



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

HODNOCENÍ VLIVŮ BIODEGRADABILNÍCH MIKROPLASTŮ NA BIOTU SLADKOVODNÍHO EKOSYSTÉMU PROSTŘEDNICTVÍM TESTŮ EKOTOXICITY

EVALUATION OF THE EFFECTS OF BIODEGRADABLE MICROPLASTICS ON BIOTA OF FRESHWATER
ECOSYSTEM VIA ECOTOXICITY TESTS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Petra Procházková

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

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

BRNO 2024

Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí Akademický rok: 2023/24

Studentka: **Ing. Petra Procházková**

Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí

Studijní obor: bez specializace

Vedoucí práce: **doc. MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**

Název dizertační práce:

Hodnocení vlivů biodegradabilních mikroplastů na biotu sladkovodního ekosystému prostřednictvím testů ekotoxicity

Zadání dizertační práce:

1. Zpracování literární rešerše na problematiku biodegradabilních plastů v akvatickém prostředí.
2. Hodnocení vlivu vybraných biodegradabilních plastů (P3HB) na zástupce producentů: test na Lemna minor a Desmodesmus subspicatus.
3. Výběr vhodných endpointů pro testy s producenty na organismální a suborganismální úrovni.
4. Využití D. magna pro hodnocení vlivu biodegradabilních plastů na zástupce konzumentů.
5. Vývoj metody pro analýzu mikroplastů v zooplanktonu.
6. Analýzy a diskuze dosažených výsledků.

Termín odevzdání dizertační práce: 31.1.2024:

Ing. Petra Procházková
studentka

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

prof. Ing. Jozef Krajčovič, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.9.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Mikroplasty jakožto všudypřítomné kontaminanty sladkovodních ekosystémů vyvolávají oprávněné obavy týkající se jejich vlivu na životní prostředí. Dochází proto k všeobecné snaze nahradit konvenční plasty biologicky odbouratelnými alternativami, které by měly být v prostředí snadno rozložitelné. Nicméně, proces biodegradace takových materiálů vyžaduje specifické podmínky, jako jsou teplota, vlhkost, pH a přítomnost mikroorganismů, které nejsou vždy dostatečně splněny. V důsledku toho dochází k jejich fragmentaci a tvorbě biodegradabilních mikroplastů. Ty mohou, stejně jako konvenční mikroplasty, ovlivňovat životní prostředí. Cílem této práce proto bylo posoudit vliv mikroplastů biodegradabilního poly(3-hydroxybutyrátu) na vybrané zástupce sladkovodních organismů, a to konkrétně na řasu *Desmodesmus subspicatus*, rostlinu *Lemna minor* a korýše *Daphnia magna*, a dále pak najít vhodnou analytickou metodu umožňující přímou detekci mikroplastů v těle organismu *D. magna*. I přes to, že pozorované účinky nebyly vždy významné, upozornily na určité sekundární problémy, které může přítomnost biodegradabilních mikroplastů v životním prostředí vyvolat. Ty mohou být způsobené právě biologickou rozložitelností spojenou s tvorbou biofilmu na povrchu biodegradabilních mikroplastů, což, jak se ukázalo, následně vede k vyčerpání živin v okolním prostředí. Výsledky této práce tedy naznačují, že k využívání biodegradabilních plastů jakožto náhrady konvenčních materiálů je nutné přistupovat kriticky před jejich masivním využitím jako náhrady za konvenční plasty.

Klíčová slova

Mikroplasty, biodegradabilní mikroplasty, poly(3-hydroxybutyrát), sladkovodní ekosystém, biofilm, *D. subspicatus*, *L. minor*, *D. magna*.

Abstract

Microplastics, which are ubiquitous contaminants of freshwater ecosystems, have raised concerns regarding their potential impact on the environment. For this reason, there is an effort to replace conventional plastics with biodegradable alternatives that can easily degrade in the environment. However, the process of biodegradation of these materials requires specific conditions, such as temperature, humidity, pH, and the presence of microorganisms, which are not always met adequately. Consequently, they may fragment and form biodegradable microplastics that can affect the environment similarly to conventional microplastics. Therefore, the aim of this study was to assess the impact of microplastics of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) microplastics on freshwater organisms, specifically the alga *Desmodesmus subspicatus*, the plant *Lemna minor* and the crustacean *Daphnia magna*. Additionally, we aimed to develop a suitable analytical method for the direct detection of microplastics in the body of *D. magna*. Although the observed effects were not always significant, they highlighted certain secondary problems that may arise due to the presence of biodegradable microplastics in the environment. These issues could be related to biodegradability and the formation of biofilm on the surface of biodegradable microplastics, leading to subsequent nutrient depletion in the surrounding environment. Therefore, the use of biodegradable plastics as a substitute for conventional materials must be approached critically.

Key words

Microplastics, biodegradable microplastics, poly(3-hydroxybutyrate), freshwater ecosystem, biofilm, *D. subspicatus*, *L. minor*, *D. magna*.

PROCHÁZKOVÁ, Petra. *Hodnocení vlivů biodegradabilních mikroplastů na biotu sladkovodního ekosystému prostřednictvím testů ekotoxicity*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/159788>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Helena Zlámalová Gargošová.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Disertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího práce a děkana FCH VUT.

.....

Ing. Petra Procházková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mojí vedoucí doc. MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D. za cenné rady, přátelský přístup, trpělivost a vedení při psaní této disertační práce. Mé velké poděkování za přínosné poznámky a inspiraci patří i prof. Ing. Jiřímu Kučeríkovi, Ph.D., dále pak doc. Ing. Gabriele Kalčíkové, Ph.D. a Ing. Elišce Maršákové, Ph.D. Taktéž nesmím zapomenout poděkovat zaměstnancům a kolegům z Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí, a to především Ing. Elišce Kameníkové, Bc. Sabině Mácové a doc. Mgr. Renatě Komendové, Ph.D., za veškeré rady a pomoc a psychickou podporu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, především pak mému manželovi a dětem za podporu a vytvoření podmínek potřebných k dokončení této práce, stejně tak jako svým blízkým přátelům.

