (50% v rozmedzí 2 – 0,2 mm, 50 %  $< 0,2$  mm) [37]



Obr. 5: Zložky umelo pripravenej pôdy zoradené podľa poradia v texte (vlastný zdroj)

Jednotlivé zložky boli spolu dôkladne premiešané v boxe. Pre úpravu počiatočnej hodnoty pH bol používaný uhličitan vápenatý. Jeho množstvo sa malo pohybovať v rozmedzí 0,3–1 % a po prídavku mala byť pH hodnota v škále  $6,0 \pm 0,5$  [37]. Kvôli rovnakým podmienkam všetkých testov bol zvolený 0,5% prídavok  $CaCO_3$ . Po prídavku uhličitanu bola zmeraná

hodnota pH. Pre kontrolu požadovanej kvality pôdy bolo potrebné stanoviť taktiež maximálnu vodnú kapacitu pôdy  $WHC_{max}$ .

Množstvo pôdy bolo pripravované tak, aby na prípravu jedného testu bolo k dispozícii minimálne 12 kg (+ 1 kg). Toto množstvo zodpovedá 5 zvoleným koncentráciám po 4 opakovania + koncentrácia nulová, ako kontrola, taktiež po 4 opakovania, pričom pre každé opakovanie bolo potrebné pripraviť 500 g pôdy ( $\rightarrow 24 \cdot 500 \text{ g} = 12\,000 \text{ g}$ ). Navyše sa pripravuje 1 kg pôdy potrebnej pre aklimatizáciu organizmov pred testom.

### **Stanovenie hodnoty pH**

Do odmerného valca bolo odobraných 5 ml pôdy. Toto množstvo pôdy bolo prevedené do 100 ml uzatvárateľnej fľašky. K tomu bolo pridaných 25 ml 1 molárneho roztoku KCl o laboratórnej teplote. Zatvorená fľaška bola umiestnená na trepačku a ponechaná 1 hodinu pri frekvencii 250 kmitov za minútu. Potom nasledovalo usadenie suspenzie (1 hodinu) a následne meranie hodnoty pH kvapalnej fázy. Ak bola hodnota v požadovanom rozmedzí (5,5–6,5), mohla byť pôda použitá do testu. Ak sa hodnota vychyľovala, bolo ju potrebné dodatočne upraviť prídavkom  $CaCO_3$ , alebo niektorej zo zložiek [37].

### **Stanovenie hodnoty $WHC_{max}$**

Postup spočíval v príprave špeciálnej nádoby. Bol pripravený sklenený valec, ktorý mal dno tvorené polopriepustným materiálom – jemnou textíliou (v možnosti bol aj filtračný papier). Valec bol na začiatku zvážený a bolo doňho pridané 50 g suchej artificálnej pôdy, následne bol vložený do nádoby s vodou tak, aby sa hladina vody zhodovala s výškou pôdy. V takomto usporiadaní bol valec ponechaný 3 hodiny, potom bol premiestnený do nádoby s jemným pieskom (menšou frakciou piesku, ktorá je zložkou artificálnej pôdy) na ďalšie 3 hodiny. Takto bola z pôdy odvedená voda, ktorá nebola zadržaná kapilárnymi silami. Po uplynutí času bol valec zvážený, následne sušený v sušiarňi pri 105 °C a znova vážený v rovnakých intervaloch do dosiahnutia konštantnej hmotnosti. Hodnota maximálnej vodnej kapacity pôdy bola stanovená zo vzťahu (4):

$$WHC = \frac{S - T - D}{D}, \quad (4)$$

kde S je hmotnosť nasýtenej pôdy spolu s valcom, T je hmotnosť samotného valca a D je hmotnosť suchej pôdy [37].

### **3.3.3 Príprava pred nasadením testu**

#### **Testovacie nádoby**

Na všetky vykonávané testy boli použité nádoby zo skla o objeme 1 liter a s rozmermi 21 × 15 × 6 cm. Rozmery boli volené tak, aby pri požadovanej navážke nebola pôda úplne po vrch nádoby, ale aby zároveň mala dostatočnú výšku na zahrabanie a pohyb jedincov. Tieto nádoby museli byť uzatvárateľné, aby sa zamedzilo úniku organizmov. Vrchnáky prislúchajúce týmto nádobám boli priesvitné – kvôli priepustnosti svetla, a taktiež museli mať vytvorené pravidelne usporiadané diery – kvôli výmene plynov medzi ovzduším a médiom.

### Príprava artificiálnej pôdy na test

Na test bolo pripravených 24 čistých a suchých vyššie opísaných nádob. Artificiálna pôda bola pripravená minimálne 3 dni vopred, a to z dôvodu dosiahnutia rovnováhy kyselinovej neutralizačnej kapacity. Potom bola vo väčšej nádobe upravovaná pre každú koncentráciu samostatne. Najprv boli odvážené 2 kilogramy pôdy a k tomu pridaných 500 ml destilovanej vody. Množstvo vody bolo pridávané na základe vypočítanej WHC – na 1 kg pôdy prislúcha 250 ml vody.

V tomto štádiu bola pridávaná aj testovaná látka. Bol rozdiel, či sa do testu pridávala referenčná látka  $H_3BO_3$ , alebo PHB. V prípade, že bola pôda pripravovaná pre test s referenčnou látkou, navážené množstvo  $H_3BO_3$  bolo rozpustené v určitom množstve vody pomocou ultrazvukového kúpeľu. Po rozpustení bol tento objem doplnený na potrebný objem vody pridávanej k pôde – do 500 ml. takto pripravený zmiešaný roztok bol následne pridaný k naváženému množstvu pôdy a zmes bola dôkladne premiešaná.

Pri príprave pôdy na test s PHB bol postup odlišný v tom, že PHB je ťažko rozpustný vo vode a v takom prípade bolo možné navážené množstvo pridať do tretej misky k 10 g jemného piesku ( $< 0,2$  mm) a dôkladne rozotrieť na homogénnu zmes. Zmes bola pridaná ešte do suchej naváženej pôdy, s ktorou bola dostatočne premiešaná (aby bola zaistená homogénná distribúcia testovanej látky) a až potom bola pridaná voda. Aj s vodou bola zmes znova premiešaná, kedy je dôležité, aby každá časť bola ovlhčená.

Artificiálna pôda, ktorá bola takýmito spôsobmi zmiešaná s testovanou látkou a vodou, vytvorila substrát, ktorý po stlačení v ruke nemal žiadnu stojatú alebo voľnú vodu. Z tohto substrátu bolo navažované do 4 misiek, kedy to s ovlhčením činilo približne po 600 g do každej misky (Obr. 6).



Obr. 6: Váženie testovacích misiek s pôdou  
(vlastný zdroj)

Postupne týmto spôsobom boli pripravené všetky koncentrácie. Zároveň bola pripravená aj kontrolná rada, taktiež so 4 opakovaniami (substrát – zmiešaná pôda a voda bez prídavku testovanej látky). Spolu to bolo dohromady 6 koncentrácií po 4 opakovania, čo je 24 testovacích misiek (Obr. 7). Pôda v jednotlivých miskách bola prikrytá vrchnákom a bola ponechaná odstáť do ďalšieho dňa k nasadeniu testu.



Obr. 7: Pripravené testovacie misky na test (vlastný zdroj)

### **Výber jedincov do testu**

Do oboch typov uskutočňovaných testov – akútneho aj chronického – sa vyberajú jedince podľa rovnakých požiadaviek plynúcich z normy. Dôležité je, aby tvorili homogénnu populáciu – približne rovnako staré, po dosiahnutí reprodukčnej dospelosti (s viditeľným znakom clitella) a s hmotnosťou v rozmedzí 300–600 mg.

Podľa týchto požiadaviek sú z chovu vybrané jedince minimálne v počte, ktorý potrebujeme do testu – 240 ks. Príprava testovacích organizmov pred testom spočíva v ponechaní týchto vybraných jedincov na jeden deň v pripravenej artificijálnej pôde – pre skúšku, či im pôda vyhovuje.

Pre túto skúšku bola použitá 1000 ml kadička, do ktorej bolo premiestnené 1 kg artificijálnej pôdy s potrebnou vlhkosťou a pH. Dážďovky boli umiestnené na povrch pôdy a po správnosti by sa mali plynule presunúť pod povrch – do hlbších častí kadičky. To bolo kontrolované po približne 2 hodinách (Obr. 8).



Obr. 8: Priprava organizmov na test (vlastný zdroj)

Ak boli všetky jedince zavrtané to pripravenej pôdy, kadička bola uzatvorená potravinárskou fóliou, kvôli zabráneniu prípadného úniku jedincov. Fólia bola opatrená otvormi, aby bol zabezpečený prístup vzduchu a odvod vlhkosti. Ak boli aj na druhý deň zavrtané v pôde, pôda bola považovaná za vyhovujúcu.

### 3.3.4 Test akútnej toxicity

Akútne testy boli vykonávané podľa metodiky OECD 207. Princípom akútnych testov je expozícia testovacieho organizmu *E. fetida* počas 14 dní médiu, v ktorom je obsiahnutá testovaná látka PHB. Akútna toxicita sa hodnotí na základe počtu uhynutých organizmov v závislosti od koncentrácie testovanej látky a taktiež podľa úbytku ich hmotnosti, čo sa dáva do porovnania s kontrolnou radou [40].

#### I. Nasadenie testu

Artifciálna pôda bola pripravená v testovacích miskách podľa opísaného postupu, rovnako prebehla aklimatizácia organizmov na artifciálnu pôdu. Po dni mohli byť organizmy nasadené do misiek a test mohol byť započatý.

Jednotlivé organizmy museli byť pred premiestnením do misiek zvážené kvôli porovnávaníu ich počiatočnej a konečnej hmotnosti. Pre tieto účely boli jedince postupne vyberané z litrovej kadičky, opláchnuté destilovanou vodou kvôli odstráneniu prichytených zvyškov pôdy a potom jemne ale dôkladne usušené od vody, aby mohli byť zvážené. Vážené boli dohromady v počte, v ktorom sa umiestňujú do misiek – 10 jedincov (Obr. 9).



Obr. 9: Váženie dážďoviek pred nasadením do testu (vlastný zdroj)

V rámci jednotlivých koncentrácií je dôležité, aby jedinci nasadzovaný do testu boli hmotnostne vyrovnaný, t. j. vyrovnaná hmotnosť 10 jedincov v miske, ale aj medzi jednotlivými miskami danej koncentrácie a medzi koncentráciami navzájom. Je to z dôvodu, aby nemohlo dôjsť k ovplyvneniu výsledkov pri výrazných odchýlkach ich hmotností, keďže menšie jedince sú vždy náchylnejšie na úmrtie ako tie väčšie.

10 odvážených jedincov bolo premiestnených na povrch pôdy. Rovnako ako bolo opísané pri postupe v kadičke, aj tu bolo potrebné počkať kým sa všetky organizmy zavrátajú do pôdy – kvôli kontrole ich kondície. Následne boli misky uzatvorené vrchnákom (Obr. 10) a umiestnené pod požadované osvetlenie – biele žiarivky so svetelnou intenzitou 400–800 lx zaisťujúce konštantné osvetlenie na všetky nádoby. V laboratóriu bola regulovaná teplota na  $20 \pm 2$  °C.



Obr. 10: Názorný postup nasadenia akútneho testu (vlastný zdroj)

Tento test sa označuje ako statický, to znamená, že počas celého plynutia testu doň nebolo nijak zasahované – čo sa týka kŕmenia, alebo úpravy vlhkosti.

## II. Vyhodnotenie testu

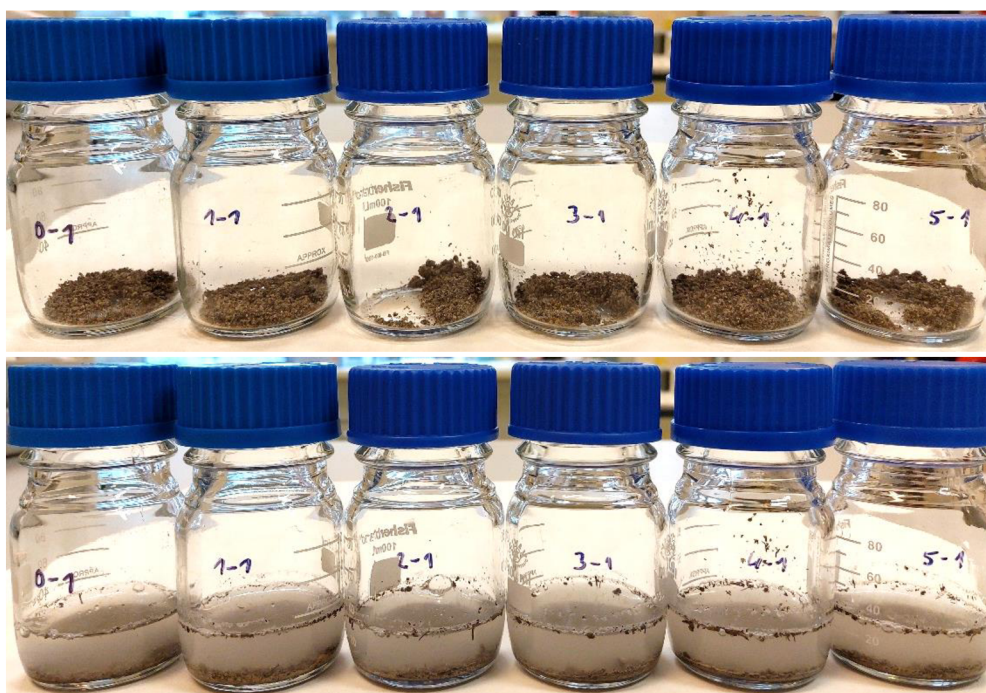
Test bol kontrolovaný po prvých 7 dňoch, kedy bol zaznamenaný počet uhynutých jedincov. Obsah misky bol presypaný na čistú a suchú tácku, jedince boli vytriedené od média a bola testovaná ich reakcia na podnet dotykcom ich prednej časti tela. Nereagujúce organizmy boli spočítané a počty zaznamenané. Následne bol obsah aj so živými jedincami vložený späť do testovacej misky, tie boli uzavreté a vrátené na pôvodné miesto. Po uplynutí ďalších 7 dní bol test ukončený a postup kontroly zopakovaný. Bola zaznamenaná mortalita a vypočítaná podľa vzťahu (5):

$$\text{mortalita} = \frac{\text{počet mŕtvych jedincov}}{\text{počet jedincov na začiatku}} \cdot 100 (\%). \quad (5)$$

Potom boli preživšie jedince očistené od pôdy – znova premytím destilovanou vodou a vysušením. Následne boli spolu zvážené a hodnota bola zaznamenaná. Inhibícia hmotnosti jedincov bola vypočítaná podľa vzťahu (6):

$$I_{\text{hmotnosti}} = \frac{m_{\text{počiatočná}} - m_{\text{konečná}}}{m_{\text{počiatočná}}} \cdot 100 (\%). \quad (6)$$

Kvôli potvrdeniu, že získané výsledky neboli ovplyvnené zmenou vlastností média, bolo potrebné na začiatku aj na konci testu zmerať hodnoty pH. Vzorka pôdy bola odobraná vždy z jednej nádoby v každej koncentrácii (Obr. 11). Meranie pH bolo uskutočnené rovnakým spôsobom, ako sa stanovovalo pri príprave artificálnej pôdy (kapitola 3.3.2.).



Obr. 11: Príprava vzoriek pôdy na meranie pH (vlastný zdroj)

### III. Validita testu

Výsledky testu sú považované za platné, ak úmrtnosť na konci testu v kontrolných vzorkách nepresiahne 10 %. Taktiež nesmie byť úbytok hmotnosti jedincov v kontrole vyšší ako 20 % [40].

#### 3.3.5 Test chronickej toxicity a reprodukčného správania

V teste chronickej toxicity sa pozorujú účinky na reprodukciu dospelých dážďoviek, ktoré sú vystavené testovanej látke. Tieto účinky sa porovnávajú s reprodukciou dážďoviek umiestnených v pôde neobsahujúcej testovanú látku. Okrem vplyvu na rozmnožovacie schopnosti sa v chronickom teste sledujú endpointy ako v teste akútnom – hmotnosť biomasy a úmrtnosť. Testovaná látka v médiu sa pripraví na začiatku a v priebehu sa už neobnovuje. Chronický test trvá 8 týždňov a je vykonávaný podľa postupu OECD 222 [37].

#### I. Nasadenie testu

Nasadenie chronického testu bolo identické s akútnym testom. Rovnaký počet nasadených testovacích nádob, s rovnakou koncentráciou testovanej látky a aj rovnakým počtom testovacích organizmov. Test prebiehal za rovnakých podmienok – za stáleho osvetlenia pri intenzite 400–800 lx a pri teplote  $20 \pm 2$  °C.

Pred umiestnením organizmov do pôdy bola zaznamenaná ich počiatočná hmotnosť. Jediným rozdielom bolo, že po zahrabaní organizmov do pôdy boli jednotlivé testovacie nádoby (aj s celým obsahom) zvažované a bola zaznamenaná ich hmotnosť. Počas 8 týždňov bolo totiž potrebné kontrolovať vlhkosť pôdy, aby mali organizmy optimálne prostredie. Vlhkosť bola kontrolovaná minimálne 1 × za týždeň, podľa aktuálnej potreby. Po zvažovaní nádob bolo na vrch pôdy ešte pridané krmivo pre dážďovky. Pri tomto dlhodobom teste je prikrmovanie vyžadujúce. Ako potrava bola použitá ovsená múčka (najemno pomleté ovsené vločky), ktorými bol jemne posypaný povrch pôdy v testovacej miske (Obr. 12). Krmivo bolo podávané raz týždenne počas prvých 4 týždňov testu.



Obr. 12: Ukážka prikrmovania organizmov (vlastný zdroj)



Množstvo bolo však ťažké odhadnúť. Častokrát medzi novým prídavkom krmenia dochádzalo k tomu, že vložky ktoré neboli organizmami skonsumované boli náchylné k rastu plesní. Vtedy bolo krmenie obmedzené. Takto prebiehali prvé 4 týždne testu.

Na konci tejto doby boli z nádob odobraté dospelé jedince. Pôda bola vrátená späť do testovacích nádob s tým, že bolo do nej vmiešané primerané množstvo ovsenej múčky (približne 5 g) a bola doplnená voda. Takto bol test ponechaný nasledujúce 4 týždne, aby bol priestor pre vyliahnutie a vývin nedospelých jedincov. Krmivo už nebolo dopĺňané, iba bola kontrolovaná vlhkosť pôdy, ktorá bola v prípade potreby upravená.

## **II. Vyhodnotenie testu**

Vyhodnotenie testu má dve časti. V prvej sa vyhodnocujú endpointy ako v akútnom teste – zmena hmotnosti a mortalita organizmov. Mortalita bola kontrolovaná po 2 týždňoch a po odobratí dospelých jedincov – po 4 týždňoch. Hmotnosť bola zaznamenávaná na začiatku a pri odbere jedincov. V druhej časti bolo hodnotené reprodukčné správanie organizmov. Po ukončení testu boli zaznamenané počty vyliahnutých dážďoviek a počet kokónov v jednotlivých koncentráciách.

Ručné vyberanie juvenilných jedincov je časovo príliš náročné. Preto bolo počítanie vykonávané podľa odporúčanej metódy. Jej postup bol nasledovný. Testovacie misky boli umiestnené do vodného kúpeľu s vysokou počiatočnou teplotou. To spôsobilo, že sa substrát v miskách začal od dna a po okrajoch ohrievať. Zmena z konštantnej teploty na horúce prostredie je pre dážďovky nevyhovujúce, na čo reagovali prestupom do vyšších častí pôdy a vyliezali na povrch. Táto ich reakcia trvala priemerne 10–15 minút. Vtedy bolo možné ich postupne odoberať do Petriho misiek. Z dôvodu ich malých rozmerov bola na odber používaná pinzeta.