OBSAH

Úvod	10
Současný stav řešené problematiky	11
1. Definice mikroplastů a jejich typů	11
2. Mikroplasty v akvatickém prostředí	12
2.1. Zdroje mikroplastů	12
2.2. Transport a distribuce mikroplastů ve vodním ekosystému	14
2.3. Osud mikroplastů ve vodních ekosystémech	15
3. Biodegradabilní plasty	16
4. Biodegradace mikroplastů	21
5. Stanovení mikroplastů	21
6. Vliv mikroplastů na akvatické organismy	23
Cíl disertační práce	28
Diskuze výzkumných otázek	30
1 Výzkumná otázka 1: Vyvolá přítomnost biodegradabilních mikroplastů P3HB negativní efekt u sladkovodní rostliny <i>L. minor</i> ?	30
2 Výzkumná otázka 2: Bude v přítomnosti P3HB mikroplastů pozorován vliv na růst řasy <i>D. subspicatus</i> ?	38
3 Výzkumná otázka 3: Je možné stanovit mikroplasty požití drobnými planktonními organismy bez jejich extrakce případně digesce organismu?	41
4 Výzkumná otázka 4: Ovlivní přítomnost P3HB mikroplastů negativně organismus <i>D. magna</i> ?	44
Závěr	47
Reference	48
Přílohy	71

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Význam
BDPs	biodegradabilní polymery/biodegradabilní plasty
ČOV	čistírna odpadních vod
DSC	diferenciální kompenzační kalorimetrie
ETS	elektronový transportní řetězec (dýchací řetězec)
EU	Evropská unie
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HDPE	vysokohustotní polyethylen
LDPE	nízkohustotní polyethylen
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MP	mikroplasty
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj – Evropská norma
P3HB	poly(3-hydroxybutyrát)
PA	polyamid
PBAT	poly(butylen adipát tereftalát)
PBS	polybutylensukcinát
PCL	polykaprolakton
PE	polyethylen
PEF	polyethylen furanoát
PET	polyethylen tereftalát
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PHBV	polyhydroxybutyrát-ko-hydroxyvalerát
PHV	polyhydroxyvalerát
PLA	polylaktid/kyselina polymléčná
PS	polystyren
PP	polypropylen
PTT	polytrimethylen tereftalát

PUR	polyurethan
PVC	polyvinylchlorid
Py-GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí
TAC	celková antioxidační kapacita
TG	termogravimetrie
UV	ultrafialové (záření)

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha A

Effects of biodegradable P3HB on the specific growth rate, root length and chlorophyll content of duckweed, Lemna minor

Autorův příspěvek: 70 %; literární rešerše, provedení experimentů, vyhodnocení dat, grafické zpracování výsledků, příprava manuskriptu, revize.

Příloha B

Innovative approach for quantitative determination of ingested microplastics by Daphnia magna: Use of Differential Scanning Calorimetry and Thermogravimetry

Autorův příspěvek: 50 %; literární rešerše, provedení experimentů, grafické zpracování výsledků, příprava manuskriptu, revize.

Příloha C

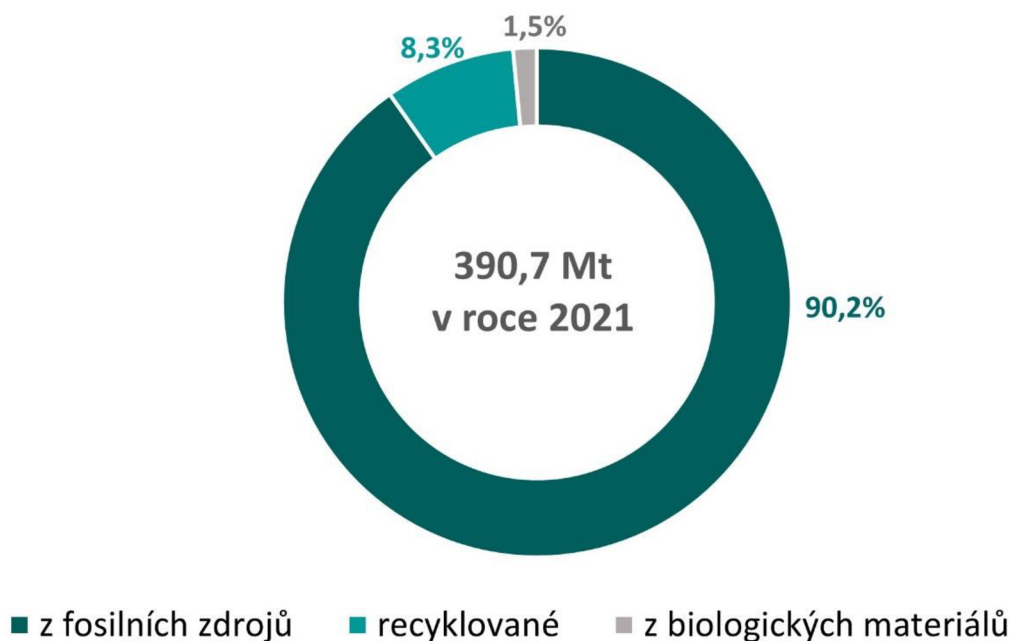
Assessing the Ecological Consequences of Biodegradable Plastics: Acute, Chronic and Multigenerational Impacts of Poly-3-hydroxybutyrate Microplastics on Freshwater Invertebrate Daphnia magna

Autorův příspěvek: 70 %; literární rešerše, provedení experimentů, vyhodnocení dat, grafické zpracování výsledků, příprava manuskriptu, revize.

ÚVOD

Člověk polymery využívá již od starověku (cca 1600 př. n. l.), kdy obyvatelé Střední Ameriky poprvé použili přírodní kaučuk [1]. Důležitým mezníkem v historii plastů (v práci používáme termín plast pro polymer, který prošel průmyslovým zpracováním) je rok 1839, kdy společnost Goodyear vyvinula vulkanizovaný kaučuk a německý lékárník Eduard Simon objevil polystyren (PS). V 19. století se tak rozvíjí výzkum přírodních a syntetických polymerů a dochází k objevu např. polyvinylchloridu (PVC), celulózy, nitrocelulózy nebo viskózy (umělé hedvábí), která se používá především v oděvním průmyslu [2–4]. Důležitý byl na počátku 20. století objev Bakelitu na počátku, nicméně k většímu rozšíření používání plastů došlo až ve druhé polovině 20. století [5].

Hodnotíme-li náklady na výrobu, možnosti zpracování a funkční vlastnosti, jsou plasty nesporně vynikajícími materiály. Staly se proto hlavní komoditou v celosvětovém měřítku a pronikly téměř do všech aspektů lidského života [6, 7]. Jejich využití (včetně aditiv a vláken) se zvyšuje spolu s růstem populace a příjmy obyvatel, tento trend je rychlejší než u jakékoliv jiné komodity, a to včetně oceli, hliníku a cementu [8]. Úspěch plastů jako materiálu je značný pro jeho univerzální použití v řadě aplikací, a to včetně přírodních polymerů, modifikovaných přírodních polymerů, termosetů, termoplastů a v poslední době i biodegradabilních plastů. Mají řadu jedinečných vlastností: lze je používat ve velmi širokém rozmezí teplot, jsou odolné vůči chemikáliím a světlu. Jsou velmi pevné a houževnaté a lze je snadno zpracovat [2]. Globální produkce plastů vzrostla po mírné stagnaci způsobené pandemií Covid-19 v roce 2020 na 390,7 milionů tun v roce 2021, z toho 90,2 % bylo vyrobeno z fosilních zdrojů, 8,3 % z recyklovaných plastů a 1,5 % pak z biologických materiálů (**Obrázek 1**) [9].



Obrázek 1: Celosvětová produkce plastů v roce 2021 dle vstupních surovin. Mt = Mega tuna, tj. 1 milion tun. Převzato a upraveno dle [9].

Plasty jsou inertní materiály, vysoce odolné vůči rozkladu. Ceněné jsou díky své nízké molekulové hmotnosti, nízké ceně a dobré tvárnosti. Jsou to rovněž korozivzdorné materiály s výbornými tepelně izolačními a elektroizolačními vlastnostmi. Nabízejí tak velké množství

aplikací a jsou využívány téměř ve všech průmyslových odvětvích [2, 10]. Nejčastěji používanými plasty jsou polyethylen (PE), PS, PVC, polypropylen (PP) a polyethylentereftalát (PET), aj. [7]. Kromě výhod, které plynou z vlastností plastů, je s jejich používáním spojena i řada problémů. Ty jsou generovány jednak současnou úrovní jejich produkce, ale i způsobem jejich likvidace [11]. Zhruba 4 % světové těžby ropy a zemního plynu, jakožto neobnovitelných zdrojů, jsou využita jako surovina pro výrobu plastů, další 3 až 4 % se pak spotřebují k zajištění energie nutné pro jejich výrobu. Problémem je rovněž způsob využívání plastů, kdy přibližně 50 % vyrobených plastů je pouze na jedno použití (obalové materiály, jednorázové spotřební zboží, aj.), nebo se jedná o výrobky s krátkou životností [12]. Pro uspokojení celosvětové poptávky po plastových výrobcích bylo od roku 1950 do posledního desetiletí vyrobeno více než 8 000 milionů tun plastů. Tato masivní produkce rovněž vytvořila několik milionů tun plastového odpadu [13]. V této souvislosti, Geyer a kol. [5] uvádí, že do roku 2015 bylo celosvětově vyprodukováno přibližně 6 300 milionů tun plastového odpadu.

Od roku 1950 skončila téměř polovina vyrobeného plastu na skládkách nebo ve volné přírodě a pouze 9 % použitého plastu bylo adekvátně recyklováno, přičemž před rokem 1980 byly recyklace a spalování plastů zanedbatelné [5, 14]. V roce 2019 bylo celosvětově skládkováno 46 % plastového odpadu, 17 % bylo spáleno, 15 % bylo shromážděno pro recyklaci a 22 % skončilo v životním prostředí (littering) nebo bylo jinak nesprávně likvidováno. [8]. V Evropské unii (EU) bylo v roce 2020 shromážděno 29,5 milionů tun spotřebitelského plastového odpadu, z toho 42 % bylo využito k výrobě energie, 35 % bylo recyklováno a 23 % bylo skládkováno. Roku 2021 se v EU podařilo vyrobit 5,5 milionů tun plastových recyklátů, tyto materiály dále slouží k výrobě nových obalů, uplatnění nachází ve stavebnictví, zemědělství, automobilovém průmyslu, nebo při výrobě elektroniky [9].

Ještě před několika lety bylo znečištění životního prostředí plasty považováno pouze za estetický problém projevující se rozptylem plastů v prostředí. Thompson [15] odhaduje, že až 10 % vyrobených plastů končí v oceánech, kde se hromadí. Zbytky plastů se vyskytují na pobřeží, v mořském ledu, na hladině i dně. Téměř 80 % plastů se do oceánů dostává prostřednictvím řek [15–18]. Přítomnost velkých plastových úlomků, tzv. makroplastů, v mořském prostředí představuje estetický problém s ekonomickými důsledky pro turistický ruch. Je rizikem pro lodní dopravu, rybolov, výrobu energie a vodní ekosystém. Prostřednictvím plastových úlomků může docházet k transportu nepůvodních druhů mořských organismů do nových stanovišť [19]. Dopad makroplastů na životní prostředí ale zahrnuje i poranění a smrt mořských ptáků, savců, ryb a plazů v důsledku jejich mechanického poškození, nebo požití plastů [20]. Potenciálním problémem je i hromadění plastového odpadu na dně moří, které může způsobovat ztížení výměny plynů a takto narušit normální fungování ekosystému, včetně možných změn ve složení biocenóz mořského dna [21]. Z výše uvedeného je patrné, že problematika znečištění životního prostředí mikroplasty je velmi široká, a proto se tato práce zaměřuje pouze na sladkovodní systémy.

SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1. Definice mikroplastů a jejich typů

V přirozených podmínkách ekosystému dochází vlivem slunečního záření, abraze a interakce s okolním prostředím a živými organismy k pomalé degradaci a fragmentaci makroplastů na menší částice, tzv. mikroplasty [22]. Degradace plastů je proces vyvolávající změny

ve vlastnostech polymeru v důsledku fyzikálních, chemických nebo biologických reakcí, které vedou ke štěpení vazeb. Rozlišujeme fotodegradaci, termální a biologickou degradaci. Tyto hlavní rozkladné procesy jsou účinnější v půdě než ve vodním prostředí [23, 24]. Přítomnost malých plastových fragmentů v oceánu byla poprvé popsána již v 70. letech 20. století Carpenterem a Smithem [25]. Obnovený vědecký zájem o mikroplasty v posledních desetiletích odhalil, že tyto kontaminanty jsou v mořském prostředí v podstatě všudypřítomné [19].