Keď už jedince prestali vyliezať, bolo použité ešte sito s veľkosťami ôk 2 mm k finálnemu preosiatu substrátu. Tento postup bol inšpirovaný jednou z odporúčaných metód [60], v ktorej bol obsah nádoby cez sito premývaný. Keďže v mojom prípade išlo iba o kontrolu, premývanie bolo vynechané a pôda bola preosiatá. V prípade, že sa v nádobe nachádzala ešte dážďovka, ostala na site a bolo ju možné takto odobrať. Toto preosiatie však bolo efektívnejšie v porovnaní s vodným kúpeľom pre nájdenie kokónov. Kmitavý pohyb pri preosievaní spôsobil, že ľahké – prázdne kokóny sa dostávali na povrch a bolo ich možné rýchlo nájsť, ľahko odobrať a dopočítat.

## **III. Validita testu**

Validita chronického testu je podmienená taktiež limitovanou úmrtnosťou v kontrolných vzorkách, ktorá nesmie presiahnuť 10 %. Keďže sa jedná o hodnotenie reprodukčného správania, aj toto bolo zahrnuté do podmienok platnosti testu. Výsledky sa považujú za platné, ak v každej kontrolnej miske bolo vyprodukovaných minimálne 30 juvenilných jedincov. Rovnako nemohol variačný koeficient reprodukcie v kontrole prekročiť 30 % [37].

### 3.3.6 Dážďovky ako vzorky pre ďalšie využitie

Na konci akútneho aj chronického testu bolo potrebné jednotlivé organizmy uchovať pre ďalšiu časť práce – stanovenie biomarkerov. Preto boli dážďovky zo všetkých vykonaných testov vždy po ich odvážení presunuté na ovlhčený filtračný papier do Petriho misky. Uchovávať bolo potrebné len preživšie organizmy a boli triedené podľa príslušných koncentrácií a opakovaní. V uzavretej Petriho miske boli jedince ponechané počas noci, aby ich črevá boli vyprázdnené. Na druhý deň boli dážďovky opäť očistené a bol zaznamenaný prípadný úhyn jedincov. Z každej Petriho misky boli dážďovky premiestnené do označených uzatvárateľných sáčkov (Obr. 13) a vložené do mrazničky s ultranízkou teplotou (do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) k zamrazeniu pre ďalšie analýzy biomarkerov.



Obr. 13: Pripravené organizmy na zamrazenie (vlastný zdroj)

## 3.4 Zavedenie vybraných testov na suborganizmálnej úrovni

Dážďovky, ktoré boli vystavené testovanej látke v klasických ekotoxikologických testoch, boli po ich ukončení a zamrazení následne použité k testovaniu vplyvu PHB na oxidačný stres. Pre naše laboratórne podmienky boli optimalizované metódy na stanovenie enzymatickej aktivity katalázy a na peroxidáciu lipidov. Tieto metódy boli po preštudovaní literatúry zvolené vďaka dobrej citlivosti a nenáročnému spôsobu prevedenia, aby bolo možné tieto metódy v budúcnosti využiť aj na iné stanovovania. Súčasne bolo stanovované aj množstvo proteínu vo vzorke tkaniva organizmu. Meranie koncentrácie proteínu v stanovovanej vzorke je kľúčovým krokom pri množstve metód, najmä kvôli objektívnej kvantifikácii výsledkov a možnosti porovnania s inými testami. V tomto prípade to je potrebné pre vyhodnotenie peroxidácie lipidov a aktivity katalázy. Ako analytická koncovka bol zvolený UV-Vis spektrofotometer z dôvodu jednoduchého a rýchleho použitia.

### 3.4.1 Príprava vzoriek - homogenizácie tkaniva

Na to, aby mohli byť testovacie organizmy podrobené biochemickým analýzám, bolo potrebné ich najprv zhomogenizovať.

#### Príprava homogenizačného pufru

Homogenizácia zmrazených organizmov prebiehala za súčasť homogenizačného pufru. Bol využívaný fosfátový fyziologický pufer PBS pri hodnote pH 7,2 – za rovnakých podmienok pre

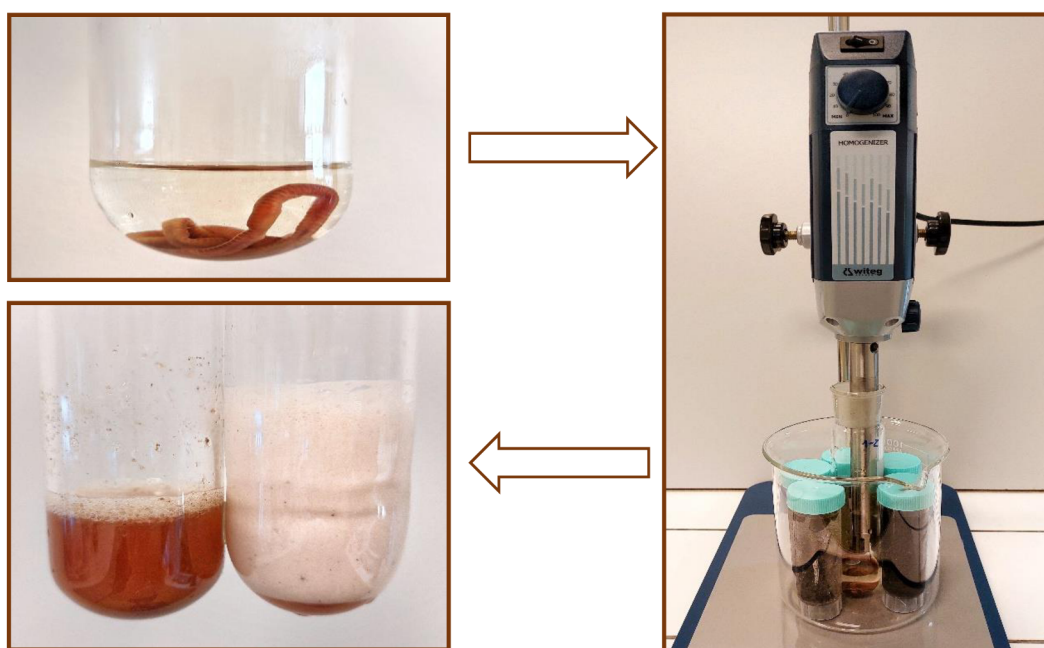
všetky stanovovania. Fosfátový pufer bol zložený z: 0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,29 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 0,02 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  rozpustených v destilovanej vode. Jeho pridávaný objem ku tkanivu bol v pomere: 1 ml PBS/100 mg tkaniva. Pufer mohol byť pripravený vopred a uskladňovaný v chladničke. Spravidla bol pripravovaný objem 1 liter.

Fosfátový fyziologický pufer PBS bol využívaný aj v ďalších krokoch pri riedení vzoriek alebo štandardov.

### Postup homogenizácie

Pred homogenizáciou bolo potrebné vopred vybrať organizmy z mrazničky, aby boli mierne odmrazené a bolo možné ich od seba ľahšie oddeliť. Vždy sa pracovalo súbežne so 4 vzorkami – s jednou koncentráciou po 4 opakovania. Na začiatku bolo z jednotlivých sáčkov s organizmami odobratých v priemere 4 – 5 dážďoviek tak, aby po následnom zvážení bola ich hmotnosť približne 1,3 gramu. Množstvo organizmov sa riadilo hmotnosťou vzorky pre analýzu, ktorá mala byť vyrovnaná a tiež od maximálneho objemu centrifugačnej skúmavky (ktorá bola používaná) a taktiež kvôli nižšej spotrebe pufru v zrovnaní s homogenizáciou všetkých organizmov z daného sáčku.

Keď boli telá dážďoviek zvážené, hmotnosť bola zaznamenaná a boli prevedené pinzetou do extrakčných skúmaviek. K nim bol pridaný ľadový pufer podľa vyššie uvedeného pomeru. Nádoby s takto pripravenými vzorkami na homogenizáciu boli ľadované kvôli udržiavaniu pufru pri nízkych teplotách. Takto boli po jednej skúmavke odoberané a homogenizované vzorky (za stáleho ľadovania). K homogenizácii bol používaný homogenizátor HG-15A (Witeg Labortechnik GmbH). Vzorky boli homogenizované pri 70 ot. po dobu 1 minúty. Po skončení bol homogenizátor vyčistený destilovanou vodou a osušený k ďalšiemu použitiu. Zhomogenizovaná vzorka v extrakčnej skúmavke bola vrátená späť do spoločnej nádoby, kde za stáleho chladenia musela klesnúť vzniknutá pena (Obr. 14).



Obr. 14: Postup pri homogenizácii vzoriek tkaniva (vlastný zdroj)

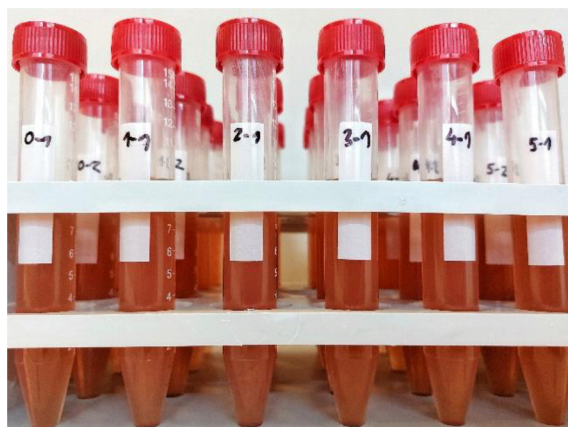
Potom bol celý objem preliaty do 15 ml centrifugačnej skúmavky, ktorá bola uložená v chladničke, takto bolo postupované so všetkými vzorkami od každej koncentrácie z každého opakovania.

### Použitie homogenátu

Surový homogenát bol použitý pre stanovenie proteínu – po premiešaní centrifugačnej skúmavky bolo odobraté potrebné množstvo. Po úprave objemov v centrifugačných skúmavkách na 10 ml boli spoločne centrifugované pri 4 °C a 6000 rpm po dobu 10 minút. Po skončení boli supernatanty preliaté do čistých skúmaviek a recentrifugované za rovnakých podmienok. Na obrázkoch nižšie (Obr. 15 a 16) vidieť farebný rozdiel supernatantov po usadení tkaniva na dne skúmaviek.



Obr. 15: Zhomogenizované vzorky pred centrifugáciou (vlastný zdroj)



Obr. 16: Vzorky po recentrifugácii (vlastný zdroj)

Odstredené supernatanty mohli byť následne použité pre biochemickú analýzu – k stanoveniu katalázy a TBARS.

### 3.4.2 Stanovenie koncentrácie proteínov Lowryho metódou

#### I. Princíp metódy

Na stanovenie koncentrácie proteínov prítomných vo vzorke sa za optimálnu voľbu považuje Lowryho metóda, ktorú opísal J.H. Wareborg [78]. Má široké využitie, preto bola zvolená aj v tejto práci.

Princíp tejto metódy je založený na dvoch reakciách vedúcich k tvorbe farebného komplexu. Prvou reakciou je Biuretova reakcia, v ktorej sa využíva hydroxid sodný NaOH – na vytvorenie alkalických podmienok a komplexotvorné činidlo (uhličitan sodný  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pentahydrát síranu meďnatého  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , vínian sodno-draselný  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ). Peptidové väzby bielkovín reagujú s  $\text{Cu}^{2+}$ , čím dochádza k redukcii na  $\text{Cu}^+$ . Druhá je Lowryho reakcia, v ktorej komplex protein- $\text{Cu}^+$  reaguje s Folinovým činidlom. Pridávané Folinovo činidlo obsahuje komplex (pozostáva z kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové), ktorý po redukcii tyrozínom a tryptofanom vytvára modrofialové sfarbenie. Vyhodnocuje sa spektrofotometricky pri vlnových dĺžkach 550 – 750 nm v závislosti od koncentrácie proteínu [78].

## II. Príprava reagensii

- komplexotvorné činidlo  
roztok A: 2% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \rightarrow 5 \text{ g v } 250 \text{ ml}$  destilovanej vody  
roztok B: 1% (w/v)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0,25 \text{ g v } 25 \text{ ml}$  destilovanej vody  
roztok C: 2% (w/v)  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \rightarrow 0,5 \text{ g v } 25 \text{ ml}$  destilovanej vody
  - nutné pripravovať čerstvé v pomere 100:1:1
  - pre stanovovanie vzoriek v 1 teste potrebné: 24 vzoriek  $\cdot 5 \text{ ml} \rightarrow 120 \text{ ml}$   
 $\rightarrow 120 \text{ ml } \ominus \text{ A:}1,2 \text{ ml } \ominus \text{ B:}1,2 \text{ ml } \ominus \text{ C}$
- 2 N NaOH  $\rightarrow 8 \text{ g v } 100 \text{ ml}$  destilovanej vody
- 2 N Folinovo činidlo  $\rightarrow 25 \text{ ml v } 25 \text{ ml}$  destilovanej vody
- BSA (hovädzí albumín)  $\rightarrow 0,2 \text{ g v } 200 \text{ ml}$  destilovanej vody (skladovaný v mrazničke pri  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ )

## III. Postup metódy

Po homogenizácii bolo priamo zo surového homogenátu odobraté potrebné množstvo vzorky tkaniva. To bolo stanovené na  $62,5 \text{ } \mu\text{l}$  a bolo pufrom PBS doplnené na  $500 \text{ } \mu\text{l}$  –  $437,5 \text{ } \mu\text{l}$  pridaného pufru. K objemu  $500 \text{ } \mu\text{l}$  nariadenej vzorky tkaniva bolo pridané  $500 \text{ } \mu\text{l}$  2 N NaOH. Vzorky boli zahrievané – hydrolyzované po dobu 10 minút pri  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  na indukčnej varnej doske. Po dovarení boli vzorky – hydrolyzáty ochladené na laboratórnu teplotu. Tento proces trval vždy aspoň 15 minút, počas ktorých bolo pripravené komplexotvorné činidlo (v pomere 100:1:1). Bolo potrebné ho pripravovať stále v tejto fáze, aby sa zaručila čerstvosť činidla. Keď boli hydrolyzáty dostatočne vychladené, bolo k nim pridané 5 ml dobre premiešaného komplexotvorného činidla a vzorky boli ponechané odstáť 10 minút. Ako posledný reagent bolo pridávané Folinovo činidlo – po  $500 \text{ } \mu\text{l}$  do každej vzorky. Vzorky boli po tomto prídavku premiešané pomocou vortexového mixéru a boli ponechané stáť pri laboratórnej teplote 30 až 60 minút, pričom táto doba nemohla byť prekročená. Bola odčítaná absorbancia pri  $550 \text{ nm}$  oproti PBS.

## IV. Kalibrácia metódy

Pre kalibráciu bol namiesto vlastnej vzorky použitý štandardný proteín BSA, pomocou ktorého bola pripravená kalibračná krivka. V tabuľke (Tab. 3) sú uvedené objemy k príprave kalibračnej rady.

Tab. 3: Príprava kalibračnej rady pre BSA

c proteín ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	20	50	100	200	500	1000	2000
$\ominus$ BSA ( $\mu\text{l}$ )	0	5	12,5	25	50	125	250	500
PBS ( $\mu\text{l}$ )	500	495	487,5	475	450	375	250	0

Objem bol volený tak, aby tvoril dohromady  $500 \text{ } \mu\text{l}$  – rovnako ako u vzoriek tkaniva testovacieho organizmu. Postup pokračoval zhodne: bolo pridané  $500 \text{ } \mu\text{l}$  2 N NaOH a hydrolyzované 10 minút, 5 ml komplexotvorného činidla,  $500 \text{ } \mu\text{l}$  Folinovho činidla, absorbancia pri  $550 \text{ nm}$ .

## V. Vyhodnotenie

Koncentrácia proteínov vo vzorkách tkanív *E. fetida* bola vypočítaná pomocou rovnice kalibračnej krivky BSA. Vzorec pre výpočet koncentrácie proteínu je odvodený z rovnice lineárnej funkcie (7):

$$y = k \cdot x + q, \quad (7)$$

pričom:  $y$  je hodnota meraného signálu,  $k$  je smernica (sklon) priamky,  $x$  je koncentrácia a  $q$  je úsek alebo priesečník funkcie s osou  $y$ . Výsledný vzorec je v tvare (8):

$$c = \frac{A - q}{k}. \quad (8)$$

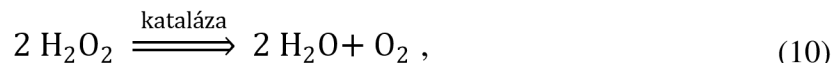
Takto bola získané množstvo proteínu v mg v 1 litre pufru PBS a hodnoty boli prevedené pomocou vzťahu (9) na množstvo proteínu v mg na 1 gram tkaniva testovacích organizmov.

$$c_{\text{proteín}} = \text{objem pufru (L)} \cdot \frac{c_{\text{proteín z kalibrácie (mg/l)}}{\text{navážka tkaniva (g)}} \quad (\text{mg/g proteínu}) \quad (9)$$

### 3.4.3 Stanovenie aktivity enzýmu katalázy

#### I. Princíp metódy

Test aktivity katalázy poskytuje užitočný nástroj na stanovenie oxidačného stresu. Podľa Aebiho (1984) [79] je princíp stanovenia enzymatickej aktivity založený na monitorovaní absorbancie, ktorá predstavuje aktivitu katalázy pri degradácii peroxidu vodíka. Degradácia prebieha podľa rovnice (10):



kedy kataláza rozkladá 2 molekuly peroxidu vodíka na 1 molekulu kyslíka a 2 molekuly vody v dvojstupňovej reakcii.

Enzymatický rozklad  $\text{H}_2\text{O}_2$  je sledovaný priamo poklesom absorpcie pri 240 nm. Rýchlosť tejto rozkladnej reakcie je vždy priamo úmerná aktivite katalázy. Koncentrácia peroxidu musela byť nízka, aby nedochádzalo k inaktivácii enzýmu počas testu alebo tvorbe bubliniek v kvete kvôli uvoľňovaniu  $\text{O}_2$  [79].

#### II. Príprava reagensii

- 0,09%  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 0,64 ml 35% v 248,36 ml destilovanej vody

#### III. Postup metódy

Pre stanovenie aktivity katalázy boli použité odstredené vzorky. Keďže vzorka bola používaná priamo ako supernatant - bola veľmi koncentrovaná. Musela byť na začiatku nariadená vhodným pomerom pufrum PBS, ktorý bol stanovený na 1 ml homogenátu: 50 ml PBS. Konečný meraný objem bol 3 ml, ktorý pozostával z 2 ml nariadenej vzorky a 1 ml 0,09%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Všetky roztoky boli používané za laboratórnej teploty.

Rozklad  $\text{H}_2\text{O}_2$  prebieha veľmi rýchlo, preto aj postup pri meraní musel prebehnúť čo najrýchlejšie. Najskôr boli napipetované 2 ml zriedenej vzorky do kremennej kvety, tá bola umiestnená do spektrofotometru. Reakcia sa spúšťa prídavkom  $\text{H}_2\text{O}_2$ , preto bol pridávaný 1 ml priamo do kvety umiestnenej v spektrofotometri. V rýchlosti bol obsah kvety premiešaný pomocou pipety a bolo spustené meranie. Sledoval sa pokles absorbancie počas 30 sekúnd pri 240 nm. Ako referencia bol použitý pufer PBS. Potvrdenie, že reakcia prebiehala správne a nedošlo k chybe pri postupe bolo overované tým, že počiatočná absorbancia mala mať hodnotu približne 0,500.

#### IV. Vyhodnotenie

Z nameraných absorpčných závislostí bolo potrebné získať smernice kriviek za meraný čas. Pre výsledok hodnoty aktivity katalázy v správnej jednotke bol uskutočnený prepočet podľa vzorca (11):

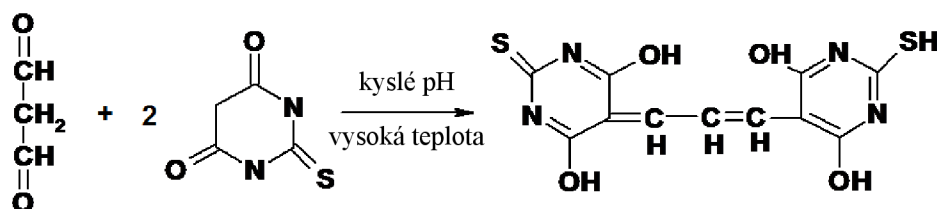
$$\text{CAT}_{\text{aktivita}} = \frac{\text{smernica krivky} / \frac{1}{2} \text{ min}}{\varepsilon \cdot l \cdot c_{\text{protein}}} \cdot 10^3 \text{ (}\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{/min/mg proteínu)}, \quad (11)$$

kde extinkčný koeficient  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\varepsilon$  je rovný  $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , šírka kvety  $l$  je 1 cm.