Pokud se jedná o velikost částic, neexistuje dosud žádná mezinárodně dohodnutá definice velikosti, pod kterou by se malá částice plastu měla nazývat mikroplast. Původně tento termín zavedl Thompson a kol. [26] k popisu akumulace mikroskopických částic plastů v mořských sedimentech a ve vodním sloupci evropských vod. Následně v roce 2009 pak Arthur a kol. [27] navrhl horní limit pro velikost částic mikroplastů a definoval je tak jako plastové částice menší než 5 mm. Roku 2015 tuto definici Verschoor [22] upřesnil – definoval mikroplasty jako pevné syntetické částice, nebo polymerní matrice pravidelného nebo nepravidelného tvaru o velikosti v rozmezí 1 μm až 5 mm, které jsou nerozpustné ve vodě. Nakonec v roce 2019 Hartmann a kol. [28] navrhli systém kritérií, na jejichž základě doporučují definovat „plastové zbytky“ jako předměty sestávající ze syntetických nebo silně modifikovaných přírodních polymerů, které jsou přítomny v přírodním prostředí, aniž by plnily předem zamýšlenou funkci, jsou pevné (T_m nebo $T_g > 20\text{ }^\circ\text{C}$) a nerozpustné při $20\text{ }^\circ\text{C}$ (rozpustnost $<1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Pro bližší určení doporučuje použít doplňková kritéria jako je velikost, tvar, barva a původ, přičemž jako mikroplasty definuje plastové částice o velikosti 1 až 1 000 μm .

Životní prostředí je kontaminováno dvěma druhy mikroplastů, a to primárními a sekundárními. Primární mikroplasty jsou přímo vyrobené ve formě malých částic. V některých zemích jsou stále ještě přidávány do kosmetiky (mikrokuličky v krémech, zubních pastách, rtěnkách, aj.), využívají se jako abrasivní média, uplatnění nacházejí ve stomatologii a při cílené distribuci léků, nebo aplikaci pesticidů. K jejich vzniku dochází i při výrobě plastových předmětů [29]. Sekundární mikroplasty jsou důsledkem fyzikálních, chemických a biologických procesů, které vedou k fragmentaci plastového odpadu. Vystavení plastů ultrafialovému (UV) záření katalyzuje fotooxidaci plastu, způsobuje jeho křehkost a fragmentaci na mikroplasty. Asi není třeba dodávat, že různé zdroje plastů ovlivňují tvar, v němž se výsledné mikroplasty v životním prostředí vyskytují (pelety, vlákna a fragmenty) [30].

Mikroplasty přítomné v životním prostředí jsou tedy heterogenní skupinou částic, lišící se velikostí, hustotou, tvarem a chemickým složením. Přičemž velikost a tvar jsou významnými vlastnostmi, které charakterizují nejen zdroj jejich původu, ale i jejich potenciál vyvolat fyzické anebo fyziologické účinky na exponovanou biotu. Tyto vlastnosti spolu s hustotou materiálu určují jejich osud a distribuci v ekosystému, stejně jako následnou biodostupnost [31].

2. Mikroplasty v akvatickém prostředí

2.1. Zdroje mikroplastů

Mikroplasty byly detekovány téměř ve všech složkách životního prostředí a jsou proto stále více diskutovaným kontaminantem [32]. Velké množství primárních mikroplastů se dostává do vodního prostředí přímo prostřednictvím odpadních vod. Surové materiály pro výrobu plastových výrobků (pelety, vločky, prášek nebo vlákna) se do životního prostředí mohou

dostat v důsledku špatné manipulace, ať už náhodnou ztrátou během přepravy nebo únikem ze zpracovatelského zařízení. Podobně v životním prostředí mohou končit zbytky z továren na zpracování plastů, případně regranulát vzniklý při recyklaci plastů [33].

Odhazování odpadků, skládkování a ztráty ať už z nevhodně spravovaných skládek nebo při sběru odpadu jsou považovány za klíčové cesty vstupu plastových materiálů do ekosystému. Mimo to se velké množství plastů může do životního prostředí dostat během přírodních katastrof. Významným zdrojem mikroplastů jsou i plastové mulčovací fólie používané k ochraně zemědělských plodin, potlačování plevelů, zvyšování teploty a zadržování závlahové vody v půdě. Pokud zkrěhnou, jejich části v půdě zůstávají. Mikroplasty se mohou uvolňovat i otěrem plastových výrobků používaných v domácnostech. Při běžném používání, nebo při sušení v sušičce se mohou ve formě prachu do vzduchu uvolňovat vlákna ze syntetických textilií. Za velmi relevantní zdroj mikroplastů v životním prostředí je považován i otěr pneumatik. Syntetické polymery rovněž obsahuje mnoho lodních barev a dalších ochranných nátěrů – mikroplasty se tak mohou uvolňovat rozlitím při nanášení nátěru, otěrem během používání natřeného produktu, nebo při odstraňování nátěru. Mezi zdroje odpadu v oceánech patří i vyhozený nebo uvolněný materiál z lodí [33].

Předpokládá se, že významnými bodovými zdroji mikroplastů pro sladkovodní a později i brakické a mořské vody jsou čistírny odpadních vod (ČOV). Do odpadních vod se dostávají jak částice používané v produktech osobní péče, tak v čisticích prostředcích, rovněž se při praní syntetických oděvů uvolňují vlákna, která pak končí v odpadních vodách. ČOV jsou schopné odstranit během čištění velké množství mikroplastů, část jich ale není zachycena a dostává se tak přímo do vodního ekosystému [34–36]. Carr a kol. [37] se zabývali osudem částic mikroplastů během procesu čištění odpadních vod. Bylo zjištěno, že částice mikroplastů byly odstraňovány především během primárních procesů čištění odpadní vody jako je usazování a separace kalu. Stejně tak Murphy a kol. [36] ve své studii uvádí, že ČOV mohou být efektivní při odstraňování mikroplastů z komunálních vod. Nicméně autoři dodávají, že i malá koncentrace částic mikroplastů na litr vyčištěné odpadní vody, může mít, vzhledem k velkým objemům vody čištěné na ČOV, za následek významné množství mikroplastů, které vstoupí do životního prostředí. Dále je nutné zmínit, že pouze 20 % z celosvětově produkováných odpadních vod je před vypuštěním do vodního ekosystému čištěno na ČOV [32].

V souvislosti s ČOV je další možnou vstupní cestou mikroplastů do životního prostředí i čistírenský kal, který může být aplikován na pole jako hnojivo. Využití čistírenských kalů v zemědělství se v jednotlivých zemích EU liší a pohybuje od nuly (Malta, Slovinsko, Slovensko) až po 80 % (Irsko). Aktuálně je využití kalů z ČOV pro potřeby zemědělství v rámci EU regulováno pouze limity pro obsah těžkých kovů. Některé evropské státy zavedly přísnější požadavky a přijaly navíc limity pro obsah syntetických organických sloučenin a mikrobiální kontaminaci [38]. Studie zabývající se obsahem mikroplastů v kalech uvádí jejich obsah od 1 000 až po více než 20 000 částic na 1 kg sušiny [39, 40].