#### 3.4.4 Stanovenie peroxidácie lipidov pomocou TBARS

##### I. Princíp metódy

Stanovenie reaktívnych látok kyseliny tiobarbiturovej – TBARS test – má podstatu v reakcii malondialdehydu MDA s kyselinou tiobarbiturovou (TBA), pri ktorej vzniká ružovočervený komplex (Obr. 17) s absorpčným maximom pri vlnovej dĺžke 535 nm. Pre uvoľňovanie MDA z prekursorov je nevyhnutné teplo a prítomnosť silných kyselín [80].



Obr. 17: Reakcia medzi MDA a TBA za vzniku farebného aduktu MDA-TBA [81]

MDA vzniká ako sekundárny produkt lipidnej peroxidácie – v dôsledku metylénu oddeleného pri rozklade nenasýtených mastných kyselín v biologických membránach pôsobením ROS. Slúži ako vhodný identifikátor na stanovenie rozsahu peroxidácie reakcie. TBA nereaguje iba s MDA, ale reaguje aj s ďalšími produktami peroxidácie, preto sa táto metóda neoznačuje ako stanovenie MDA, ale stanovenie TBARS (pričom MDA tvorí približne 90 % TBARS). Koncentrácia TBARS sa zvyšuje pri zvyšujúcom sa oxidačnom strese. Tento postup bol odvodený z popisu stanovenia podľa Buege & Aust (1978) [80].

## II. Príprava reagensii

- zásobný roztok TCA-TBA-HCL  
15% TCA → 15 g  
0,375% TBA → 0,375 g  
0,25 N HCl → 2,21 ml 35% } v 100 ml destilovanej vody
- zásobný roztok bol kvôli ťažkému rozpúšťaniu TBA umiestnený na magnetickú miešačku, kde bol za stáleho zahrievania premiešavaný približne 20 minút do úplného rozpustenia
- štandard MDA → 5 mg do 25 ml

## III. Postup metódy

Pre stanovenie peroxidácie lipidov boli použité odstredenú vzorky tkaniva. Najprv bol pipetou z každej centrifugačnej skúmavky odoberatý 1 ml vzorky a napipetovaný do pripravených 12 ml sklenených fľaštičiek. Do každej boli následne pridané 2 ml zásobného roztoku TCA-TBA-HCl. Po dôkladnom premiešaní boli vzorky umiestnené do kúpeľa vriacej vody po dobu 15 minút, počas ktorých vznikala hnedkastá vločkovitá zrazenina. Vzorky boli ochladené na laboratórnu teplotu. Potom bol celý objem preliaty do centrifugačných skúmaviek a vzniknutá zrazenina bola odstredená pri 1000 rcf a 20 °C počas 10 minút. Centrifugované vzorky boli pripravené k premeraniu na sprektrofometri. Ako referencia bol použitý reagent TCA-TBA-HCl a absorbancia jednotlivých vzoriek bola odčítaná pri 535 nm.

## IV. Kalibrácie metódy

Pomocou štandardu MDA bola vytvorená kalibračná závislosť. Tab. 4 uvádza jednotlivé objemy, pomocou ktorých boli nariadené kalibračné roztoky. Kvôli vysokému riedeniu bol vytvorený najskôr zásobný roztok o koncentrácii 200 mg MDA/l PBS, z neho vytvorený druhý o koncentrácii 20 mg/l, z ktorého už boli pipetované vypočítané objemy. Kalibračné roztoky boli pripravené na objem 5 ml, z ktorých bol následne odoberaný 1 ml a k tomu pridávané 2 ml roztoku TCA-TBA-HCl – postup pokračoval zhodne ako pri analýze vzoriek tkaniva.

Tab. 4: Príprava kalibračnej rady

c (mg/l)	0	0,25	0,5	1	2	4	6	8
MDA (ml)	0	0,0625	0,125	0,25	0,50	1	1,50	2
PBS (ml)	5	4,9375	4,875	4,75	4,50	4	3,50	3

Na obrázku (Obr. 18) je vidieť vytvorené ružové sfarbenie po zahrievaní vzoriek vo vodnom kúpeli, pričom so zväčšujúcim sa označením stúpa koncentrácia štandardu MDA.





Obr. 18: Vytvorenie farebného komplexu po zahrievaní (vlastný zdroj)

## V. Vyhodnotenie

Vo vyhodnotení bola z rovnice kalibračnej krivky vypočítaná koncentrácia vzniknutých produktov TBARS. Výsledok bol vyjadrený ako  $\mu\text{mol TBARS}$  na  $\text{mg}$  proteínu – podľa vzťahu (12):

$$c = \frac{c_{\text{TBARS}}}{c_{\text{protein}}} \text{ (}\mu\text{mol/mg proteínu) .} \quad (12)$$

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1 Ekotoxikologické testy na organizmálnej úrovni

#### 4.1.1 Test s referenčnou látkou

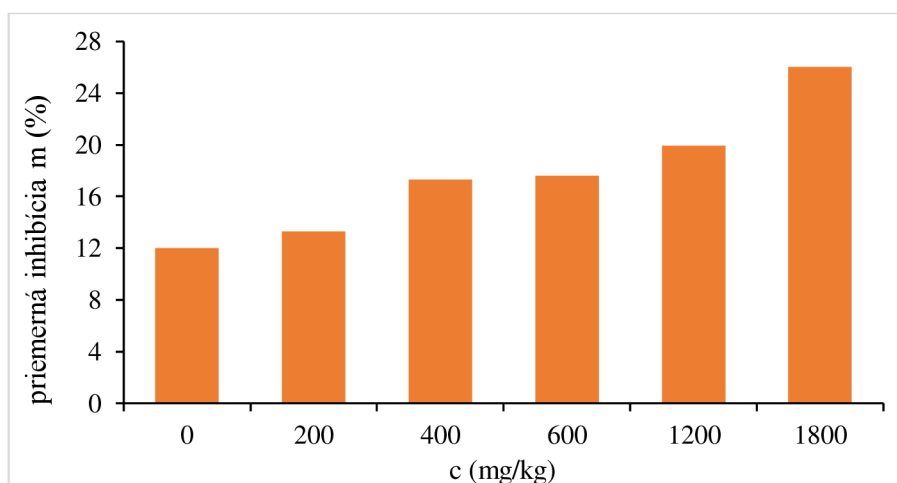
Na začiatku bol uskutočnený akútny test s referenčnou látkou – kyselinou boritou  $H_3BO_3$  (v dvoch opakovaníach). Každá koncentrácia mala 4 opakovania. Výsledky vybraného testu boli spriemerované a tieto hodnoty sú uvedené v nasledujúcich tabuľkách (Tab. 5 a 6). Všetky získané hodnoty z testovania sú uvedené v tabuľke v prílohe 1.

V tabuľke (Tab. 5) sú uvedené priemerné počiatkové a konečné hmotnosti, ktoré boli vzťahované na 1 dážd'ovku. Je to z toho dôvodu, že pri porovnávaní inhibície hmotností jedincov je potrebné brať v úvahu uhynuté jedince a preto je konečná hmotnosť vydelená počtom preživších jedincov. Tento spôsob bol používaný aj u vyhodnotení testov s PHB.

Tab. 5: Priemerné hmotnosti 1 organizmu a percentuálny úbytok

c (mg/kg)	m <sub>počiatočná</sub> (g)	m <sub>konečná</sub> (g)	I <sub>hmotnosti</sub> (%)
0	0,393	0,346	12,02
200	0,395	0,342	13,30
400	0,387	0,320	17,31
600	0,377	0,311	17,59
1200	0,392	0,314	19,92
1800	0,398	0,295	26,01

Výpočet inhibície (stimulácie) hmotnosti vychádza z priemerných úbytkov (prírastkov) hmotnosti v každom opakovaní – voči počiatkovej hmotnosti. Tento postup bol zvolený pretože nebolo možné na začiatku testu vybrať testovacích jedincov tak, aby všetky testovacie nádoby mali rovnakú hmotnosť biomasy nasadených jedincov a bolo možné ich inhibície porovnať. Zmena biomasy v priebehu testu v závislosti od koncentrácie je znázornená v nasledujúcom grafe (Graf 1):



Graf 1: Priemerná inhibícia hmotnosti vzťahovaná na jedinca

Konečná hmotnosť jedinca v kontrole oproti hmotnosti na začiatku testu klesla o 12,02 % a so vzrastajúcou koncentráciou sa inhibícia zvyšovala. Z tohto trendu je zrejmé, že zvyšujúce množstvo kyseliny boritej v testovacom médiu organizmom nevyhovovalo a prejavilo sa to na poklese ich hmotnosti počas 14 dní testu. Tým sa potvrdila citlivosť organizmov na testovanú látku.

Tab. 6: Priemerná mortalita na koncentráciu

c (mg/kg)	mortalita (%)
0	0,0
200	0,0
400	0,0
600	2,5
1200	2,5
1800	7,5

Priemerná mortalita jedincov v jednotlivých koncentráciách je zobrazená v tabuľke (Tab. 6). Norma ČSN ISO 11268-1 [77] uvádza rozmedzie koncentrácií 3000–4500 mg/kg pôdy, kedy majú byť prejavované významné účinky na mortalitu. Pri prvotnom testovaní štandardnej látky bola pri koncentráciách 3500 a 4000 mg/kg preukázaná 100% mortalita. Keďže cieľom bolo aj porovnanie úbytku biomasy, bola koncentračná rada znížená. Pri najvyššej koncentrácii 1800 mg/kg bola zaznamenaná 7,5% priemerná mortalita. Naše výsledky zodpovedajú stanovenému rozmedziu a tak možno test považovať za validný, takže postup prevedenia spolu s podmienkami boli pre testovacie organizmy správne nastavené.

#### 4.1.2 Test akútnej toxicity

Testy akútnej toxicity boli vykonané s testovanou látkou PHB o dvoch veľkostných frakciách: PHB  $\leq$  63  $\mu$ m a PHB v rozmedzí 63–125  $\mu$ m. Pre obe veľkostné frakcie boli uskutočnené 3 opakovania testov. V každom teste boli vykonané taktiež 4 opakovania na koncentráciu. Z akútnych, ale aj chronických testov bola získaná celá rada dát, ktoré sú pre veľký rozsah uvedené iba v prílohách. Z hodnôt v jednotlivých opakovaniach boli následne vytvorené priemerné hodnoty, z ktorých boli zostrojené tabuľky a grafy pre názornú ukážku výsledkov.

#### Účinok expozície na rast

V akútnom teste bolo cieľom zistiť účinok expozície PHB na inhibíciu hmotnosti jedincov. Hmotnosti organizmov boli vždy vážené na začiatku testu a po 14 dňoch, kedy bol test ukončený. Kvôli vysokému počtu nasadených jedincov boli vážené vždy dohromady po jednotlivých testovacích nádobách (pri nasadení testu – v počte 10). Inhibícia hmotnosti bola vyrátaná rovnakým spôsobom, aký je uvedený pri teste so štandardnou látkou. Výsledky sú uvedené v súhrnnej tabuľke (Tab. 7).

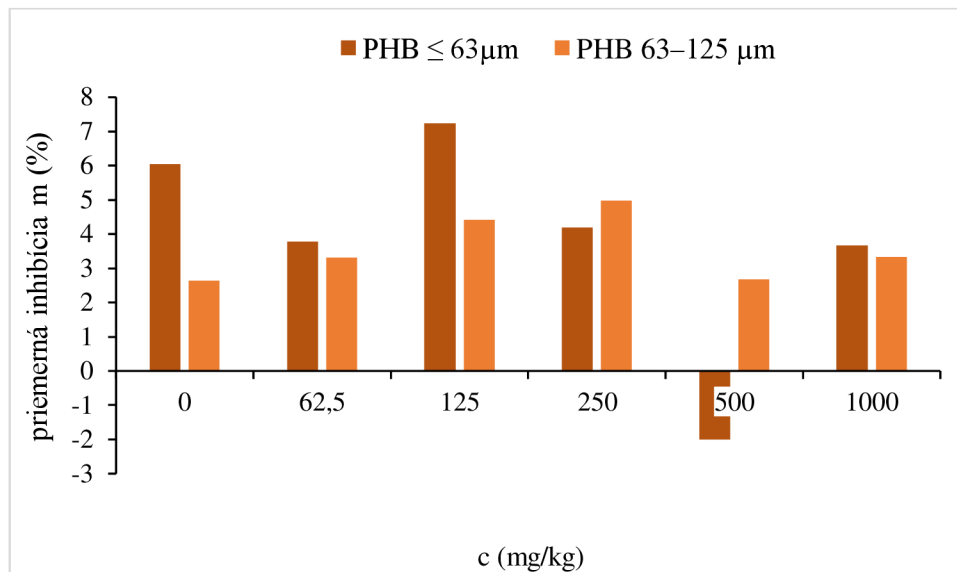
Tab. 7: Priemerné hmotnosti 1 organizmu a percentuálna inhibícia hmotnosti

	PHB $\leq 63\mu\text{m}$			PHB 63–125 $\mu\text{m}$		
	1. opakovanie			1. opakovanie		
c (mg/kg)	m <sub>počiatočná</sub> (g)	m <sub>konečná</sub> (g)	I <sub>hmotnosti</sub> (%)	m <sub>počiatočná</sub> (g)	m <sub>konečná</sub> (g)	I <sub>hmotnosti</sub> (%)
0	0,379	0,366	3,43	0,487	0,450	7,55
62,5	0,361	0,345	4,23	0,452	0,440	2,67
125	0,324	0,326	-0,54	0,428	0,407	4,96
250	0,306	0,319	-4,13	0,412	0,402	2,31
500	0,309	0,327	-5,82	0,376	0,395	-5,06
1000	0,313	0,271	13,22	0,342	0,371	-8,62
2. opakovanie						
2. opakovanie			2. opakovanie			
c (mg/kg)	m <sub>počiatočná</sub> (g)	m <sub>konečná</sub> (g)	I <sub>hmotnosti</sub> (%)	m <sub>počiatočná</sub> (g)	m <sub>konečná</sub> (g)	I <sub>hmotnosti</sub> (%)
0	0,409	0,363	11,06	0,379	0,386	-1,72
62,5	0,401	0,371	7,36	0,338	0,322	4,73
125	0,402	0,343	14,78	0,324	0,312	3,78
250	0,377	0,359	4,81	0,322	0,294	8,49
500	0,360	0,376	-4,72	0,326	0,303	7,04
1000	0,340	0,361	-6,04	0,318	0,282	11,15
3. opakovanie						
3. opakovanie			3. opakovanie			
c (mg/kg)	m <sub>počiatočná</sub> (g)	m <sub>konečná</sub> (g)	I <sub>hmotnosti</sub> (%)	m <sub>počiatočná</sub> (g)	m <sub>konečná</sub> (g)	I <sub>hmotnosti</sub> (%)
0	0,428	0,395	3,62	0,569	0,557	2,11
62,5	0,405	0,406	-0,25	0,559	0,545	2,55
125	0,383	0,354	7,48	0,566	0,540	4,51
250	0,361	0,318	11,9	0,549	0,526	4,14
500	0,361	0,345	4,52	0,543	0,510	6,04
1000	0,363	0,349	3,83	0,512	0,474	7,46

\*záporná hodnota inhibície hmotnosti I<sub>hmotnosti</sub> (%) značí stimuláciu

Všetky opakovania splňujú podmienku platnosti testu, kedy inhibícia hmotnosti v kontrolných nádobách nemôže byť väčšia ako 20 %. Pre porovnanie veľkostných frakcií boli inhibície zo všetkých 3 testov spriemerované na každú koncentráciu a sú uvedené v spoločnom stĺpcovom grafe (Graf 2). Z grafu nie je možné pozorovať žiaden trend v závislosti od koncentrácie látky. V prípade menšej veľkosti častíc je pri jedinej z koncentrácií – pri 500 mg/kg – z priemerných hodnôt 3 testov zaznamenaná dokonca výrazná stimulácia hmotnosti, ktorá sa u iných už neprejavila.

Dážd'ovky potrebujú pre svoj rast vhodnú potravu s dostatkom živín. V umelo pripravenej pôde nemajú k nej prístup a keďže akútne testy prebiehajú bez prikrmovania, očakáva sa úbytok ich hmotnosti. Ako je vidieť zo získaných výsledkov, v niektorých testoch sa tento predpoklad nepotvrdil. V teste so štandardnou látkou bol úbytok v kontrole a zvyšoval sa s nárastom koncentrácie, kdežto v prípade PHB obsiahnutom v testovanej pôde nebol prejavovaný žiaden trend – ani čo sa týka inhibície, ani opačného trendu – stimulácie hmotnosti.



Graf 2: Priemerná inhibícia/stimulácia hmotnosti vzťahnutá na jedinca

Štúdiu zameraných na vplyvu mikročastíc PHB na dážďovky, alebo konkrétne na *E. fetida* nie je mnoho, preto sa pri porovnávaní výsledkov prizeralo na štúdie iných biodegradabilných plastov, alebo MP klasických plastov.

V prehľadnej štúdiu [55] boli uvedené výsledky akútneho testu, kde sa pozorovali zmeny v biomase *L. terrestris* po vystavení mikročasticiam komerčne dostupnej PLA pri koncentrácii 0,1–5 % mikročastíc v pôde, kde nebol potvrdený žiaden významný rozdiel biomasy oproti kontrole. Pri koncentráciách MP-PE, ktoré sa zhodovali s našimi, bol efekt na zmenu hmotnosti organizmu *E. fetida* po 28 dňoch taktiež nepreukázaný [55]. Čo sa týka výsledkov krátkodobej expozície testovanej látky, bolo porovnávané aj únikové správanie jedincov pri vystavení pôde s obsahom MP PLA a PE. V tomto teste bola prejavovaná znížená citlivosť voči pôde s PLA v porovnaní s PE [58].

Rozdielna inhibícia či stimulácia hmotnosti v nami prevedených testoch môže byť pripísaná úrovni kondícii organizmov pred nasadením testov, alebo schopnosti prispôbiť sa zmene podmienok po prevedení do nového média.

V zmysle kondície organizmov možno poznamenať postreh, kedy konečná hmotnosť bola závislá na počiatočnej hmotnosti. Podľa normy [40] sa majú do testov využívať jedince s hmotnosťou 300–600 mg, avšak boli pozorovateľné rozdiely keď boli do testu nasadené organizmy v priemere 500 mg a v prípade, keď kvôli nedostatku jedincov o vyššej hmotnosti boli použité aj tie v tesnej blízkosti spodnej hranice. Práve v týchto prípadoch boli úbytky hmotností výraznejšie. Hoci by sa mali používať jedince v rámci všetkých testov vždy o približne rovnakej hmotnosti – aby nedochádzalo k ovplyvneniu výsledkov, nie vždy bolo v chove dostatok hmotnostne vyrovnaných jedincov. Takže i keď s hmotnosťou spadali do povoleného rozsahu, bol tam viditeľný rozdiel oproti iným testom.

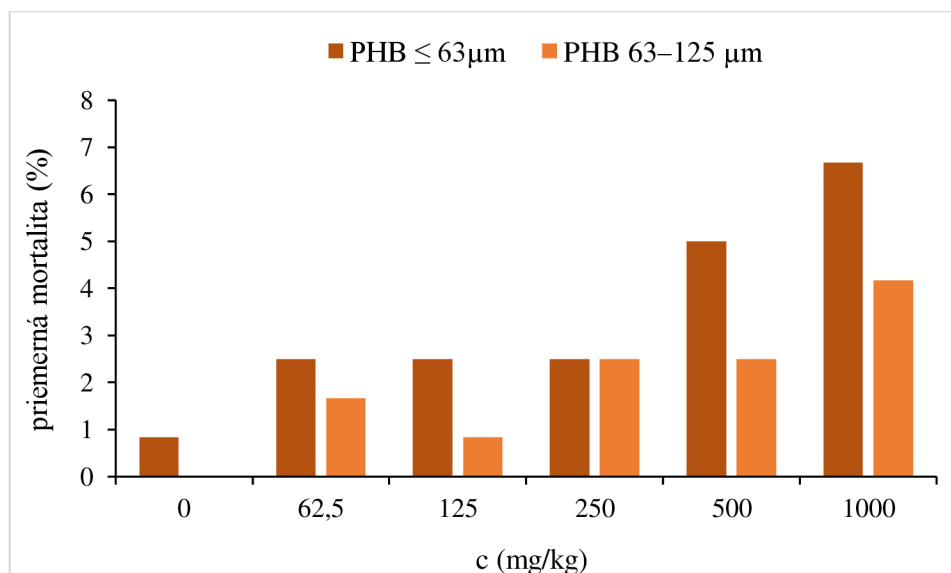
## Účinky expozície na prežitie

V akútnom teste je mortalita kontrolovaná po 7. a po 14. dňoch, pričom dôležitý je konečný počet uhynutých jedincov. Jednotlivé percentuálne mortality boli spriemerované a zosumarizované v Tab. 8. Počas všetkých akútnych testov neboli zaznamenané výrazné úmrtia. Maximálna priemerná úmrtnosť je 10 % na koncentráciu. Túto hodnotu nepresiahla ani mortalita v kontrole – test splňuje podmienky platnosti.

Tab. 8: Priemerná percentuálna mortalita na koncentráciu

c (mg/kg)	PHB $\leq 63\mu\text{m}$			PHB 63–125 $\mu\text{m}$		
	1. opakovanie	2. opakovanie	3. opakovanie	1. opakovanie	2. opakovanie	3. opakovanie
0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0
62,5	0,0	7,5	0,0	2,5	2,5	0,0
125	0,0	5,0	2,5	0,0	2,5	0,0
250	2,5	5,0	0,0	0,0	5,0	2,5
500	0,0	10,0	5,0	0,0	2,5	5,0
1000	7,5	7,5	5,0	2,5	5,0	5,0

Uvedené hodnoty priemerných mortalít v jednotlivých koncentráciách pre každé opakovanie testu boli ešte spriemerované, aby bolo možné v grafe znázorniť porovnanie oboch veľkostných frakcií. Pri testoch s menšou veľkosťou častíc je vidieť istý nárast mortality so zvyšujúcou sa koncentráciou testovanej látky, no dosahuje len 6,7 %, čo odpovedá prirodzenej mortalite nemusí súvisieť s vplyvom testovanej látky.



Graf 3: Priemerné mortality v jednotlivých koncentráciách (%)

### 4.1.3 Test chronickej toxicity

Test chronickej toxicity so zameraním na reprodukciu organizmov bol vykonaný v oboch veľkostných frakciách a z každej boli uskutočnené 2 opakovania testu. Laboratórne podmienky boli zhodné s akútnymi testami, takže testy prebiehali v rovnakom prostredí. Z dôvodu dĺžky trvania testu boli jedince v testoch prikrmované, čo malo navodiť optimálne podmienky počas celých 28 dní testu.

#### Účinok expozície na rast

V chronickom teste je účinok testovanej látky na rast organizmov posudzovaný po 28 dňoch, kedy boli jedince vybrané z testovacích nádob a hodnotené obdobným postupom ako v akútnych testoch. Získané inhibície (stimulácie) rastu sú uvedené tabuľke (Tab. 9).

Tab. 9: Priemerné hmotnosti 1 dážd'ovky a percentuálna inhibícia hmotnosti

		PHB $\leq$ 63 $\mu$ m			PHB 63–125 $\mu$ m		
		1. opakovanie			1. opakovanie		
c (mg/kg)	m <sub>počiatočná</sub> (g)	m <sub>konečná</sub> (g)	I <sub>hmotnosti</sub> (%)	m <sub>počiatočná</sub> (g)	m <sub>konečná</sub> (g)	I <sub>hmotnosti</sub> (%)	
0	0,424	0,492	-16,12	0,494	0,435	11,99	
62,5	0,399	0,439	-10,18	0,461	0,444	3,74	
125	0,368	0,401	-9,11	0,435	0,427	1,78	
250	0,351	0,413	-17,90	0,409	0,382	6,67	
500	0,344	0,410	-19,29	0,421	0,384	8,87	
1000	0,316	0,367	-16,38	0,396	0,406	-2,36	
		2. opakovanie			2. opakovanie		
c (mg/kg)	m <sub>počiatočná</sub> (g)	m <sub>konečná</sub> (g)	I <sub>hmotnosti</sub> (%)	m <sub>počiatočná</sub> (g)	m <sub>konečná</sub> (g)	I <sub>hmotnosti</sub> (%)	
0	0,539	0,541	-0,46	0,459	0,748	-62,85	
62,5	0,482	0,422	12,46	0,442	0,717	-62,12	
125	0,466	0,427	8,35	0,443	0,783	-77,02	
250	0,480	0,414	13,80	0,443	0,843	-90,40	
500	0,495	0,467	5,70	0,409	0,816	-99,39	
1000	0,467	0,438	6,12	0,426	0,833	-95,55	

\*záporná hodnota inhibície hmotnosti I<sub>hmotnosti</sub> (%) značí stimuláciu

Je vidieť, že výsledky sa v rámci jednotlivých opakovaní nezhodujú, preto neboli už spoločne priemerované pre vynesenie do spoločného grafu. V prvom opakovaní testu s PHB  $\leq$  63 $\mu$ m bol u všetkých koncentrácií zaznamenaný nárast hmotnosti, avšak nárast v kontrole sa zhoduje s nárastom v najvyššej koncentrácií. V ďalších testoch naopak prevládala u všetkých koncentrácií inhibícia hmotnosti. V druhom opakovaní s časticami PHB 63–125  $\mu$ m bola zaznamenaná stimulácia prírastku hmotnosti, ktorá sa zvyšovala postupne so zvyšovaním koncentrácií. Tento test trvá 4 týždne, čo je pre organizmy zrejme dlhá doba, počas ktorej môžu byť rôzne ovplyvňované, čo sa preukáže na ich hmotnosti. Konkrétne vysvetlenie ale pre tieto kolísavé výsledky nemáme, pričom vplyv testovanej látky možno vylúčiť.

Pri porovnaní výskumov sa výsledky rovnako nezhodovali a mali rozdielne trendy. V štúdií sledujúcej efekt biodegradabilného plastu poly(butylénadipát-ko-tereftalátu) (PBAT)

zmiešaného s PLA na *L. terrestris* bola pozorovaná najvyššia inhibícia hmotnosti 17,6 % pri koncentrácii 0, 7 a 28 % MP v pôde [82]. Nami získané hodnoty sa približovali 14 % inhibície hmotnosti, ale len v jednom teste. Mikročastice PE (s veľkosťou 250–1000  $\mu\text{m}$ ) počas 28 dní u dážďovky *L. terrestris* nevyvolali žiadne výrazne zmeny pri aplikácii zhodných koncentrácií PE s tými našimi [86]. V ďalšej štúdií častice PE (0,125–500 g/kg) taktiež nespôsobili podstatné zmeny v biomase, avšak rýchlosť rastu dážďoviek bola nižšia v porovnaní s kontrolným ošetrením. Pri porovnaní s PLA (s rovnakými koncentraciami) boli rýchlosti rastu dážďoviek vyššie ako pri kontrolne [83].

Uvažovanie bolo, či nešlo o nedostatok potravy a preto namiesto príbytku hmotnosti – hmotnosť klesala. No medzi intervalmi prikrmovania vložky z povrchu pôdy ani neboli úplne spotrebované, takže sa dá predpokladať že potravy bol dostatok. Krmivo, ovsená múčka, bola zvolená podľa odporúčaní v norme [37], preto problém v potrave s veľkou pravdepodobnosťou nebol.

### Účinky expozície na prežitie

V Tab. 10 sú uvedené spriemerované mortality pre jednotlivé opakovania chronických testov.

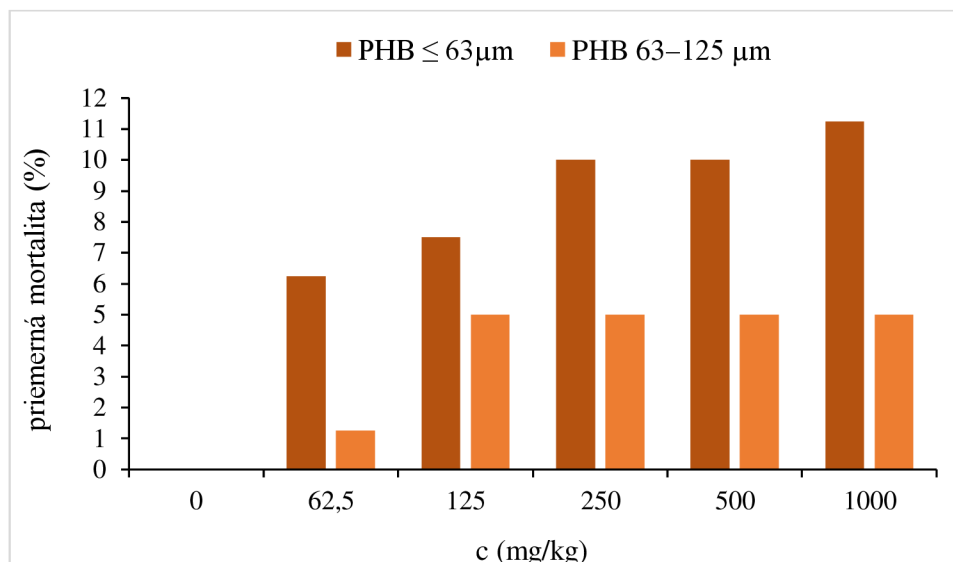
Tab. 10: Priemerná percentuálna mortalita na koncentráciu

c (mg/kg)	PHB $\leq 63\mu\text{m}$		PHB 63–125 $\mu\text{m}$	
	1. opakovanie	2. opakovanie	1. opakovanie	2. opakovanie
0	0,0	0,0	0,0	0,0
62,5	12,5	5,0	0,0	2,5
125	10,0	5,0	0,0	10,0
250	10,0	10,0	2,5	7,5
500	15,0	5,0	7,5	2,5
1000	17,5	5,0	2,5	7,5

V kontrolných nádobách prežilo 100 % organizmov, takže jedna z podmienok platnosti testov je splnená. Aj napriek prolongovanej dobre expozície (oproti akútnym testom) je vidieť, že najvyššia úmrtnosť dosahovala len 17, 5% v teste s PHB  $\leq 63\mu\text{m}$ . S časom sa teda úmrtnosť nezvyšovala. Po spriemerovaní opakovaní testov boli získané hodnoty vynesené do spoločného grafu (Graf 4). V testoch s menšími časticami PHB je vidieť mierny stúpajúci trend, kdežto u väčších častíc sa prežívanie dážďoviek medzi koncentraciami nelíšilo.

Čo sa týka už spomínaných štúdií uvádzajúcich výsledky testov pri zhodných koncentraciách, u mikročastíc PE [55, 58] po 28 dňoch neboli taktiež zaznamenané žiadne významné účinky na prežitie. Tieto výsledky na mortalitu pri podobných koncentraciách sa spravidla zhodovali.





Graf 4: Priemerné mortality v jednotlivých koncentráciách (%)

### Účinok expozície na reprodukčný výkon

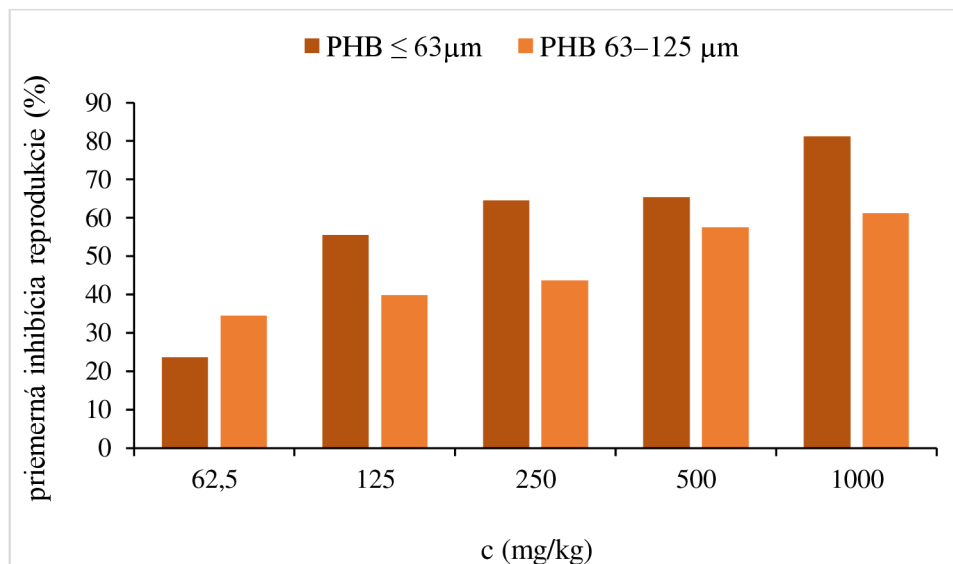
Posledným endpointom v chronických testoch bola reprodukcia. Vplyv na reprodukčné schopnosti bol sledovaný pomocou počtu juvenilov zrátaných v jednotlivých koncentráciách po 56 dňoch. Inhibícia reprodukcie je vždy vzťahovaná na kontrolné vzorky, ale nevzťahuje sa na dospelých preživších (nezahŕňa uhynuté organizmy), pretože sa s určitosťou nevie, či uhynuté jedince poskytli pred úmrtím nejaké juvenilny. Bol preto porovnaný počet narodených jedincov na koncentráciu.

Tab. 11: Súhrn výsledkov zameraných na reprodukciu organizmov

c (mg/kg)	PHB ≤ 63 μm			PHB 63–125 μm		
	J	K	I <sub>reprodukcie</sub> (%)	J	K	I <sub>reprodukcie</sub> (%)
1. opakovanie						
0	40	16		55	21	
62,5	36	14	11,18	43	19	22,27
125	18	8	55,90	42	17	23,64
250	12	5	69,57	40	17	27,27
500	11	4	72,67	29	12	48,18
1000	6	2	85,09	26	12	52,27
2. opakovanie						
c (mg/kg)	J	K	I <sub>reprodukcie</sub> (%)	J	K	I <sub>reprodukcie</sub> (%)
0	40	21		61	20	
62,5	25	12	36,08	33	18	46,72
125	18	8	55,06	27	14	56,15
250	16	6	59,49	24	18	60,25
500	17	5	58,23	20	14	66,80
1000	9	3	77,22	18	10	70,08

J – priemerný počet juvenilov na testovaciu nádobu, K – priemerný počet kokónov na testovaciu nádobu, I<sub>reprodukcie</sub> – priemerná inhibícia reprodukcie vzťahovaná na kontrolu

Súhrn výsledkov zo všetkých chronických testov je uvedený v Tab. 11 a priemerované hodnoty inhibície reprodukcie pre porovnanie veľkostných frakcií sú v nasledujúcom grafe (Graf 5). Z hodnôt inhibície uvedených v tabuľke, ale aj z grafu je zrejmé, že v závislosti od koncentrácie sa prejavil stúpajúci trend v inhibícii reprodukčnej schopnosti testovacích jedincov – bez výnimky v ani jednom opakovaní.



Graf 5: Priemerné inhibície reprodukcie

Podmienkou platnosti testu podľa normy [37] je, aby v kontrolných nádobách bolo narodených viac ako 30 juvenilov, čo naše testy splňujú.

Dážd'ovky sú známe vysokou mierou reprodukcie, ale v štúdiách sa opakuje tvrdenie, že toxické látky v životnom prostredí na rozmnožovanie majú výrazný vplyv. V prehľadnej štúdii sú však uvádzané výsledky, ktoré sa v niektorých prípadoch zhodujú a niektoré ich naopak vyvracajú – záleží to od typu plastu a veľkosti častíc [58]. V štúdii vykonávanej na organizme *E. andrei* pri expozícii rovnakej koncentrácie mikročasticiam PE nebol preukázaný žiaden významný trend v inhibícii reprodukcie. Napriek tomu histopatologická analýza čreva poskytla dôkazy o poškodení a odpovediach imunitného systému na MP [76]. Na základe tohto endpointu bolo očakávané prejavenie efektu PHB na suborganizmalnej úrovni.

#### 4.2 Zavedené testy na suborganizmalnej úrovni

Testy na suborganizmalnej úrovni – stanovenie biomarkerov – boli po optimalizácii realizované na organizmoch získaných po ukončení vyššie uvedených testov. Z každého typu testu a každej veľkostnej frakcie bol vybraný jeden test pre biochemickú analýzu. Bolo to hlavne kvôli časovej náročnosti, pretože v jednom teste je 24 vzoriek (6 koncentrácií po 4 opakovania) a všetky boli podrobené 3 stanoveniam rozličnými postupmi. Takže boli preverené aktivity enzýmu katalázy a peroxidácie lipidov (za súčasného stanovenia proteínu vo vzorke) v 2 testoch s referenčnou  $H_3BO_3$  – pre overenie trendov, ďalej v 2 akútnych testoch (1. test s PHB ≤ 63 μm, 2. test s PHB 63–125 μm) a v 2 chronických testoch (1. test s PHB ≤ 63 μm, 2. test

s PHB 63–125  $\mu\text{m}$ ). Získané výsledky sú uvedené a diskutované v nasledujúcich podkapitolách.

#### 4.2.1 Koncentrácie proteínov stanovené Lowryho metódou

Koncentrácie proteínu v jednotlivých vzorkách boli vypočítané podľa postupu v kapitole 3.4.2.. Výsledné hodnoty vyjadrujú koncentráciu proteínu na g tkaniva. Pohybovali sa v rozmedzí 21, 94–48,72 mg/g tkaniva organizmu. Kvôli veľkému objemu dát boli získane koncentrácie umiestnené do príloh (Príloha 3).

#### 4.2.2 Aktivity enzýmu katalázy

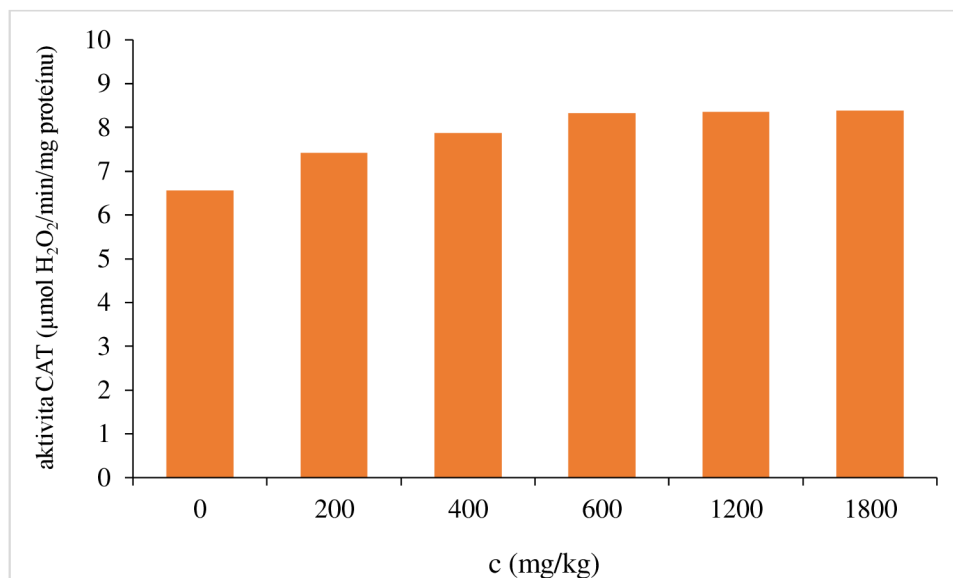
Aktivita enzýmu katalázy bola stanovená na základe smernice krivky získanej z odčítania absorbancie pri rozklade  $\text{H}_2\text{O}_2$  vo vzorke. Aktivita bola prepočítaná na množstvo proteínu v tkanive organizmu. Takto získané hodnoty sú uvedené v Tab. 12, ktorá uvádza výsledky stanovené pre test s referenčnou látkou –  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

Tab. 12: Aktivita katalázy v teste s  $\text{H}_3\text{BO}_3$

Kyselina boritá	
c (mg/kg)	aktivita CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg proteínu}$ )
0	6,559
200	7,427
400	7,876
600	8,328
1200	8,350
1800	8,389

Kataláza je bežným enzýmom prítomným takmer vo všetkých organizmoch a je nepretržite produkovaná mnohými metabolickými dráhami – jej výskyt v organizme je prirodzený. Dážďovky majú vo svojich črevách špeciálne metabolity, ktoré napomáhajú obrane proti oxidačnému pôsobeniu. Vtedy sa množstvo antioxidantných enzýmov zvyšuje, aby pomohli neutralizovať a katalyzovať odstránenie zväčšeného množstva  $\text{H}_2\text{O}_2$  v organizme. Zvýšená syntéza enzýmu teda znamená, že dážďovky používajú antioxidant na boj proti stresu. Rýchlosť rozkladu  $\text{H}_2\text{O}_2$  je závislá na syntéze katalázy [84].