Nicméně, Evropské státy spolu s Oceánií jsou zodpovědné pouze za necelé 1 % plastového odpadu, který se dostává do oceánů. Téměř jedna třetina (36 %) veškerých plastů, které vstupují do oceánů, pochází z Filipín, kde se rovněž nachází 7 z 10 řek nejvíce znečištěných plastovým odpadem. Filipíny následuje Indie (13 %) a Čína (7 %). Největším zdrojem plastového odpadu v oceánech jsou tak přímořské státy Asie (81 %) a Afriky (8 %) [41].

2.2. Transport a distribuce mikroplastů ve vodním ekosystému

Akvatické ekosystémy je možné rozdělit na sladkovodní a mořské. Sladkovodní zahrnují povrchové vody jako jsou řeky a jezera, mořské pak pobřeží, moře, oceány a polární led. Toto rozdělení je vhodné nejen kvůli rozdílné hustotě vody, ale i kvůli rozdílným typům proudění přítomných v řekách, jezerech a oceánech [32].

Transport mikroplastů říčním tokem závisí nejen na vlastnostech samotných částic, ale i na toku vody. Částice s hustotou větší, než je hustota vody (např. PS, PET, nebo PVC) klesají ke dnu přímo, nebo jsou v případě silného toku unášeny do míst s tokem klidnějším, kde následně sedimentují. Částice s nižší hustotou, např. PE nebo PP, mohou po vstupu do vodního prostředí plavat na hladině a s největší pravděpodobností jsou dále unášeny proudem. Navzdory vztlaku mnoha plastů je pravděpodobné, že v pomalu se pohybujících částech vodního toku se částice mikroplastů usadí spolu s klesajícími částicemi sedimentu [42–45]. Sedimentace částic mikroplastů závisí kromě hustoty i na jejich tvaru. Pelety se chovají výrazně jinak než vlákna a úlomky. Rovněž je pravděpodobnější sedimentace nepravidelných, vznášejících se částic než částic kulovitých. Jakmile se částice usadí na dně řeky, může být převrstvena přírodními sedimenty a infiltrovat se tak do sedimentu, nebo může být remobilizována silnými proudy [32]. Mani a kol. [46] uvádí, že hlavními faktory, ovlivňujícími distribuci polymeru v příčném profilu řeky jsou jeho hustota, místní hydrodynamika, tvorba biofilmu na částicích mikroplastů, míra připojení mikroplastů k okolním nerozpustným látkám a jejich heteroagregace. Vysoký potenciál k zadržování mikroplastů mají vodní nádrže a jezera, protože voda zde je klidná a dochází v nich k jejímu dlouhodobému zdržení [47].

V důsledku mechanismů dynamického proudění v ústích řek se v těchto oblastech mohou, stejně jako jiné polutanty (kovy, pesticidy), hromadit částice mikroplastů [32]. Jednou z hlavních charakteristik ústí řek do moří je mísení sladké a slané mořské vody. V místech s omezeným přílivovým pohybem proudí sladká voda přes slanou a dochází k tvorbě klínu slané vody. Neplovoucí částice, které se původně nacházely u dna sladkovodního sloupce, jsou transportovány v přechodové zóně mezi sladkou a slanou vodou, zatímco plovoucí částice jsou unášeny bez velké interakce s přicházející slanou vodou do otevřeného oceánu [48].

Do oceánů vstupují mikroplasty z řek, z pobřeží a případně moří. Dále mohou být distribuovány prostřednictvím oceánských proudů a vln, nebo se mohou usazovat v sedimentu. V zimním období mohou být zachyceny v ledu a do vodního cyklu se pak navracejí s jeho táním. Vertikální transport částic mikroplastů v oceánu je ovlivněn měnící se hustotou vody v důsledku jejího chemického složení nebo různých teplot, díky kterým se oceánské proudy v určitých místech mohou posunout z povrchu (hladiny) do hlubších vod a mohou s sebou nést i mikroplasty. Dalším faktorem, který ovlivňuje vertikální transport mikroplastů v oceánech, je měnící se hustota částic. Tyto změny jsou způsobeny jejich degradací, fragmentací a biofoulingem [32]. Biofouling je proces, kdy po několika hodinách ve slané vodě dochází na povrchu částic mikroplastů k tvorbě biofilmu, který představuje základ pro další kolonizaci povrchu. Biofilm na povrchu částic postupně narůstá, hustota soustavy se zvyšuje a částice klesají ke dnu. Ve větších hloubkách, kde je nedostatek světla, biofilm odumírá, částice mikroplastů se stávají lehčími a stoupají zpět k hladině, ve vodním sloupci tedy oscilují [49].

Plovoucí mikroplasty mohou být strhávány ke dnu tzv. mořským sněhem. Mořský sníh představují agregáty bohaté na organické látky. Je tvořen směsicí výkalů mořských živočichů, rozkládajících se těl uhynulých organismů, fytoplanktonu a anorganických látek. Na rozdíl od biofoulingu není závislý na množství světla, které proniká do vody a může tak částice