To vysvetľuje, prečo je aj v kontrolnej nádobe zaznamenaná aktivita tohto enzýmu. Čo je dôležité, so vzrastajúcou koncentráciou kyseliny boritej narastala aj aktivita enzýmu – aj keď nie výrazne, trend je viditeľný aj na nasledujúcom grafe (Graf 6). Tento trend podporil správnosť prevedenia stanovenia enzýmu.



Graf 6: Vypočítané aktivity katalázy v teste s H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Po prejavenej inhibícii reprodukcie u všetkých chronických testov s PHB bol podobný trend očakávaný aj pri enzymatickej aktivite. Výsledky z testov s látkou PHB uvedené v Tab. 13 však stúpajúci trend nepotvrdili.

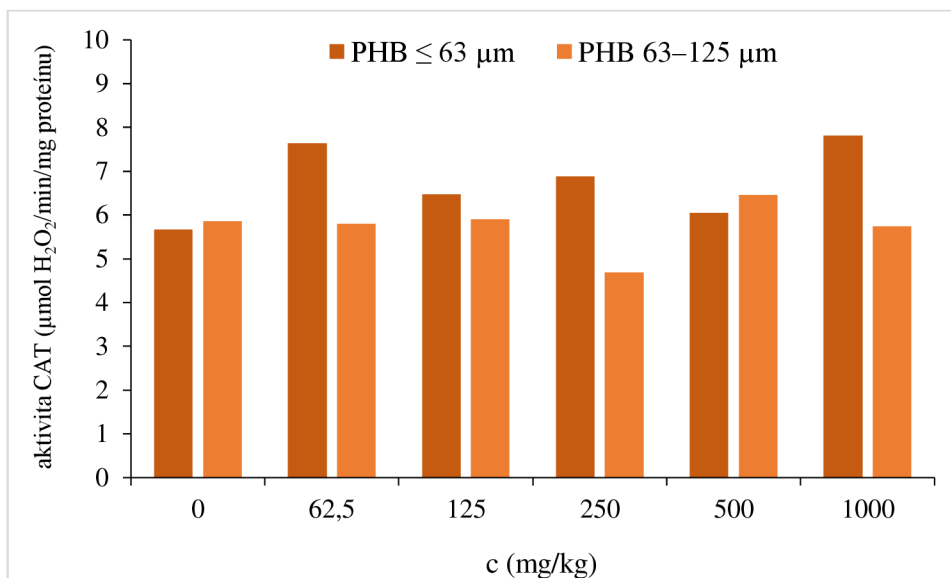
Tab. 13: Aktivita katalázy v testoch s PHB

c (mg/kg)	Akútny test		Chronický test	
	PHB ≤ 63 μm	PHB 63–125 μm	PHB ≤ 63 μm	PHB 63–125 μm
	aktivita CAT (μmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg proteínu)			
0	5,670	5,856	7,341	6,015
62,5	7,640	5,791	8,087	7,288
125	6,464	5,903	8,268	6,971
250	6,877	4,682	9,347	7,069
500	6,042	6,461	8,136	6,731
1000	7,810	5,739	7,312	6,976

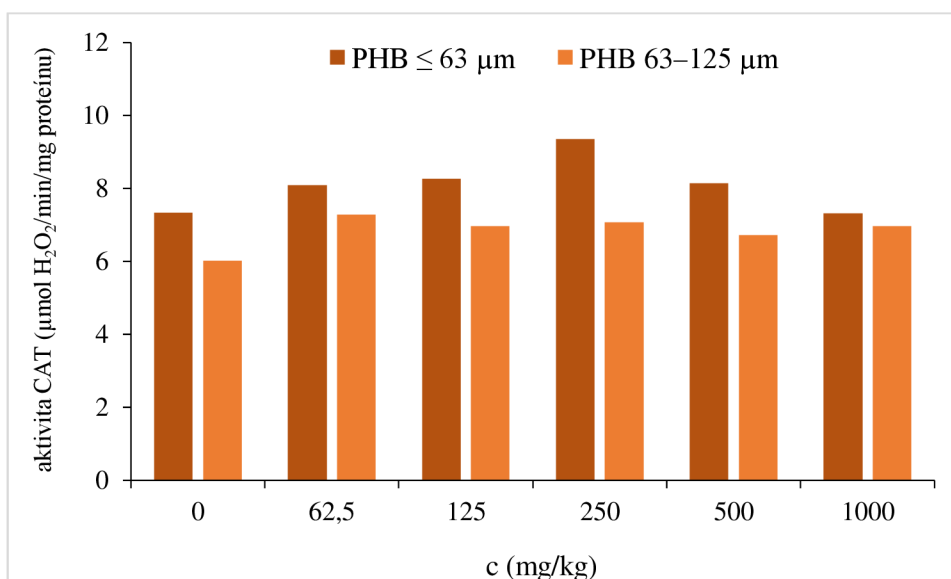
V kontrolných nádobách boli stanovené rozdielne hodnoty katalázy. Pripadá do úvahy, že aj organizmy v kontrolných nádobách podliehali určitému stresu (obzvlášť v chronickom teste, kedy s nimi bolo manipulované omnoho častejšie).

Výsledkov v štúdií, kedy bola *E. fetida* vystavená mikročasticiam LDPE o veľkosti 250–1000 μm (so zhodujúcimi sa koncentráciami s našimi) [75], nepotvrdili výrazné zmeny aktivity enzýmu oproti kontrole. V ich prípade šlo však o pokles aktivity katalázy, čo pripisovali zníženej aktivite enzýmu SOD (na ktorý kataláza nadväzuje), alebo možnosti, že niektoré plastové prísady majú schopnosť pôsobiť ako inhibítory katalázy.

Výsledky stanovených aktivít katalázy boli vynesené aj do spoločných grafov (Graf 7 a 8).



Graf 7: Vypočítané aktivity katalázy v akútnych testoch s PHB

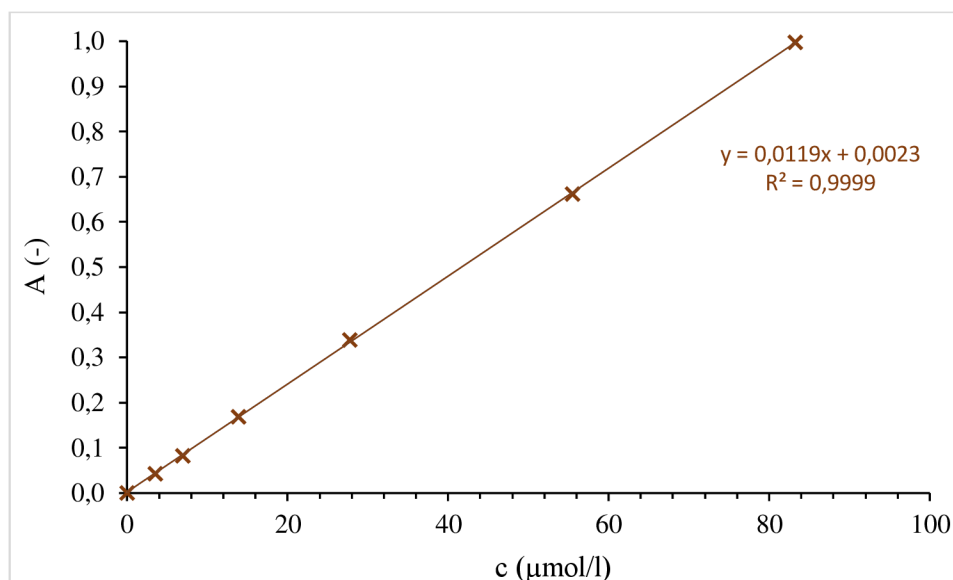


Graf 8: Vypočítané aktivity katalázy v chronických testoch s PHB

Dážd'ovkám je pripisovaná schopnosť adaptácie na stres, ktorý vyvolávajú oxidačné zlúčeniny do dvoch týždňov po expozícii. Čo bolo diskutované vo viacerých štúdiách, kedy bola aktivita v prvých dňoch expozície výrazne zvýšená a postupne sa vracala naspäť k hodnotám kontrolných vzoriek [84, 85]. V našich prípadoch to nie je možné porovnať, pretože v akútnych testoch sa testovala aktivita po 14 dňoch a v chronických po 28 dňoch, ale jednalo sa o iné jedince – ktoré mohli byť inak ovplyvnené. Na tento rozdiel aktivít by bolo vhodné zamerať sa pri ďalších testovaniach tejto látky.

### 4.2.3 Peroxidácia lipidov stanovená pomocou TBARS

V experimentálnej časti (kapitola 3.4.4.) je uvedený postup kalibrácie štandardu MDA. Pre výpočet vzniknutých produktov TBARS v jednotlivých vzorkách bolo potrebné premeniť koncentrácie kalibračných roztokov z mg/l na  $\mu\text{mol/l}$  (v ktorých má byť výsledná koncentrácia uvedená). Koncentrácie v  $\mu\text{mol/l}$  boli použité na vytvorenie kalibračnej krivky vynesím na os x a prislúchajúce absorbancie boli vynesené na os y (Graf 9).

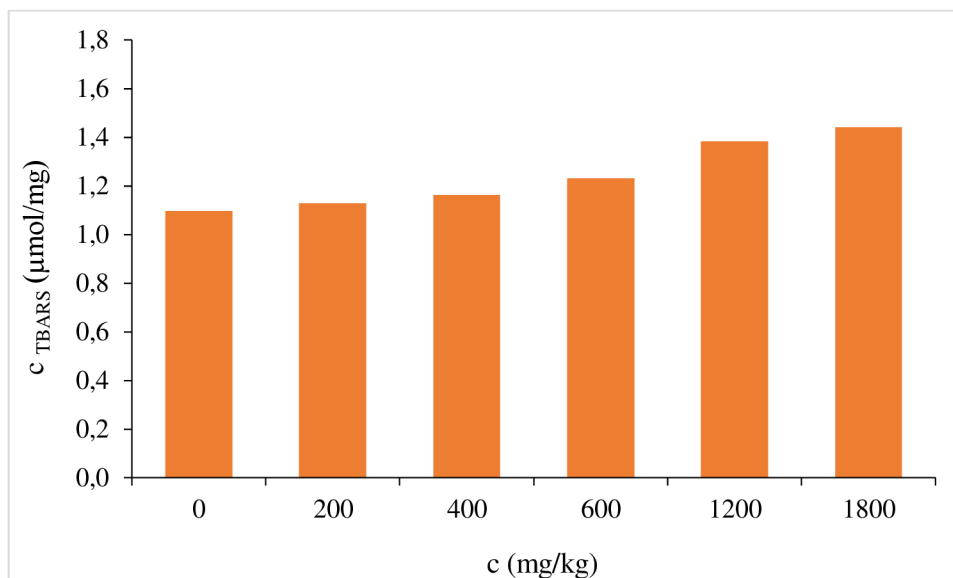


Graf 9: Kalibračná krivka závislosti absorbancie na koncentracie MDA

Pomocou získanej rovnice z kalibrácie a nameraných absorbancií jednotlivých vzoriek boli vypočítané koncentrácie produktov TBARS vo všetkých vzorkách. Aby boli vzťahované na množstvo tkaniva organizmu v stanovovanej vzorke – boli hodnoty podelené prislúchajúcou koncentráciou proteínu. Výsledky sú vyjadrené ako  $\mu\text{mol TBARS}$  na mg proteínu (Tab. 14) a boli vynesené do stĺpcového grafu (Graf 10).

Tab. 14: Koncentrácia TBARS v teste s  $\text{H}_3\text{BO}_3$

Kyselina boritá	
c (mg/kg)	$c_{\text{TBARS}}$ ( $\mu\text{mol/mg}$ )
0	1,098
200	1,127
400	1,163
600	1,229
1200	1,383
1800	1,441



Graf 10: Vypočítané koncentrácie TBARS v teste s H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

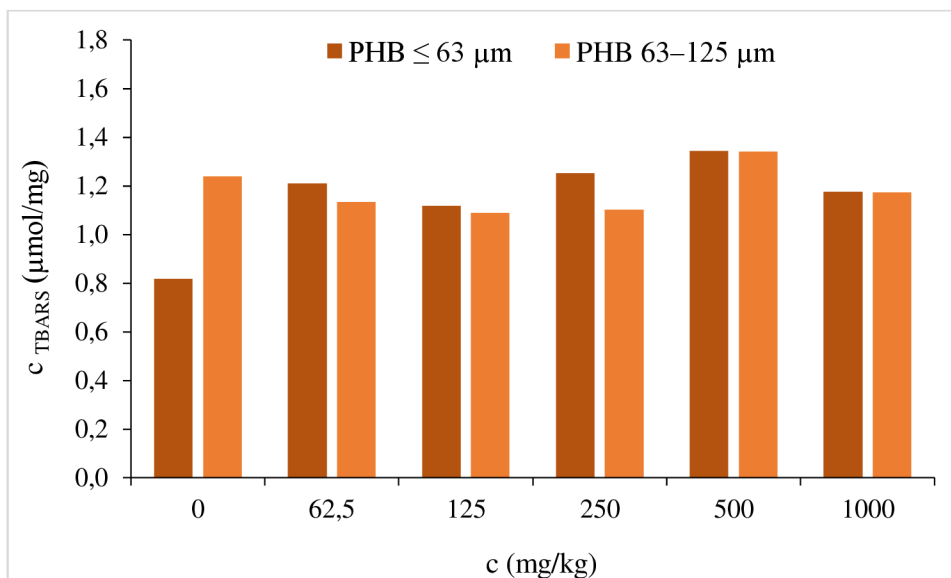
Malondialdehyd (MDA) spolu s ďalšími produktami peroxidácie (TBARS) sú hlavným ukazateľom poškodenia lipidov v tkanivách organizmov. Pri oxidačnom strese sa koncentrácia TBARS zvyšuje. Zvyšovanie by malo korelovať s nárastom katalázy, ktorá potvrdzuje obranu voči ROS.

V prípade kyseliny boritej je vidieť, že koncentrácia TBARS narastá v závislosti od koncentrácie referenčnej látky. Tým bola potvrdená citlivosť biomarkeru na toxickú látku.

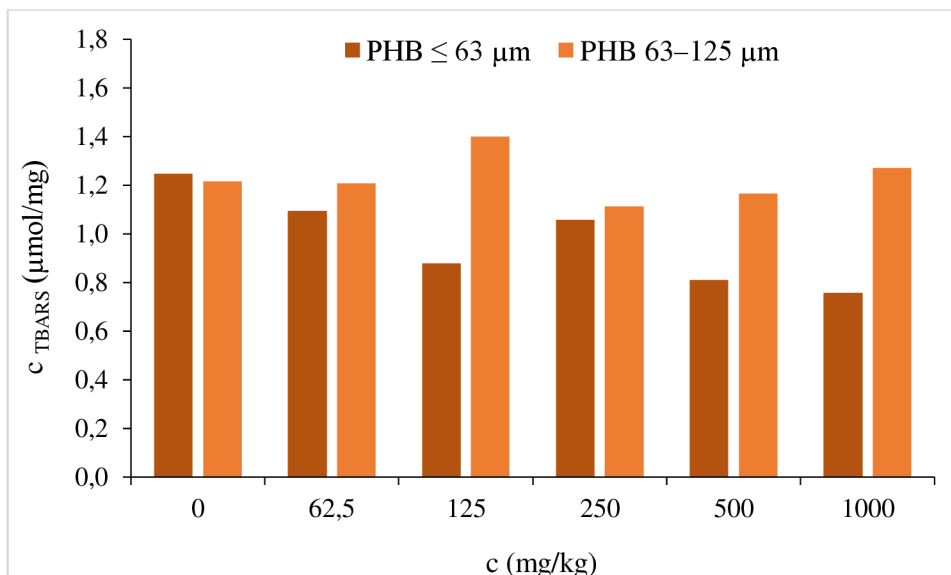
Nasledujúca tabuľka (Tab. 15) uvádza výsledky získaných koncentrácií TBARS v akútnych a chronických testoch s PHB s oboma veľkostnými frakciami. Výsledky stanovených koncentrácií boli vynesené do grafov (Graf 11 a 12).

Tab. 15: Koncentrácia TBARS v testoch s PHB

c (mg/kg)	Akútny test		Chronický test	
	PHB ≤ 63 μm	PHB 63–125 μm	PHB ≤ 63 μm	PHB 63–125 μm
	c <sub>TBARS</sub> (μmol/mg)			
0	0,818	1,239	1,247	1,215
62,5	1,211	1,134	1,095	1,207
125	1,118	1,088	0,878	1,399
250	1,251	1,102	1,058	1,114
500	1,344	1,341	0,812	1,165
1000	1,175	1,174	0,758	1,270



Graf 11: Vypočítané koncentrácie TBARS v akútnych testoch s PHB



Graf 12: Vypočítané koncentrácie TBARS v chronických testoch s PHB

So získaných výsledkov stanovených na organizmoch vystavených mikročasticiam PHB opäť neboli pozorované žiadne výrazné a zhodujúce sa trendy. V kontrolných vzorkách organizmov sa koncentrácia TBARS v 3/4 testoch pohybovala okolo hodnoty 1,2 μmol/mg, kdežto v jednom teste bola výrazne nižšia – s hodnotou 0,8 μmol/mg. Mohlo ísť o chybu v rámci jedného merania, alebo to bolo spôsobené rozdielnymi podmienkami pri prebiehajúcich testoch. Podmienky pri testoch majú byť zhodné, ale každý test sa môže vykonávať s rozdielnou citlivosťou, preto ťažko zrovnávať koncentrácie TBARS v kontrolných vzorkách s inými štúdiami.

Naše výsledky nie sú v zhode so štúdiou autorov, kedy pri testovaní vplyvu LDPE (pri rovnakých koncentráciách s našimi a pri zhodnom postupe prevedenia testu) na *E. fetida* –



organizmy vystavené vyšším koncentráciám LDPE (250–1000 mg/kg) mali najvyššie priemerné hodnoty TBARS na mg proteínu so štatisticky významnými rozdielmi v porovnaní s kontrolnými vzorkami organizmov [75]. Pri koncentrácii 1 g/kg LDPE po expozícii 28 dní bola koncentrácia TBARS v ďalšej štúdií [86] taktiež výrazne zvýšená. Pričom sa najväčší nárast zaznamenal v priebehu prvých 7 dní.

V inej štúdií, kde boli testované PE a PP mikročastice (o veľkosti 8–1660 µm) prostredníctvom *E. fetida*, obsahy TBARS predstavovali rôzne stupne poklesu po 14 a 28 dňoch, čo naznačuje, že expozícia mikročastíc nemala vplyv na peroxidáciu lipidov. Pokles pripisovali účinnej obrane antioxidantných enzýmov [85].

Ako je vidieť, výsledky stanovovaných peroxidácii lipidov sú rôzne, pričom je tam pravdepodobnosť korelácie s koncentráciou prítomných mikroplastov. V tejto fáze však zatiaľ nie je možné vyvodzovať následky nami testovaných koncentrácií mikročastíc PHB.

### **4.3 Zhodnotenie získaných výsledkov**

Aj keď sa jedná o modelový organizmus, z našich výsledkov nie je možné vyvodzovať žiadne objektívne závery. Bolo by potrebné zvýšiť počet testov, pre prikloneniu sa k variante prírastku alebo úbytku hmotnosti organizmov – v klasických akútnych a chronických testoch, ktorá bola v testov najviac kolísavá. Pritom podmienky jednotlivých testov boli zhodné, pH umelo pripravovanej pôdy bolo vždy v povolenom rozmedzí, teplota laboratória bola vždy kontrolovaná. Z môjho názoru sa preto jedná o vysoko citlivé organizmy. Preto mohla byť ich zhoršená kondícia ovplyvnená aj samotnou manipuláciou, či individuálnou aklimatizáciou na nové podmienky po premiestnení do testovacieho média a s novým druhom potravy.

Nejednoznačné výsledky v týchto testoch sa tak prejavili aj v biochemickej analýze. Hoci nejde o metódy využívané v našich laboratórnych podmienkach už dlho, z čoho by bolo možné vyvodit' ich citlivosť a správnosť využitia pre nami testované organizmy, trend pri testovaní tkaniva po expozícii H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> bol preukázaný. To nám potvrdilo určitú citlivosť zavedených metód. Preto nemožno prisudzovať nejednotné výsledky v testovaní tkaniva organizmov po expozícii PHB spôsobu prevedenia metódy. V budúcnosti bude však potreba ich zdokonalit' a vymedziť možné interferencie pre získ presnejších výsledkov.

## 5 ZÁVER

Predložená diplomová práca je zameraná na posúdenie vplyvu biodegradabilného mikroplastu polyhydroxybutyrátu na zástupcu pôdnych bezstavovcov dážďovku hnojnú (*E. fetida*). Cieľom bolo posúdenie účinkov ako na organizmálnej, tak aj na suborganizmálnej úrovni.

Teoretická časť je preto venovaná všeobecnému prehľadu ekotoxikologických testov a metód využívaných k stanoveniu rôznych biomarkerov oxidačného stresu, ďalej je venovaná zhodnoteniu vhodnosti využitia organizmu *E. fetida* v týchto testoch a poslednej časti sa poukazuje na problematiku mikroplastov v pôdnom prostredí.

Náplňou experimentálnej práce bolo realizovať ekotoxikologické testy – akútne a chronické, kde boli organizmy *E. fetida* vystavené mikroplastom PHB o dvoch veľkostných frakciách (častice PHB v rozmedzí 63–125  $\mu\text{m}$  a častice PHB  $\leq 63 \mu\text{m}$ ). Následne bolo úlohou zaviesť metódy na stanovenie biomarkeru oxidačného stresu. Na základe preštudovanej literatúry boli zvolené a prispôsobené našim laboratórnym podmienkam metódy na stanovenie enzýmu katalázy a peroxidácie lipidov. Tieto metódy boli po optimalizácii realizované na hodnotenie tkaniva organizmov po vystavení PHB.

Výsledky inhibície hmotnosti či mortalita získané v rámci akútnych a chronických testov nepredstavovali výrazné rozdiely, čo znamená, že ani po 28 dňoch mikročastice PHB prítomné v testovacom médiu nepreukázali významný vplyv na testovacie organizmy. Jediný preukázaný efekt u všetkých chronických testoch bol v inhibícii reprodukcie so zvyšujúcou sa koncentráciou častíc PHB. Preto bolo očakávané, že sa vplyv PHB prejaví na suborganizmálnej úrovni pomocou zavedených metodík. Efekt však nebol preukázaný pri stanovovaní aktivity katalázy a peroxidácii lipidov. Zavedené metódy však preukázali negatívne vplyvy na organizmus pri testovaní referenčnej látky – kyseliny boritej, preto možno predpokladať vhodnosť zvolených biomarkerov. Avšak výsledky na poukázanie vplyvu PHB na pôdne organizmy nie sú zatiaľ v tomto štádiu skúmania preukázateľné.

Zavedené metódy môžu byť však ďalej využité k testovaniu vplyvu tejto látky na suborganizmálnej úrovni, čo je v budúcnosti potrebné z dôvodu zisku viacerých výsledkov a ich objektívnemu potvrdeniu alebo vyvráteniu. Možno sa zároveň vynára aj potreba zdokonaľiť použité metódy, aby vykazovali väčšiu citlivosť voči testovanej látke.

## 6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] LINHART, Igor. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. 2., upr. a rozš. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014. ISBN 978-80-7080-877-1.
- [2] ANDĚL, Petr. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Liberec: Evernia, 2011. ISBN 978-80-903787-9-7.
- [3] KOČÍ, Vladimír a Klára MOCOŤVÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2009. ISBN 978-80-7080-699-9.
- [4] FURUHAGEN, Sara. *Application and interpretation of biomarkers in ecotoxicology*. Stockholm University, 2015. ISBN 978-91-7649-252-9
- [5] ASSMUS, Heike E, Ralf HERWIG, Kwang-Hyun CHO a Olaf WOLKENHAUER. *Dynamics of biological systems: role of systems biology in medical research. Expert Review of Molecular Diagnostics* [online]. 2014, **6**(6), 891-902 [cit. 2023-02-01]. ISSN 1473-7159. Dostupné z: doi:10.1586/14737159.6.6.891
- [6] SANAJOU, Sonia a Gönül ŞAHİN. Mechanistic Biomarkers in Toxicology. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2021, **18**(3), 376-384 [cit. 2023-03-07]. ISSN 1304-530X. Dostupné z: doi:10.4274/tjps.galenos.2020.10270
- [7] HOOK, Sharon E, Evan P GALLAGHER a Graeme E BATLEY. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated Environmental Assessment and Management* [online]. 2014, **10**(3), 327-341 [cit. 2023-03-07]. ISSN 15513777. Dostupné z: doi:10.1002/ieam.1530
- [8] VELKI, Mirna a Sandra EČIMOVIĆ. Important Issues in Ecotoxicological Investigations Using Earthworms. In: DE VOOGT, Pim, ed. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 239* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2016, s. 157-184 [cit. 2023-03-07]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. ISBN 978-3-319-33971-9. Dostupné z: doi:10.1007/398\_2016\_4
- [9] RODRÍGUEZ-CARRILLO, Andrea, Vicente MUSTIELES, Elena SALAMANCA-FERNÁNDEZ, et al. Implementation of effect biomarkers in human biomonitoring studies: A systematic approach synergizing toxicological and epidemiological knowledge. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* [online]. 2023, **249** [cit. 2023-04-27]. ISSN 14384639. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijheh.2023.114140
- [10] ĎURAČKOVÁ, Zdena. *Volné radikály a antioxidanty v medicíne*. Bratislava: Slovak Academic Press, 1998. ISBN 80-88908-11-6.
- [11] ĎURAČKOVÁ, Zdena. *Volné radikály a antioxidanty v medicíne*. Bratislava: Slovak Academic Press, 1999. ISBN 80-88908-46-9.

- [12] CARMO DE CARVALHO E MARTINS, Maria do, Amanda Suellenn DA SILVA SANTOS OLIVEIRA, Liriane Andressa Alves DA SILVA, Máisa Guimarães Silva PRIMO a Vanessa Brito DE CARVALHO LIRA. Biological Indicators of Oxidative Stress [Malondialdehyde, Catalase, Glutathione Peroxidase, and Superoxide Dismutase] and Their Application in Nutrition. In: PATEL, Vinood B. a Victor R. PREEDY, ed. *Biomarkers in Nutrition* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2022, 2022-10-15, s. 833-856 [cit. 2023-03-17]. Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications. ISBN 978-3-031-07388-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-031-07389-2\_49
- [13] ŠIŠKOVÁ, Katarína. *Volné radikály a oxidačný stres*. Lékařská fakulta v Plzni Univerzity Karlovy, 2015. ISBN 978-80-88120-07-0
- [14] MAHOMOODALLY, Mohamad Fawzi, Daphne DÉSIRÉ A.-L. a Elodie ROSETTE M. A.-L. Catalase. In: *Antioxidants Effects in Health* [online]. Elsevier, 2022, 2022, s. 81-90 [cit. 2023-03-18]. ISBN 9780128190968. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819096-8.00022-7
- [15] GALASSO, Marilisa, Simona GAMBINO, Maria Grazia ROMANELLI, Massimo DONADELLI a Maria Teresa SCUPOLI. Browsing the oldest antioxidant enzyme: catalase and its multiple regulation in cancer. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2021, **172**, 264-272 [cit. 2023-03-17]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.06.010
- [16] LUBOS, Edith, Joseph LOSCALZO a Diane E. HANDY. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. 2011, **15**(7), 1957-1997 [cit. 2023-03-16]. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2010.3586
- [17] AHMED, Ahmed Yasser, Saadon Abdulla AOWDA a Mahmoud Hussein HADWAN. A validated method to assess glutathione peroxidase enzyme activity. *Chemical Papers* [online]. 2021, **75**(12), 6625-6637 [cit. 2023-03-24]. ISSN 0366-6352. Dostupné z: doi:10.1007/s11696-021-01826-1
- [18] VAŠKOVÁ, Janka, Ladislav KOČAN, Ladislav VAŠKO a Pál PERJÉSI. Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. *Molecules* [online]. 2023, **28**(3) [cit. 2023-04-28]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28031447
- [19] KOPŘIVA, Vladimír. *Vybrané instrumentální metody v biochemických cvičeních*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2012. ISBN 978-80-7305-627-8
- [20] RAJCHARD, Josef. *Ekologie III*. České Budějovice: Kopp, 2002. ISBN 80-7232-191-9.
- [21] MIKO, Ladislav. *Život v půdě: příručka pro začínající půdní biology*. Brno: Lipka - školské zařízení pro environmentální vzdělávání Brno, příspěvková organizace, 2019. ISBN 978-80-88212-17-1.
- [22] KARKI, Garub. *Earthworm: habit, habitat, external feature and morphology*. [online]. 2020. [cit. 2023-02-11]. Dostupné z: <https://www.onlinebiologynotes.com/earthworm-habit-habitat-external-feature-and-morphology/>
- [23] External Morphology od Earthworm. *Microbiology notes*. [online]. 2016. [cit. 2023-02-09]. Dostupné z: <https://microbiologynotes.com/external-morphology-earthworm/>
- [24] Earthworm Phylum Characteristics. *SCIENCING*. [online]. [cit. 2023-02-10]. Dostupné z: <https://sciencing.com/earthworm-phylum-characteristics-8209511.html>

- [25] KARKI, Garub. *Nervous system of Earthworm*. [online]. [cit. 2023-02-09]. Dostupné z: <https://www.onlinebiologynotes.com/nervous-system-of-earthworm/>
- [26] Digestive System of Earthworm. *Microbiology notes*. [online]. 2016. [cit. 2023-02-09]. Dostupné z: <https://microbiologynotes.com/digestive-system-earthworm/>
- [27] How Do Earthworms Reproduce? *SCIENCING*. [online]. [cit. 2023-02-12]. Dostupné z: <https://sciencing.com/how-do-earthworms-reproduce-13406886.html>
- [28] POMMERESCHE, Reidun. *Žížaly a jejich význam pro zlepšování kvality půdy*. Olomouc: Bioinstitut, 2010. ISBN 978-80-87371-02-2.
- [29] S, Ali. Life Cycle of Vermicomposting Earthworms *Eisenia fetida* and *Eudrilus eugeniae* Under Laboratory Controlled Condition. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research* [online]. 2018, **10**(5) [cit. 2023-02-04]. ISSN 25741241. Dostupné z: [doi:10.26717/BJSTR.2018.10.002015](https://doi.org/10.26717/BJSTR.2018.10.002015)
- [30] Life cycle of Earthworm. *BrainKart*. [online]. [cit. 2022-11-13]. Dostupné z: [https://www.brainkart.com/article/Life-cycle-of-Earthworm-%28Lampito-mauritii%29\\_33177/](https://www.brainkart.com/article/Life-cycle-of-Earthworm-%28Lampito-mauritii%29_33177/)
- [31] VENTER, J.M. a A.J. REINECKE. The life-cycle of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African Journal of Zoology* [online]. 2015, **23**(3), 161-165 [cit. 2022-11-14]. ISSN 0254-1858. Dostupné z: [doi:10.1080/02541858.1988.11448096](https://doi.org/10.1080/02541858.1988.11448096)
- [32] EISENHAUER, Nico. *The intestines of the soil: the taxonomic and functional diversity of earthworms – a review for young ecologists*. Leipzig University, [online]. 2020 [cit. 2022-11-11]. Dostupné z: [doi.org/10.32942/osf.io/tfm5y](https://doi.org/10.32942/osf.io/tfm5y)
- [33] BLOUIN, M., M. E. HODSON, E. A. DELGADO, et al. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science* [online]. 2013, **64**(2), 161-182 [cit. 2022-11-12]. ISSN 13510754. Dostupné z: [doi:10.1111/ejss.12025](https://doi.org/10.1111/ejss.12025)
- [34] Earthworms' role in the ecosystem. *Science Learning Hub*. [online]. [cit. 2022-11-13]. Dostupné z: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/9-earthworms-role-in-the-ecosystem>
- [35] RAMNARAIN, Yvonne Indrani, Abdullah Adil ANSARI a Lydia ORI. Vermicomposting of different organic materials using the epigeic earthworm *Eisenia foetida*. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* [online]. 2019, **8**(1), 23-36 [cit. 2022-11-12]. ISSN 2195-3228. Dostupné z: [doi:10.1007/s40093-018-0225-7](https://doi.org/10.1007/s40093-018-0225-7)
- [36] What Eats Earthworms? *SCIENCING*. [online]. [cit. 2022-10-06]. Dostupné z: <https://sciencing.com/eats-earthworms-8421416.html>
- [37] OECD. Test No. 222. *Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*. [online]. OECD Publishing, Paris. 2016 [cit. 2023-01-25]. Dostupné z: [doi:10.1787/9789264264496-en](https://doi.org/10.1787/9789264264496-en)
- [38] LACKMANN, Carina, Mirna VELKI, Antonio ŠIMIĆ, Axel MÜLLER, Ulrike BRAUN, Sandra EČIMOVIĆ a Henner HOLLERT. Two types of microplastics (polystyrene-HBCD and car tire abrasion) affect oxidative stress-related biomarkers in earthworm *Eisenia andrei* in a time-dependent manner. *Environment International* [online]. 2022, **163** [cit. 2023-02-03]. ISSN 01604120. Dostupné z: [doi:10.1016/j.envint.2022.107190](https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107190)

- [39] ISO 17512-1:2008 *Soil quality — Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour — Part 1: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*. 1 ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2008.
- [40] OECD. Test No. 207: *Earthworm, Acute Toxicity Tests*. [online]. OECD Publishing, Paris. 1984 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: doi:10.1787/9789264070042-en
- [41] OECD. Test No. 317: *Bioaccumulation in Terrestrial Oligochaetes*, OECD Publishing, Paris. 2010 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1787/9789264090934-en>.
- [42] ŽALTAUSKAITĖ, Jūratė a Inga SODIENĖ. Effects of cadmium and lead on the life-cycle parameters of juvenile earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2014, **103**, 9-16 [cit. 2022-12-14]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2014.01.036
- [43] SCOTT-FORDSMAND, J.J., A. IRIZAR a M.J.B. AMORIM. Full life cycle test with *Eisenia fetida* - copper oxide NM toxicity assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2022, **241** [cit. 2023-01-25]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113720
- [44] TIWARI, Rishikesh K., Shikha SINGH, Ravi S. PANDEY a Bechan SHARMA. Enzymes of Earthworm as Indicators of Pesticide Pollution in Soil. *Advances in Enzyme Research* [online]. 2016, **04**(04), 113-124 [cit. 2023-04-17]. ISSN 2328-4846. Dostupné z: doi:10.4236/aer.2016.44011
- [45] HAN, Yingnan, Lusheng ZHU, Jinhua WANG, Jun WANG, Hui XIE a Shumin ZHANG. Integrated assessment of oxidative stress and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to azoxystrobin. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2014, **107**, 214-219 [cit. 2023-04-17]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2014.06.006
- [46] FENG, Lei, Lan ZHANG, Yanning ZHANG, Pei ZHANG a Hongyun JIANG. Inhibition and recovery of biomarkers of earthworm *Eisenia fetida* after exposure to thiacloprid. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2015, **22**(12), 9475-9482 [cit. 2023-04-17]. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-015-4122-6
- [47] WANG, Hengzhi, Xiaolin ZHANG, Lipeng WANG, Baolin ZHU, Wenlei GUO, Weitang LIU a Jinxin WANG. Biochemical responses and DNA damage induced by herbicide QYR301 in earthworm (*Eisenia fetida*). *Chemosphere* [online]. 2020, **244** [cit. 2023-04-17]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125512
- [48] ARABI, Mehran a Fatemeh MAHMOODIAN. Comparative toxicity of fresh and expired butachlor to earthworms *Eisenia fetida* in natural soil: Biomarker responses. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology* [online]. 2023, **5**, 108-119 [cit. 2023-05-03]. ISSN 25901826. Dostupné z: doi:10.1016/j.enceco.2023.03.002
- [49] YANG, Xiaoxia, Yufang SONG, Jianrong KAI a Xiufeng CAO. Enzymatic biomarkers of earthworms *Eisenia fetida* in response to individual and combined cadmium and pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2012, **86**, 162-167 [cit. 2023-03-20]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2012.09.022
- [50] SAINT-DENIS, M, J.F NARBONNE, C ARNAUD a D RIBERA. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2001, **33**(3), 395-404 [cit. 2023-03-28]. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/S0038-0717(00)00177-2

- [51] JIANG, Xiaofeng, Yeqian CHANG, Tong ZHANG, Yu QIAO, Göran KLOBUČAR a Mei LI. Toxicological effects of polystyrene microplastics on earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Pollution* [online]. 2020, **259** [cit. 2023-04-26]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.113896
- [52] LIU, Shuo, Qixing ZHOU a Yingying WANG. Ecotoxicological responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to soil contaminated with HHCb. *Chemosphere* [online]. 2011, **83**(8), 1080-1086 [cit. 2023-05-01]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.046
- [53] LIN, Dasong, Qixing ZHOU, Xiujie XIE a Yao LIU. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere* [online]. 2010, **81**(10), 1328-1333 [cit. 2023-05-01]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2010.08.027
- [54] NGUYEN, Lan Huong, Ba-Son NGUYEN, Duy-Tien LE, et al. A concept for the biotechnological minimizing of emerging plastics, micro- and nano-plastics pollutants from the environment: A review. *Environmental Research* [online]. 2023, **216** [cit. 2023-04-27]. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2022.114342
- [55] LIWARSKA-BIZUKOJC, Ewa. Effect of (bio)plastics on soil environment: A review. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, **795** [cit. 2023-04-27]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148889
- [56] HE, Defu, Yongming LUO, Shibo LU, Mengting LIU, Yang SONG a Lili LEI. Microplastics in soils: Analytical methods, pollution characteristics and ecological risks. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2018, **109**, 163-172 [cit. 2023-05-01]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.10.006
- [57] HUR, Jaeryung. Current Research Trends on the Effects of Microplastics in Soil Environment Using Earthworms: Mini-Review. [online]. 2021, 43(4) [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: <https://www.jksee.or.kr/upload/pdf/KSEE-2021-43-4-299.pdf>
- [58] CUI, Weizhen, Panpan GAO, Miaoyuan ZHANG, Lei WANG, Hongwen SUN a Chunguang LIU. Adverse effects of microplastics on earthworms: A critical review. *Science of The Total Environment* [online]. 2022, **850** [cit. 2023-04-05]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.158041
- [59] SIROHI, Ranjna, Jai PRAKASH PANDEY, Vivek KUMAR GAUR, Edgard GNANSOUNOU a Raveendran SINDHU. Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB). *Bioresource Technology* [online]. 2020, **311** [cit. 2023-04-05]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123536
- [60] ZIMMERMANN, Lisa, Andrea DOMBROWSKI, Carolin VÖLKER a Martin WAGNER. Are bioplastics and plant-based materials safer than conventional plastics? In vitro toxicity and chemical composition. *Environment International* [online]. 2020, **145** [cit. 2023-02-02]. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2020.106066
- [61] Bioplastics market data. *European Bioplastics*. [online]. [cit. 2022-12-06]. Dostupné z: <https://www.european-bioplastics.org/>
- [62] PLAMONDON, Chantal a Jay SINHA. *Život bez plastů*. Praha: Euromedia, 2018. Esence. ISBN 978-80-7549-756-7.