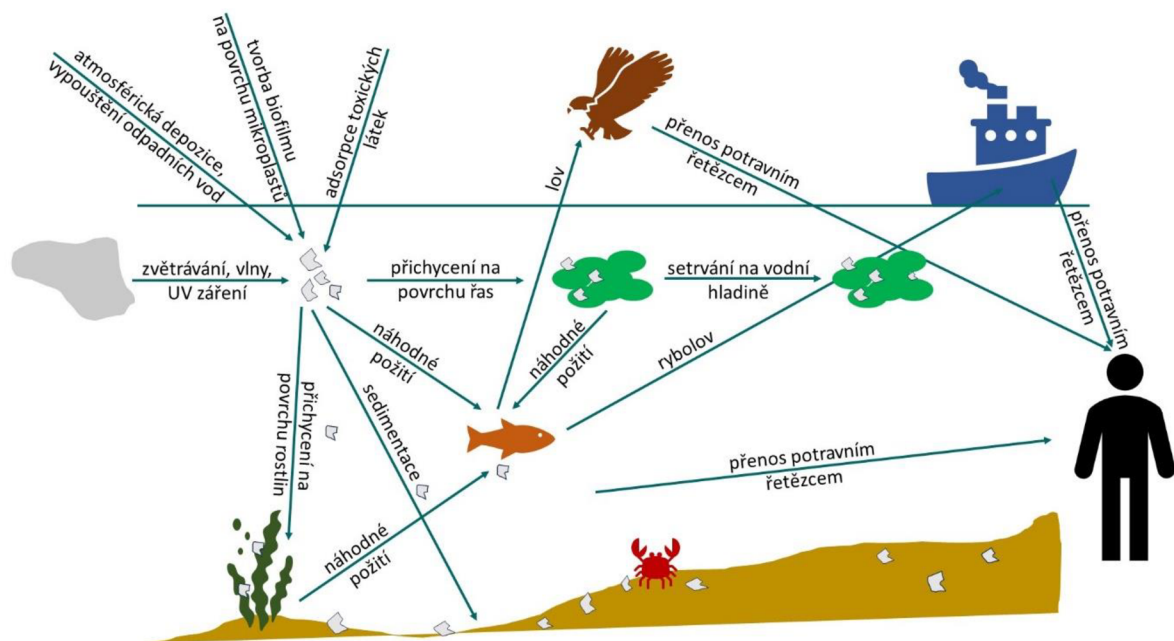
mikroplastů transportovat až na mořské dno [49, 50]. Martin a kol. [51] uvádí, že v profilu mořských sedimentů byly mikroplasty nalezeny v hloubce $3,5 \pm 0,5$ cm, přičemž 97 % z nich bylo nalezeno v horních 2,5 cm a 66 % v horních 0,5 cm. Vlnami, nebo během bouřek může docházet k vyplavování částic mikroplastů zpět na pobřeží [32].

Znečištění mikroplasty se geograficky liší, jejich množství a distribuce jsou určovány především environmentálními a antropogenními faktory. Mezi environmentální faktory ovlivňující distribuci mikroplastů se řadí vlnové proudy, příliv a odliv, cyklóny, směr větru a případně hydrodynamika řeky. Koncentrace mikroplastů je vysoká tam, kde jsou tyto faktory intenzivnější [52]. Mikroplasty mají rovněž různé distribuční charakteristiky v různých médiích. Migrace a difúze částic je ovlivněna jejich velikostí, přičemž malé částice jsou snadno požitý vodními organismy a ohrožují tak jejich zdraví; navíc může také docházet k biomagnifikaci [53].

Mikroplasty jsou přenášeny a rozptýleny ve světových oceánech – na pobřežích, plážích, v sedimentech mořského dna a na hladině od Arktidy po Antarktidu, kde se soustřeďují na odlehlých místech. Jejich distribuce v mořském prostředí je ovlivněna hustotou částic, umístěním zdrojů a transportem oceánskými proudy a vlnami. Schopnost se vznášet a fakt, že jsou perzistentní jim umožňuje se snadno a široce rozptýlit pomocí hydrodynamických procesů a oceánských proudů [54].

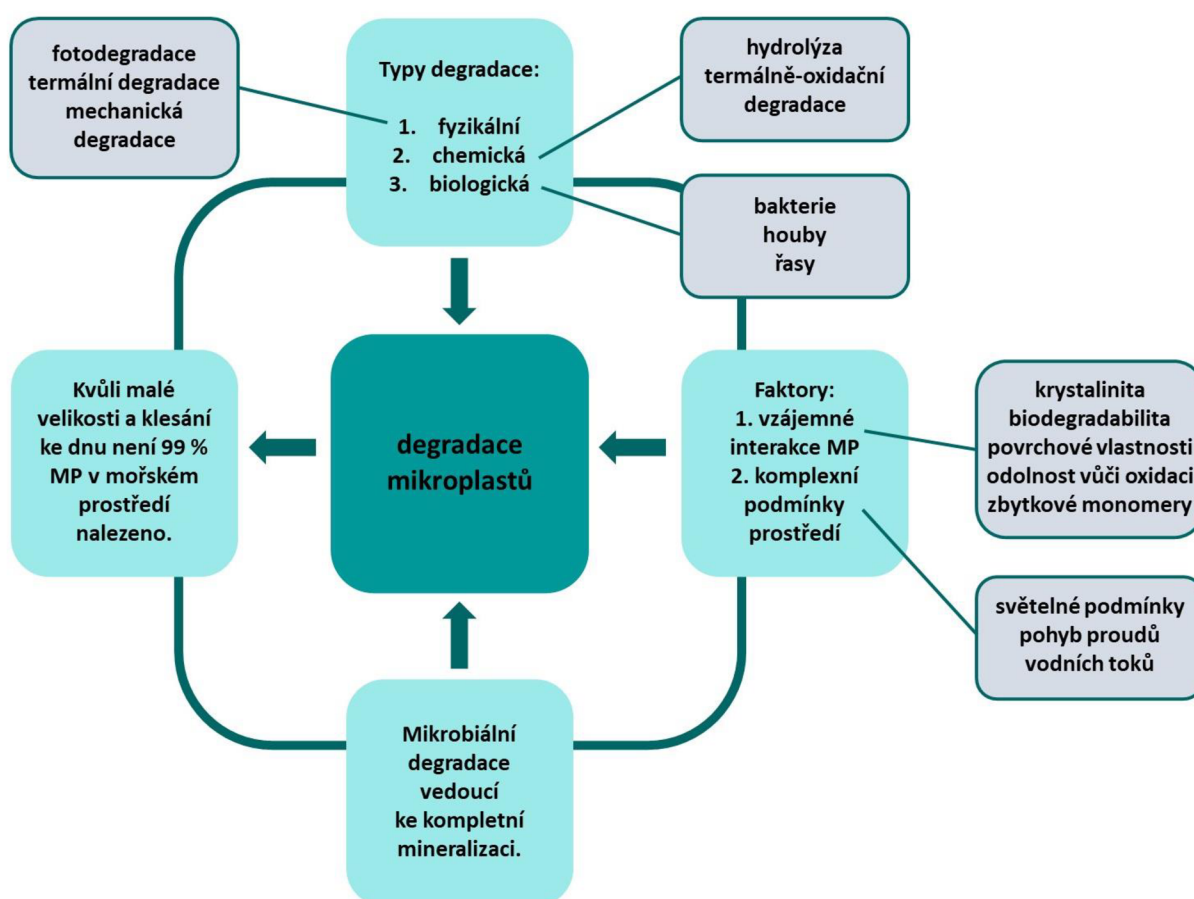
2.3. Osud mikroplastů ve vodních ekosystémech

Po vstupu mikroplastů do akvatického ekosystému se obecně předpokládá, že skončí v oceánu [55]. Jejich osud v mořském ekosystému je ovlivněn mnoha faktory prostředí, jako jsou oceánské proudy, dostatek potravy mořských organismů, aj. [56]. Bylo zjištěno, že 70 až 80 % částic mikroplastů se usadí na mořském dně a případně se stane součástí sedimentů. Zbývající částice zůstávají součástí povrchové vody [55, 57]. **Obrázek 2** ilustruje možný cyklus mikroplastů ve vodním ekosystému.