- [63] UPADHYAYA, Samiran a Neelotpal SEN SARMA. Biodegradable plastics as a substitute to traditional polythenes: a step toward a safer environment. In: *Environmental Sustainability and Industries* [online]. Elsevier, 2022, 2022, s. 193-215 [cit. 2023-02-03]. ISBN 9780323900348. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-90034-8.00004-X
- [64] SONG, J. H., R. J. MURPHY, R. NARAYAN a G. B. H. DAVIES. Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2009, **364**(1526), 2127-2139 [cit. 2023-04-02]. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2008.0289
- [65] DI BARTOLO, Alberto, Giulia INFURNA a Nadka Tzankova DINTCHEVA. A Review of Bioplastics and Their Adoption in the Circular Economy. *Polymers* [online]. 2021, **13**(8) [cit. 2023-04-02]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13081229
- [66] LIU, Lingchen, Mingjie XU, Yuheng YE a Bin ZHANG. On the degradation of (micro)plastics: Degradation methods, influencing factors, environmental impacts. *Science of The Total Environment* [online]. 2022, **806** [cit. 2023-03-16]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.151312
- [67] MCADAM, Blaithín, Margaret BRENNAN FOURNET, Paul MCDONALD a Marija MOJICEVIC. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers* [online]. 2020, **12**(12) [cit. 2023-03-17]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12122908
- [68] NAIR, Lakshmi S. a Cato T. LAURENCIN. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* [online]. 2007, **32**(8-9), 762-798 [cit. 2023-03-17]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017
- [69] NDUKO, John Masani a Seiichi TAGUCHI. Microbial Production of Biodegradable Lactate-Based Polymers and Oligomeric Building Blocks From Renewable and Waste Resources. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2021, **8** [cit. 2023-04-09]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.618077
- [70] ZAPLETAL, Martin a Jiří TREJBAL. Izolace polyhydroxyalkanoátů z bakteriální biomasy. *Chemické Listy*. [online]. 2016, 110(1). 860-867 [cit. 2023-04-14]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/120>
- [71] GARCÍA, A., D. SEGURA, G. ESPÍN, E. GALINDO, T. CASTILLO a C. PEÑA. High production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2014, **82**, 117-123 [cit. 2023-04-06]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2013.10.020
- [72] ARAMVASH, Asieh, Fatemeh MOAZZENI ZAVAREH a Narges GHOLAMI BANADKUKI. Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2018, **18**(1), 20-28 [cit. 2023-04-07]. ISSN 16180240. Dostupné z: doi:10.1002/elsc.201700102
- [73] DALTON, Bryan, Purabi BHAGABATI, Jessica DE MICCO, Ramesh Babu PADAMATI a Kevin O'CONNOR. A Review on Biological Synthesis of the Biodegradable Polymers Polyhydroxyalkanoates and the Development of Multiple Applications. *Catalysts* [online]. 2022, **12**(3) [cit. 2023-04-08]. ISSN 2073-4344. Dostupné z: doi:10.3390/catal12030319



- [74] ALTAEE, Nadia, Gamal A. EL-HITI, Ayad FAHDIL, Kumar SUDESH a Emad YOUSIF. Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil. *SpringerPlus* [online]. 2016, **5**(1) [cit. 2023-04-15]. ISSN 2193-1801. Dostupné z: doi:10.1186/s40064-016-2480-2
- [75] RODRÍGUEZ-SEIJO, Andrés, João P. DA COSTA, Teresa ROCHA-SANTOS, Armando C. DUARTE a Ruth PEREIRA. Oxidative stress, energy metabolism and molecular responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2018, **25**(33), 33599-33610 [cit. 2023-05-01]. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-018-3317-z
- [76] RODRIGUEZ-SEIJO, A., J. LOURENÇO, T.A.P. ROCHA-SANTOS, J. DA COSTA, A.C. DUARTE, H. VALA a R. PEREIRA. Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché. *Environmental Pollution* [online]. 2017, **220**, 495-503 [cit. 2023-05-01]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2016.09.092
- [77] ČSN ISO 11268-1. *Kvalita půdy – Účinky znečišťujících látek na žížaly – Část 1: Stanovení akutní toxicity pro Eisenia fetida/Eisenia andrei*. Praha: Český normalizační institut, 2014.
- [78] WATERBORG, Jakob H. a Harry R. MATTHEWS. The Lowry Method for Protein Quantitation. In: WALKER, John M., ed. *The Protein Protocols Handbook* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 1996, 1996, s. 7-9 [cit. 2023-04-25]. Springer Protocols Handbooks. ISBN 978-0-89603-338-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60327-259-9\_2
- [79] AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. In: *Oxygen Radicals in Biological Systems* [online]. Elsevier, 1984, 1984, s. 121-126 [cit. 2023-04-27]. Methods in Enzymology. ISBN 9780121820053. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- [80] BUEGE, John A. a Steven D. AUST. Microsomal lipid peroxidation. In: *Biomembranes - Part C: Biological Oxidations* [online]. Elsevier, 1978, s. 302-310 [cit. 2023-04-21]. Methods in Enzymology. ISBN 9780121819521. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(78)52032-6
- [81] NWLSS Malondialdehyde Assay Protocol. Northwest Life Science Specialities. [online]. [cit. 2023-04-20]. Dostupné z: <https://www.nwlifescience.com/protocols/nwk-mds01>
- [82] JU, Hui, Xiaomei YANG, Rima OSMAN a Violette GEISSEN. Effects of microplastics and chlorpyrifos on earthworms (*Lumbricus terrestris*) and their biogenic transport in sandy soil. *Environmental Pollution* [online]. 2023, **316** [cit. 2023-05-02]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2022.120483
- [83] DING, Weili, Zhen LI, Ruimin QI, Davey L. JONES, Qiuyun LIU, Qin LIU a Changrong YAN. Effect thresholds for the earthworm *Eisenia fetida*: Toxicity comparison between conventional and biodegradable microplastics. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, **781** [cit. 2023-05-01]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146884
- [84] GUDETA, Kasahun, Vineet KUMAR, Ankeet BHAGAT, et al. Ecological adaptation of earthworms for coping with plant polyphenols, heavy metals, and microplastics in the soil: A review. *Heliyon* [online]. 2023, **9**(3) [cit. 2023-05-03]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2023.e14572

[85] LI, Bing, Wenhui SONG, Yali CHENG, et al. Ecotoxicological effects of different size ranges of industrial-grade polyethylene and polypropylene microplastics on earthworms *Eisenia fetida*. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, **783** [cit. 2023-05-03]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.147007

[86] CHEN, Yuling, Xiaoning LIU, Yifei LENG a Jun WANG. Defense responses in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2020, **187** [cit. 2023-05-02]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109788

## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ATP	adenozintrifosfát
BSA	štandardný hovädzí albumín
CAT	kataláza
DTNB	kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
EC	efektívna koncentrácia
GP <sub>x</sub> ,	glutatiónperoxidáza
GR	glutatiónreduktáza
GSH	glutatión redukovaný
GSSG	glutatión oxidovaný
GST	glutathion-S-transferáza
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
IC	inhibičná koncentrácia
ISO	Medzinárodná organizácia pre normalizáciu
LC	letálna koncentrácia
LDPE	polyetylén s nízkou hustotou
LOAEC	najnižšia koncentrácia pri ktorej sú pozorované nepriaznivé účinky oproti kontrole
LOAEL	najnižšia dávka pri ktorej sú pozorované nepriaznivé účinky oproti kontrole
MDA	malondialdehyd
MP	mikroplasty
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NOAEC	najvyššia koncentrácia bez pozorovaného nepriaznivého účinku oproti kontrole
NOAEL	najnižšia dávka bez pozorovaného nepriaznivého účinku oproti kontrole
NP	nanoplasty
OECD	Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj
PAH	polykondenzované aromatické uhľovodíky
PBAT	poly(butylénadipát-ko-tereftalát)
PBDE	polybromované difenylétery

PBS	fyziologický fosfátový pufer
PCL	polykaprolakton
PE	polyetylén
PET	polyetyléntereftalát
PHA	polyhydroxyalkonoáty
PHB	poly(3-hydroxybutyrát)
PLA	kyselina polymliečna
PS	polystyrén
PS-MP	polystyrénové mikroplasty
PTT	Polytrimethyltereftalát
PVA	polyvinylalkohol
PVC	polyvinylchlorid
ROS	reaktívne formy kyslíka
SOD	superoxid dismutáza
TBA	kyselina thiobarbiturová
TBARS	látky reagujúce s TBA
TCA	kyselina trichloroctová
UV-Vis	ultrafialová-viditeľná spektroskopia
WHC	maximálna vodná kapacita pôdy

## **8 ZOZNAM PRÍLOH**

- Príloha 1 Akútne testy
- Príloha 2 Chronické testy
- Príloha 3 Stanovené koncentrácie proteínov
- Príloha 4 Stanovené aktivity CAT v každej
- Príloha 5 Stanovené koncentrácie TBARS

## 9 PRÍLOHY

### Príloha 1: Akútne testy

Tab. 16: Test s referenčnou látkou – 1. opakovanie

c (mg/kg)	č.	nasadenie		7.d	14.d		
		m <sub>počiatočná</sub> (g)	pH	M	m <sub>konečná</sub> (g)	M	pH
0	0_1	3,74	5,66	0	3,24	0	5,65
	0_2	3,98		0	3,36	0	
	0_3	3,87		0	3,50	0	
	0_4	4,13		0	3,73	0	
200	1_1	4,16	5,51	0	3,61	0	5,49
	1_2	3,93		0	3,53	0	
	1_3	3,84		0	3,25	0	
	1_4	3,86		0	3,30	0	
400	2_1	3,90	5,40	0	3,28	0	5,33
	2_2	3,99		0	3,36	0	
	2_3	3,64		0	2,88	0	
	2_4	3,95		0	3,28	0	
600	3_1	3,74	5,47	0	3,07	0	5,34
	3_2	3,55		0	2,86	1	
	3_3	3,86		0	3,10	0	
	3_4	3,93		0	3,08	0	
1200	4_1	3,78	5,62	0	2,92	0	5,56
	4_2	3,73		0	2,83	1	
	4_3	3,92		0	3,21	0	
	4_4	4,26		0	3,29	0	
1800	5_1	3,98	5,50	0	2,88	0	5,45
	5_2	3,91		0	2,13	2	
	5_3	4,12		0	3,01	0	
	5_4	3,92		0	2,91	1	

Tab. 17: Test s referenčnou látkou – 2. opakovanie

c		nasadenie		7.d	14.d		
(mg/kg)	č.	m <sub>pociatocna</sub> (g)	pH	M	m <sub>konecna</sub> (g)	M	pH
0	0_1	2,95		0	3,72	0	
	0_2	2,92		0	4,12	0	
	0_3	3,75	5,61	1	4,61	0	5,12
	0_4	3,70		0	4,58	0	
200	1_1	4,01		1	4,84	0	
	1_2	3,64		1	4,18	0	
	1_3	3,83	5,56	0	4,90	0	5,05
	1_4	3,63		1	3,55	2	
400	2_1	3,93		0	5,33	0	
	2_2	3,60		0	4,04	1	
	2_3	3,62	5,62	0	4,42	0	5,09
	2_4	3,50		0	3,96	1	
600	3_1	3,82		0	4,88	0	
	3_2	3,54		0	3,81	0	
	3_3	3,97	5,57	0	3,85	0	5,03
	3_4	3,50		0	3,89	0	
1200	4_1	3,76		1	0,68	7	
	4_2	3,65		0	2,60	3+1	
	4_3	3,71	5,54	1	2,35	3	4,98
	4_4	3,58		0	2,57	3+1	
1800	5_1	3,69		2	1,22	3+2	
	5_2	3,33		1	1,34	4+1	
	5_3	3,64	5,48	0	1,28	4+3	4,93
	5_4	3,55		1	1,39	4	

Tab. 18: Akútny test s PHB  $\leq 63 \mu\text{m}$  – 1. opakovanie

c		nasadenie		7.d	14.d		
(mg/kg)	č.	m <sub>pociatocna</sub> (g)	pH	M	m <sub>konecna</sub> (g)	M	pH
0	0_1	3,70	6,42	0	3,57	0	6,40
	0_2	3,77		0	3,73	0	
	0_3	3,76		0	3,63	0	
	0_4	3,94		0	3,72	0	
62,5	1_1	3,66	6,35	0	3,68	0	6,32
	1_2	3,67		0	3,32	0	
	1_3	3,47		0	3,66	0	
	1_4	3,62		0	3,15	0	
125	2_1	3,38	6,33	0	3,65	0	6,31
	2_2	3,18		0	2,69	0	
	2_3	3,19		0	3,41	0	
	2_4	3,21		0	3,28	0	
250	3_1	3,12	6,44	0	3,35	0	6,37
	3_2	3,02		0	3,00	0	
	3_3	3,04		0	3,34	0	
	3_4	3,06		0	2,75	1	
500	4_1	3,09	6,21	0	3,21	0	6,19
	4_2	3,15		0	3,24	0	
	4_3	3,09		0	3,26	0	
	4_4	3,04		0	3,38	0	
1000	5_1	3,10	6,27	0	2,54	1	6,18
	5_2	3,17		0	2,91	0	
	5_3	3,15		0	1,82	2	
	5_4	3,08		0	2,84	0	



Tab. 19: Akútny test s PHB  $\leq 63 \mu\text{m}$  – 2. opakovanie

c		nasadenie		7.d	14.d		
(mg/kg)	č.	m <sub>pociatocna</sub> (g)	pH	M	m <sub>konecna</sub> (g)	M	pH
0	0_1	3,95	6,52	0	3,29	0	6,39
	0_2	4,06		0	3,67	0	
	0_3	4,10		0	3,74	0	
	0_4	4,23		0	3,45	1	
62,5	1_1	4,10	6,43	1	3,76	1	6,17
	1_2	4,04		0	3,35	0	
	1_3	3,97		0	3,66	1	
	1_4	3,92		0	2,93	1	
125	2_1	4,01	6,48	1	2,98	1	6,26
	2_2	3,85		0	3,70	0	
	2_3	4,18		0	3,59	0	
	2_4	4,05		0	2,80	1	
250	3_1	3,93	6,35	0	3,41	0	6,09
	3_2	3,95		0	3,18	2	
	3_3	3,73		1	3,57	0	
	3_4	3,47		0	3,40	0	
500	4_1	3,68	6,44	1	3,84	0	6,15
	4_2	3,65		0	3,01	2	
	4_3	3,44		0	3,32	1	
	4_4	3,61		1	3,39	1	
1000	5_1	3,34	6,34	0	3,21	1	5,99
	5_2	3,43		0	3,24	1	
	5_3	3,46		0	3,38	1	
	5_4	3,38		1	3,51	0	

Tab. 20: Akútny test s PHB  $\leq 63 \mu\text{m}$  – 3. opakovanie

c		nasadenie		7.d	14.d		
(mg/kg)	č.	m <sub>pociatocna</sub> (g)	pH	M	m <sub>konecna</sub> (g)	M	pH
0	0_1	4,33	6,27	0	4,05	0	5,96
	0_2	4,22		0	4,07	0	
	0_3	4,32		0	4,25	0	
	0_4	4,26		0	4,14	0	
62,5	1_1	4,04	6,20	0	4,11	0	5,92
	1_2	4,03		0	3,80	0	
	1_3	4,13		0	4,25	0	
	1_4	4,00		0	4,08	0	
125	2_1	3,98	6,28	0	3,81	0	5,95
	2_2	3,67		0	3,58	0	
	2_3	3,76		0	3,11	1	
	2_4	3,90		0	3,32	0	
250	3_1	3,59	6,26	0	3,20	0	5,81
	3_2	3,65		0	2,99	0	
	3_3	3,57		0	3,35	0	
	3_4	3,64		0	3,19	0	
500	4_1	3,60	6,14	0	3,62	0	5,88
	4_2	3,59		0	3,00	0	
	4_3	3,62		0	3,19	1	
	4_4	3,63		0	3,26	1	
1000	5_1	3,69	6,30	0	3,04	1	5,76
	5_2	3,62		0	3,21	1	
	5_3	3,63		0	3,61	0	
	5_4	3,56		0	3,39	0	

Tab. 21: Akútny test s PHB 63–125 µm – 1. opakovanie

c		nasadenie		7.d	14.d		
(mg/kg)	č.	m <sub>pociatocna</sub> (g)	pH	M	m <sub>konecna</sub> (g)	M	pH
0	0_1	4,81	6,15	0	4,36	0	5,86
	0_2	4,90		0	4,62	0	
	0_3	4,83		0	4,54	0	
	0_4	4,92		0	4,47	0	
62,5	1_1	4,41	6,05	0	4,25	0	5,88
	1_2	4,38		0	4,34	0	
	1_3	4,77		0	4,53	0	
	1_4	4,52		0	4,03	1	
125	2_1	4,30	5,64	0	4,03	0	5,94
	2_2	4,22		0	4,17	0	
	2_3	4,23		0	4,12	0	
	2_4	4,37		0	3,95	0	
250	3_1	4,12	6,45	0	3,96	0	6,10
	3_2	4,13		0	4,40	0	
	3_3	4,24		0	3,81	0	
	3_4	3,97		0	3,91	0	
500	4_1	3,42	6,39	0	3,68	0	6,07
	4_2	3,73		0	3,90	0	
	4_3	3,88		0	4,01	0	
	4_4	3,99		0	4,19	0	
1000	5_1	3,40	5,91	0	3,73	0	5,93
	5_2	3,35		0	3,57	0	
	5_3	3,50		0	3,41	1	
	5_4	3,42		0	3,76	0	

Tab. 21: Akútny test test s PHB 63–125  $\mu\text{m}$  – 2. opakovanie

c		nasadenie		7.d	14.d		
(mg/kg)	č.	m <sub>pociatocna</sub> (g)	pH	M	m <sub>konecna</sub> (g)	M	pH
0	0_1	3,86	6,48	0	3,83	0	6,26
	0_2	3,88		0	4,02	0	
	0_3	3,87		0	3,92	0	
	0_4	3,55		0	3,65	0	
62,5	1_1	3,54	6,30	0	3,39	0	5,96
	1_2	3,42		0	2,70	1	
	1_3	3,38		0	3,27	0	
	1_4	3,18		0	3,22	0	
125	2_1	3,21	6,29	0	3,25	0	5,94
	2_2	3,33		0	2,79	1	
	2_3	3,30		0	3,26	0	
	2_4	3,11		0	2,85	0	
250	3_1	3,19	6,15	0	2,54	1	5,87
	3_2	3,31		0	2,78	0	
	3_3	3,27		0	2,66	1	
	3_4	3,10		0	3,22	0	
500	4_1	3,07	6,15	0	2,84	0	5,88
	4_2	3,16		0	2,81	1	
	4_3	3,42		0	3,05	0	
	4_4	3,39		0	3,11	0	
1000	5_1	3,17	6,11	0	2,83	0	5,77
	5_2	3,29		0	3,23	0	
	5_3	3,13		0	2,21	1	
	5_4	3,12		0	2,50	1	

Tab. 22: Akútny test test s PHB 63–125  $\mu\text{m}$  – 3. opakovanie

c		nasadenie		7.d	14.d		
(mg/kg)	č.	m <sub>počiatočná</sub> (g)	pH	M	m <sub>konečná</sub> (g)	M	pH
0	0_1	5,61	6,47	0	5,59	0	6,31
	0_2	5,75		0	5,68	0	
	0_3	5,74		0	5,67	0	
	0_4	5,65		0	5,33	0	
62,5	1_1	5,68	6,20	0	5,62	0	5,98
	1_2	5,73		0	5,58	0	
	1_3	5,57		0	5,18	0	
	1_4	5,38		0	5,41	0	
125	2_1	5,52	6,39	0	5,19	0	6,18
	2_2	5,69		0	5,26	0	
	2_3	5,77		0	5,68	0	
	2_4	5,65		0	5,48	0	
250	3_1	5,43	6,17	0	4,87	1	6,04
	3_2	5,56		0	5,28	0	
	3_3	5,42		0	5,05	0	
	3_4	5,55		0	5,31	0	
500	4_1	5,45	6,05	0	4,67	1	6,01
	4_2	5,40		0	4,31	1	
	4_3	5,44		0	5,30	0	
	4_4	5,42		0	5,12	0	
1000	5_1	5,12	6,22	0	4,27	1	5,87
	5_2	5,18		0	4,94	0	
	5_3	5,05		0	4,61	0	
	5_4	5,14		0	4,20	1	

## Príloha 2: Chronické testy

Tab. 23: Chronický test s PHB  $\leq 63 \mu\text{m}$  – 1. opakovanie

c (mg/kg)	č.	nasadenie		14.d	28.d			56.d		
		$m_{\text{počiatočná}}$ (g)	pH	M	$m_{\text{konečná}}$ (g)	M	pH	J	K	pH
0	0_1	4,23	6,27	0	4,72	0	6,04	39	15	5,85
	0_2	4,24		0	4,68	0		54	24	
	0_3	4,12		0	4,95	0		32	11	
	0_4	4,35		0	5,32	0		36	12	
62,5	1_1	3,93	5,68	1	2,95	1	5,63	23	8	5,59
	1_2	4,02		0	5,44	0		63	23	
	1_3	3,92		0	3,21	1		31	12	
	1_4	4,08		0	3,99	0		26	11	
125	2_1	3,71	6,07	1	3,96	0	5,88	17	8	5,70
	2_2	3,80		0	3,73	0		25	10	
	2_3	3,58		0	3,42	1+1		12	5	
	2_4	3,62		0	4,12	0+1		17	7	
250	3_1	3,57	5,98	0	3,93	1	5,82	17	7	5,74
	3_2	3,42		0	3,47	0+1		8	4	
	3_3	3,31		1	3,41	1		8	3	
	3_4	3,72		0	4,43	0		16	5	
500	4_1	3,48	5,61	1	3,01	0+1	5,39	12	4	5,29
	4_2	3,62		0	4,23	1		6	3	
	4_3	3,36		0	4,37	0		19	6	
	4_4	3,30		1	2,80	2		7	3	
1000	5_1	3,15	5,57	0	3,48	1	5,54	9	2	5,53
	5_2	3,22		0	3,32	0+2		2	1	
	5_3	3,14		0	3,70	0+2		13	4	
	5_4	3,12		1	3,05	1		0	0	

Tab. 24: Chronický test s PHB  $\leq 63 \mu\text{m}$  – 2. opakovanie

c		nasadenie		14.d	28.d			56.d		
(mg/kg)	č.	m <sub>počiatočná</sub> (g)	pH	M	m <sub>konečná</sub> (g)	M	pH	J	K	pH
0	0_1	5,36	6,44	0	5,18	0	6,28	41	26	6,04
	0_2	5,42		0	5,04	0		33	15	
	0_3	5,37		0	5,53	0		39	16	
	0_4	5,40		0	5,90	0		45	26	
62,5	1_1	4,80	6,29	0	4,49	0	6,06	24	12	6,03
	1_2	4,72		2	3,12	0		28	13	
	1_3	4,71		0	4,19	0		31	17	
	1_4	5,03		0	4,28	0		18	7	
125	2_1	4,47	6,35	0	3,51	0	6,24	20	8	5,92
	2_2	4,60		2	3,45	0		17	9	
	2_3	4,46		0	4,43	0		15	7	
	2_4	5,12		0	4,84	0		19	8	
250	3_1	4,49	6,58	0	3,91	0	6,31	10	4	6,15
	3_2	4,85		1	3,89	0		13	4	
	3_3	4,67		1	3,77	0		19	5	
	3_4	5,20		0	3,31	1+1		22	9	
500	4_1	4,88	6,64	0	4,54	0	6,35	14	4	6,17
	4_2	5,11		1	4,35	0		30	11	
	4_3	4,90		1	4,30	0		12	4	
	4_4	4,92		0	4,53	0		10	2	
1000	5_1	4,88	6,01	0	4,44	0	5,95	12	4	6,14
	5_2	4,75		0	4,70	0		5	2	
	5_3	4,55		0	4,40	0		10	3	
	5_4	4,49		2	3,19	0		9	2	

Tab. 25: Chronický test s PHB 63–125 µm – 1. opakovanie

c		nasadenie		14.d	28.d			56.d		
(mg/kg)	č.	m <sub>počiatočná</sub> (g)	pH	M	m <sub>konečná</sub> (g)	M	pH	J	K	pH
0	0_1	4,75	6,47	0	4,37	0	6,31	35	17	6,24
	0_2	4,92		0	3,99	0		49	19	
	0_3	5,08		0	4,38	0		64	23	
	0_4	5,01		0	4,65	0		72	25	
62,5	1_1	4,54	6,43	0	4,31	0	6,34	39	18	6,28
	1_2	4,91		0	4,26	0		51	24	
	1_3	4,53		0	4,67	0		48	20	
	1_4	4,45		0	4,50	0		33	15	
125	2_1	4,39	6,51	0	4,38	0	6,33	38	17	6,20
	2_2	4,47		0	4,43	0		37	16	
	2_3	4,45		0	4,39	0		44	13	
	2_4	4,08		0	3,88	0		49	20	
250	3_1	3,87	6,34	0	3,94	0	6,29	33	14	6,18
	3_2	4,02		0	3,85	0		35	15	
	3_3	4,09		0	3,70	0		42	17	
	3_4	4,39		0	3,41	1		50	22	
500	4_1	4,22	6,20	0	4,28	0	6,24	34	15	6,17
	4_2	4,01		0	2,68	1+1		19	9	
	4_3	4,46		0	3,29	0+1		32	14	
	4_4	4,16		0	4,07	0		29	11	
1000	5_1	4,39	6,15	0	3,72	0+1	6,24	24	14	6,29
	5_2	3,92		0	4,01	0		25	10	
	5_3	3,78		0	4,21	0		18	7	
	5_4	3,76		0	3,87	0		38	15	



Tab. 26: Chronický test s PHB 63–125 µm – 2. opakovanie

c		nasadenie		14.d	28.d			56.d		
(mg/kg)	č.	m <sub>počiatočná</sub> (g)	pH	M	m <sub>konečná</sub> (g)	M	pH	J	K	pH
0	0_1	4,24	5,68	0	6,41	0	5,65	64	25	5,55
	0_2	4,42		0	7,58	0		72	21	
	0_3	5,02		0	7,73	0		46	12	
	0_4	4,68		0	8,18	0		62	20	
62,5	1_1	4,29	5,71	0	6,23	1	5,20	27	20	5,18
	1_2	4,48		0	7,11	0		38	19	
	1_3	4,30		0	8,44	0		46	24	
	1_4	4,61		0	6,19	0		19	7	
125	2_1	4,88	5,49	0	7,32	2	5,34	25	18	5,30
	2_2	4,43		0	6,07	1		28	10	
	2_3	4,43		0	7,64	1		21	13	
	2_4	3,96		0	6,95	0		33	16	
250	3_1	4,81	5,47	0	7,71	0	5,37	27	21	5,34
	3_2	4,60		0	6,21	3		13	16	
	3_3	4,31		0	8,64	0		33	23	
	3_4	3,98		0	8,48	0		24	12	
500	4_1	4,11	5,66	0	8,23	0	5,58	19	14	5,46
	4_2	3,84		0	8,48	0		16	9	
	4_3	4,35		0	8,01	0		17	15	
	4_4	4,06		0	7,11	1		29	17	
1000	5_1	4,00	5,53	0	7,52	0	5,45	20	10	5,41
	5_2	4,38		0	8,87	0		15	5	
	5_3	4,59		0	7,29	2		25	9	
	5_4	4,06		0	7,02	1		13	14	

### Príloha 3: Stanovené koncentrácie proteínov

Tab. 27: Koncentrácie proteínov stanovené v testoch s kyselinou boritou

	Kyselina boritá – 1.test				Kyselina boritá – 2.test			
	m <sub>tkanivo</sub>	V <sub>pufor</sub>	A	C <sub>protein</sub>	m <sub>tkanivo</sub>	V <sub>pufor</sub>	A	C <sub>protein</sub>
	(g)	(l)	(-)	(mg/g tkaniva)	(g)	(l)	(-)	(mg/g tkaniva)
0_1	1,329	0,01329	0,6529	31,48	1,500	0,01500	0,8030	38,98
0_2	1,406	0,01406	0,6255	30,11	1,575	0,01575	0,6448	31,08
0_3	1,475	0,01475	0,6569	31,68	1,560	0,01560	0,5357	25,62
0_4	1,300	0,01300	0,6517	31,42	1,625	0,01625	0,5316	25,42
1_1	1,490	0,01490	0,6822	32,95	1,620	0,01620	0,4620	21,94
1_2	1,491	0,01491	0,6921	33,44	1,720	0,01720	0,6542	31,54
1_3	1,360	0,01360	0,6168	29,68	1,550	0,01550	0,5455	26,11
1_4	1,386	0,01386	0,6979	33,73	1,790	0,01790	0,5459	26,13
2_1	1,420	0,01420	0,7262	35,15	1,520	0,01520	0,5797	27,82
2_2	1,382	0,01382	0,7550	36,59	1,288	0,01288	0,6144	29,55
2_3	1,292	0,01292	0,7395	35,81	1,238	0,01238	0,4978	23,72
2_4	1,570	0,01570	0,7408	35,87	1,590	0,01590	0,7191	34,79
3_1	1,557	0,01557	0,7428	35,97	1,300	0,01300	0,5773	27,70
3_2	1,632	0,01632	0,7901	38,34	1,390	0,01390	0,7515	36,41
3_3	1,358	0,01358	0,8919	43,43	1,550	0,01550	0,8725	42,46
3_4	1,500	0,01500	0,8185	39,76	1,248	0,01248	0,7112	34,40
4_1	1,388	0,01388	0,7662	37,15	1,261	0,01261	0,7246	35,07
4_2	1,311	0,01311	0,6587	31,77	1,380	0,01380	0,6827	32,97
4_3	1,494	0,01494	0,6663	32,15	1,210	0,01210	0,7099	34,33
4_4	1,488	0,01488	0,7375	35,71	1,330	0,01330	0,8897	43,32
5_1	1,261	0,01261	0,6564	31,66	0,920	0,00920	0,7654	37,10
5_2	1,413	0,01413	0,8007	38,87	1,080	0,01080	0,8074	39,20
5_3	1,284	0,01284	0,8232	39,99	0,900	0,00900	0,6858	33,13
5_4	1,322	0,01322	0,6979	33,73	1,230	0,01230	0,6461	31,14

Tab. 28: Koncentrácie proteínov stanovené v akútnych testoch s PHB

	Akútny test s PHB $\leq 63 \mu\text{m}$				Akútny test s PHB 63–125 $\mu\text{m}$			
	$m_{\text{tkanivo}}$	$V_{\text{pufor}}$	A	$C_{\text{protein}}$	$m_{\text{tkanivo}}$	$V_{\text{pufor}}$	A	$C_{\text{protein}}$
	(g)	(l)	(-)	(mg/g tkaniva)	(g)	(l)	(-)	(mg/g tkaniva)
0_1	1,230	0,01230	0,8055	39,11	1,314	0,01314	0,9977	48,72
0_2	1,383	0,01383	0,7747	37,57	1,353	0,01353	0,9419	45,93
0_3	1,400	0,01400	0,7066	34,17	1,260	0,01260	0,9271	45,19
0_4	1,287	0,01287	0,7303	35,35	1,285	0,01285	0,9186	44,77
1_1	1,253	0,01253	0,6591	31,79	1,295	0,01295	0,8616	41,91
1_2	1,367	0,01367	0,5781	27,74	1,323	0,01323	0,9316	45,42
1_3	1,325	0,01325	0,6329	30,48	1,300	0,01300	0,8828	42,98
1_4	1,337	0,01337	0,6698	32,33	1,258	0,01258	0,9762	47,64
2_1	1,317	0,01317	0,6732	32,49	1,380	0,01380	0,7827	37,97
2_2	1,310	0,01310	0,6810	32,89	1,227	0,01227	0,7875	38,21
2_3	1,319	0,01319	0,6527	31,47	1,400	0,01400	0,8977	43,72
2_4	1,283	0,01283	0,6786	32,76	1,324	0,01324	0,8111	39,39
3_1	1,220	0,01220	0,6949	33,58	1,204	0,01204	0,9475	46,21
3_2	1,292	0,01292	0,6317	30,42	1,270	0,01270	0,7726	37,46
3_3	1,283	0,01283	0,5972	28,70	1,326	0,01326	0,8898	43,33
3_4	1,225	0,01225	0,6650	32,09	1,235	0,01235	0,9303	45,35
4_1	1,368	0,01368	0,5945	28,56	1,234	0,01234	0,7741	37,54
4_2	1,277	0,01277	0,6665	32,16	1,257	0,01257	0,6735	32,51
4_3	1,352	0,01352	0,6891	33,29	1,313	0,01313	0,6938	33,53
4_4	1,380	0,01380	0,6928	33,48	1,330	0,01330	0,7849	38,08
5_1	1,246	0,01246	0,6472	31,19	1,270	0,01270	0,8725	42,46
5_2	1,223	0,01223	0,6454	31,11	1,300	0,01300	0,8505	41,36
5_3	1,240	0,01240	0,5950	28,58	1,300	0,01300	0,7395	35,81
5_4	1,250	0,01250	0,6149	29,58	1,270	0,01270	0,8298	32,62

Tab. 29: Koncentrácie proteínov stanovené v chronických testoch s PHB

	Chronický test s PHB $\leq 63 \mu\text{m}$				Chronický test s PHB 63–125 $\mu\text{m}$			
	$m_{\text{tkanivo}}$	$V_{\text{pufor}}$	A	$C_{\text{protein}}$	$m_{\text{tkanivo}}$	$V_{\text{pufor}}$	A	$C_{\text{protein}}$
	(g)	(l)	(-)	(mg/g tkaniva)	(g)	(l)	(-)	(mg/g tkaniva)
0_1	1,230	0,01230	0,6901	33,34	1,330	0,01330	0,9158	44,62
0_2	1,630	0,01630	0,8122	39,45	1,284	0,01284	0,7531	36,49
0_3	1,660	0,01660	0,7783	37,75	1,233	0,01233	0,8515	41,41
0_4	1,330	0,01330	0,7519	36,43	1,310	0,01310	0,7569	36,68
1_1	1,420	0,01420	0,8048	39,08	1,320	0,01320	0,8518	41,42
1_2	1,400	0,01400	0,6869	33,18	1,200	0,01200	0,7385	35,76
1_3	1,490	0,01490	0,7421	35,94	1,320	0,01320	0,8615	41,91
1_4	1,390	0,01390	0,7943	38,55	1,300	0,01300	0,8998	43,83
2_1	1,220	0,01220	0,7718	37,43	1,200	0,01200	0,8334	40,50
2_2	1,344	0,01344	0,8991	43,79	1,400	0,01400	0,8224	39,95
2_3	1,243	0,01243	0,8448	41,08	1,200	0,01200	0,9233	45,00
2_4	1,347	0,01347	0,9481	46,24	1,300	0,01300	0,8739	42,53
3_1	1,190	0,01190	0,9075	44,21	1,373	0,01373	0,9548	46,58
3_2	1,238	0,01238	0,8079	39,23	1,276	0,01276	0,9915	48,41
3_3	1,390	0,01390	0,9675	47,21	1,370	0,01370	0,8650	42,09
3_4	1,383	0,01383	0,8728	42,48	1,350	0,01350	0,7433	36,00
4_1	1,380	0,01380	0,8861	43,14	1,220	0,01220	0,8914	43,41
4_2	1,250	0,01250	0,9146	44,57	1,223	0,01223	0,8969	43,68
4_3	1,580	0,01580	0,7908	38,38	1,380	0,01380	0,9798	47,83
4_4	1,360	0,01360	0,8764	42,65	1,315	0,01315	0,8994	43,81
5_1	1,218	0,01218	0,9949	48,58	1,205	0,01205	0,9125	44,46
5_2	1,320	0,01320	0,8109	39,38	1,240	0,01240	0,8813	42,90
5_3	1,276	0,01276	0,9164	44,65	1,224	0,01224	0,8471	41,19
5_4	1,520	0,01520	0,7930	38,48	1,240	0,01240	0,9605	46,86

## Príloha 4: Stanovené aktivity CAT

Tab. 30: Aktivity CAT v každej vzorke analyzovaných testov

	Kyselina boritá		c (mg/kg)	Akútny test		Chronický test	
	c (mg/kg)	aktivita CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$ )		PHB $\leq$ 63 $\mu\text{m}$	PHB 63–125 $\mu\text{m}$	PHB $\leq$ 63 $\mu\text{m}$	PHB 63–125 $\mu\text{m}$
				aktivita CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$ )			
0_1	0	6,836	0	4,867	5,210	6,852	5,972
0_2		6,409		5,742	6,078	6,756	5,694
0_3		6,866		6,686	5,617	7,396	6,436
0_4		6,125		5,385	6,520	8,361	5,958
0_∅		6,559		5,670	5,856	7,341	6,015
1_1	200	7,520	62,5	9,580	6,358	6,170	6,433
1_2		6,934		7,979	5,868	11,473	8,517
1_3		7,969		6,328	5,610	8,121	6,965
1_4		7,285		6,674	5,327	6,584	7,239
1_∅		7,427		7,640	5,791	8,087	7,288
2_1	400	7,754	125	7,420	6,684	8,477	7,833
2_2		9,447		6,560	5,646	8,983	6,670
2_3		7,373		6,452	5,805	7,106	5,922
2_4		6,930		5,423	5,477	8,508	7,460
2_∅		7,876		6,464	5,903	8,268	6,971
3_1	600	11,287	250	5,291	4,119	9,186	6,539
3_2		5,925		7,091	5,420	9,381	6,291
3_3		6,875		8,402	5,272	8,064	6,634
3_4		9,224		6,723	3,918	10,756	8,812
3_∅		8,328		6,877	4,682	9,347	7,069
4_1	1200	8,324	500	6,776	5,409	8,237	7,017
4_2		8,774		5,130	6,246	7,973	6,682
4_3		8,393		6,575	7,192	8,598	7,429
4_4		7,910		5,686	6,998	7,736	5,794
4_∅		8,350		6,042	6,461	8,136	6,731
5_1	1800	10,945	1000	6,102	4,782	6,270	6,709
5_2		6,798		8,568	5,216	8,378	6,804
5_3		7,662		7,991	6,733	7,673	7,162
5_4		8,150		8,581	6,225	6,925	7,229
5_∅		8,389		7,810	5,739	7,311	6,976

## Príloha 5: Stanovené koncentrácie TBARS

Tab. 31: Koncentrácie TBARS v každej vzorke analyzovaných testov

	Kyselina boritá		c (mg/kg)	Akútny test		Chronický test	
	c (mg/kg)	c TBARS ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteínu)		PHB $\leq$ 63 $\mu\text{m}$	PHB 63–125 $\mu\text{m}$	PHB $\leq$ 63 $\mu\text{m}$	PHB 63–125 $\mu\text{m}$
				c TBARS ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteínu)			
0_1	0	0,941	0	0,854	1,156	1,215	1,280
0_2		1,026		0,686	0,954	0,966	1,324
0_3		1,163		0,866	1,868	1,034	1,003
0_4		1,261		0,866	0,980	1,771	1,254
0_∅		1,098		0,818	1,239	1,247	1,215
1_1	200	1,515	62,5	1,012	1,257	1,263	1,003
1_2		0,933		1,544	0,988	0,975	1,402
1_3		0,925		1,181	1,114	1,017	1,210
1_4		1,136		1,106	1,179	1,127	1,213
1_∅		1,127		1,211	1,134	1,095	1,207
2_1	400	1,228	125	1,078	1,154	0,959	1,559
2_2		1,073		1,212	1,095	0,680	1,669
2_3		1,207		1,056	1,057	0,941	1,221
2_4		1,142		1,127	1,044	0,933	1,146
2_∅		1,163		1,118	1,088	0,878	1,399
3_1	600	1,315	250	1,161	0,973	0,920	1,394
3_2		1,140		1,054	1,208	0,891	0,966
3_3		1,365		1,487	1,091	1,276	1,066
3_4		1,097		1,300	1,133	1,143	1,029
3_∅		1,229		1,251	1,101	1,058	1,114
4_1	1200	1,253	500	1,506	1,246	1,040	1,075
4_2		1,312		1,104	1,621	0,749	1,263
4_3		1,494		1,792	1,214	0,723	1,121
4_4		1,475		0,974	1,283	0,734	1,199
4_∅		1,383		1,344	1,341	0,811	1,164
5_1	1800	1,814	1000	1,332	1,175	0,560	1,229
5_2		1,609		1,190	1,112	0,985	1,168
5_3		1,197		1,017	1,304	0,647	1,300
5_4		1,143		1,160	1,104	0,842	1,383
5_∅		1,441		1,175	1,174	0,758	1,270