Obrázek 2: Schématický model ilustrující koloběh mikroplastů ve vodním prostředí. Převzato a upraveno dle [58].

V mořském prostředí může docházet k degradaci mikroplastů, ať už k biologické, fyzikální, nebo chemické (**Obrázek 3**). Degradace zahrnuje změnu velikosti a mineralizaci částic mikroplastů – polymerní řetězec se rozkládá a molekulová hmotnost polymeru se snižuje [59]. Existuje mnoho faktorů ovlivňujících rychlost degradace, jedním z nich je typ mikroplastu – různé mikroplasty mají různé vlastnosti (krystalinitu, biologickou rozložitelnost, odolnost vůči oxidaci, povrchové vlastnosti a rovněž různé zbytkové monomery) [60]. Zejména u nebiodegradabilních mikroplastů ovlivňuje rychlost degradace míra jejich interakce s mikroorganismy tvořícími na povrchu částic biofilm [55]. Právě tvorba biofilmu, jakožto ochranné vrstvy na povrchu částic mikroplastů, pak vede ke zpomalení degradace. Rychlost degradace ovlivňují rovněž komplexní podmínky prostředí [59]. Nicméně, protože je k úplné mineralizaci mikroplastů potřeba stovek let, jsou považovány za relativně perzistentní ve vodním prostředí [61]. S neustále rostoucím problémem se znečištěním životního prostředí plasty tak přitahují stále větší pozornost biodegradabilní plasty. Tyto nové materiály jsou v určitých aplikacích považovány za potenciální náhradu konvenčních plastů [62].

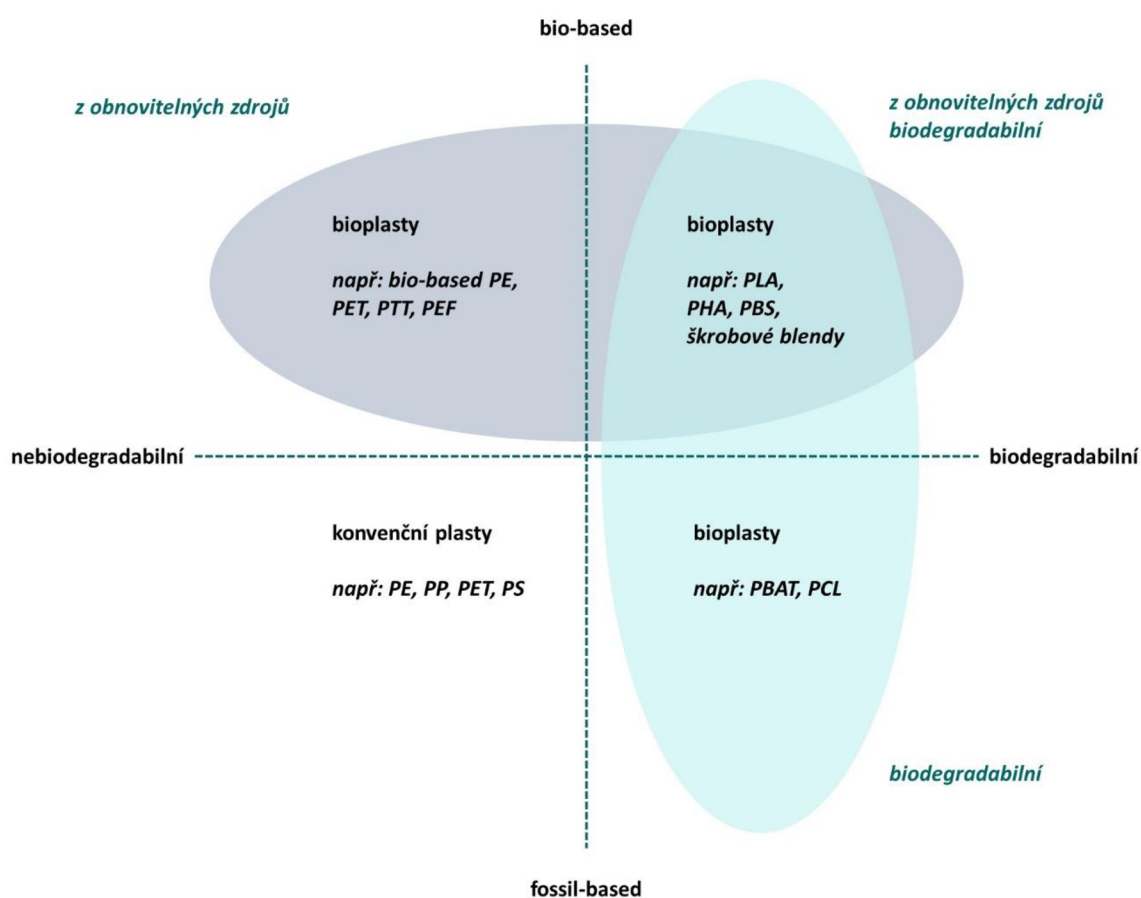


Obrázek 3: Degradace mikroplastů ve vodním prostředí. Převzato a upraveno dle [59].

3. Biodegradabilní plasty

Jako biodegradabilní polymery (BDPs) nebo biodegradabilní plasty jsou označovány materiály, rozložitelné na oxid uhličitý, methan, vodu a anorganické sloučeniny, u kterých je převládajícím mechanismem rozkladu enzymatické působení mikroorganismů. Mohou mít základ

v obnovitelných surovinách (bio-based), nebo mohou být vyrobeny z petrochemikálií (fossil-based), případně se může jednat o směsi (**Obrázek 4**) [63]. Biodegradabilní polymery na bázi petrochemikálií jsou syntetické polymery s hydrolyzovatelnými funkčními skupinami (estery, amidy a uretany) [30]. BDPs na biologickém základě (bio-based), tzv. bioplasty, jsou vyrobeny z přírodních materiálů pocházejících z rostlin, zvířat, nebo mikroorganismů, jako jsou polysacharidy (škrob, celulóza, lignin a chitin), bílkoviny (želatina, kasein, pšeničný lepek, hedvábí a vlna) a lipidy (rostlinné a živočišné oleje). Do této kategorie se řadí i některé polyesteru produkované mikroorganismy nebo rostlinami, např. polyhydroxyalkanoáty (PHA), nebo syntetizované z biologicky odvozených monomerů jako je kyselina mléčná (PLA). Tyto materiály jsou většinou biologicky odbouratelné [64].



Obrázek 4: Schématické znázornění typů plastů: osa x značí biologickou rozložitelnost, osa y pak původ monomeru, převzato a upraveno dle [65]. Nebiodegradabilní bio-based plasty: polyethylen (PE), polyethylen tereftalát (PET), polytrimethylen tereftalát (PTT), polyethylen furanoát (PEF). Konvenční plasty: polyethylen (PE), polypropylen (PP), polyethylen tereftalát (PET), polystyren (PS). Biodegradabilní bioplasty: polylaktid (PLA), polyhydroxyalkanoáty (PHA), polybutylen sukcinát (PBS), škrobové blendy. Biodegradabilní plasty: poly(butylen adipát tereftalát) (PBAT), polykaprolakton (PCL).

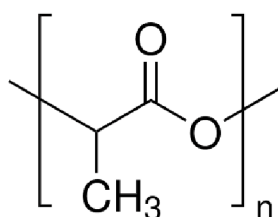
Konvenční plasty vyrobené z ropy (fossil-based) jsou většinou nebiodegradabilní. K usnadnění jejich rozkladu se přidávají aditiva. Jedním z možných způsobů je zavedení antioxidantů do polymerních řetězců. Antioxidanty reagují na UV záření, které vyvolá fotooxidaci. Biologická rozložitelnost takových materiálů je nicméně nadále nízká a považují se proto za tzv. oxo-degradabilní polymery. Další možností, jak vyrobit oxo-degradabilní materiály

je přidání prooxidačních přísad založených na směsích kovů (např. Mn^{2+} , Mn^{3+}) [64, 66]. Je třeba zmínit, že biodegradabilní a oxo-degradabilní plasty jsou často nesprávně zaměňovány, což vede k celé řadě nedorozumění.

Rovněž je důležité zmínit, že ne všechny bioplasty jsou biodegradabilní (např. bio-based PE) a naopak, že některé polymery vyrobené z ropných produktů biodegradabilní být mohou (viz **Obrázek 4**) [63]. V závislosti na způsobu degradace lze polymerní materiály dále klasifikovat na hydrolyticky a enzymaticky odbouratelné polymery [66].

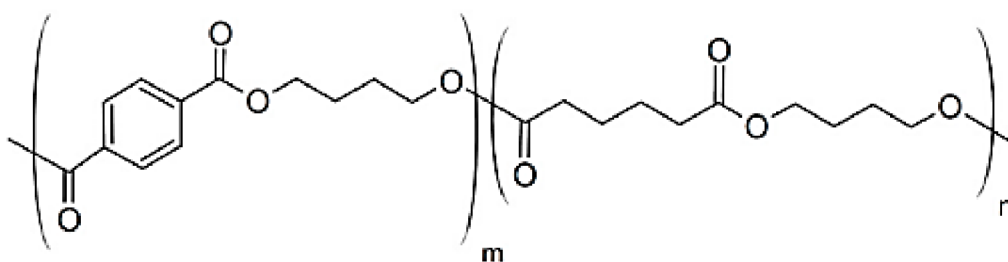
První generace biologicky rozložitelných materiálů sestávala ze směsi polymerů vyrobených z ropných produktů s přírodními materiály, jako je např. škrob. Ve vlhkém prostředí dochází k rozkladu škrobu mikroorganismy, ale samotný plast rozložen být nemusí, nicméně může docházet k jeho fragmentaci na mikročástice, a tak i ke snazší distribuci potenciálně nebezpečných částic v prostředí [67]. Druhá generace zahrnovala plasty, u kterých mělo cílené vložení esterových skupin náchylných k mikrobiálnímu rozkladu na polymerní kostru umožnit biodegradaci [11]. Do této skupiny se řadí alifatické polyestery (kyselina polyglykolová, PBS a PCL), aromatické kopolyestery (polybutylen sukcinát tereftalát) a polyvinylalkohol [63]. Třetí generací byl pak vývoj biosyntetizovaných materiálů [11]. Jedná se o polyestery monomerů získaných fermentací (semi-syntetické polymery) nebo produkovaných mikroorganismy, které jsou kultivovány za různých podmínek (mikrobiální polymery) [64].

Semi-syntetické polymery, jako je např. polymléčná kyselina neboli polylaktid (PLA, **Obrázek 5**), lze vyrobit z monomerů vzniklých fermentací sacharidů. PLA je syntetizován z kyseliny mléčné produkované bakteriální fermentací škrobu. Jedná se o materiál zcela rozložitelný kompostováním, nerozpustný ve vodě a degradovatelný mikroorganismy přítomnými v ekosystému [64, 68]. Biologická rozložitelnost PLA závisí na podmínkách prostředí, ve kterém se polymer nachází. Předpokládá se, že v tělech živých organismů nejprve podléhá hydrolyze za tvorby rozpustných oligomerů, které jsou dále metabolizovány. Podobně je tomu i v životním prostředí, případně i v kompostu, kde je PLA hydrolyzován na oligomery s nízkou molekulovou hmotností. Ty jsou dále mineralizovány přítomnými mikroorganismy na oxid uhličitý a vodu. Degradace PLA v půdě je pomalá, v prostředí kompostu může být hydrolyzován na menší molekuly po 45 až 60 dnech při teplotě 50 až 60 °C [69].



Obrázek 5: Chemická struktura polylaktidu [70].

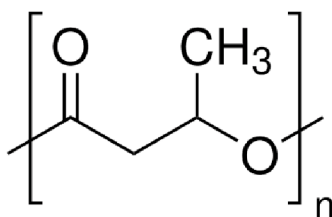
Kompostovatelný a biodegradabilní je i semi-aromatický poly(butylen adipát tereftalát) (PBAT, **Obrázek 6**). Tento polymer má podobné vlastnosti (vysoká elasticita, odolnost proti opotřebení a lámavosti, odolnost vůči olejům a vodě) jako nízkohustotní polyethylen (LDPE). Může být tedy zpracován na konvenčním zařízení používaném pro zpracování LDPE. Vyrábí se polykondenzací 1,4-butandiolu, kyseliny adipové a tereftalové [71].



Obrázek 6: Chemická struktura poly(butylene adipát tereftalátu) [72].

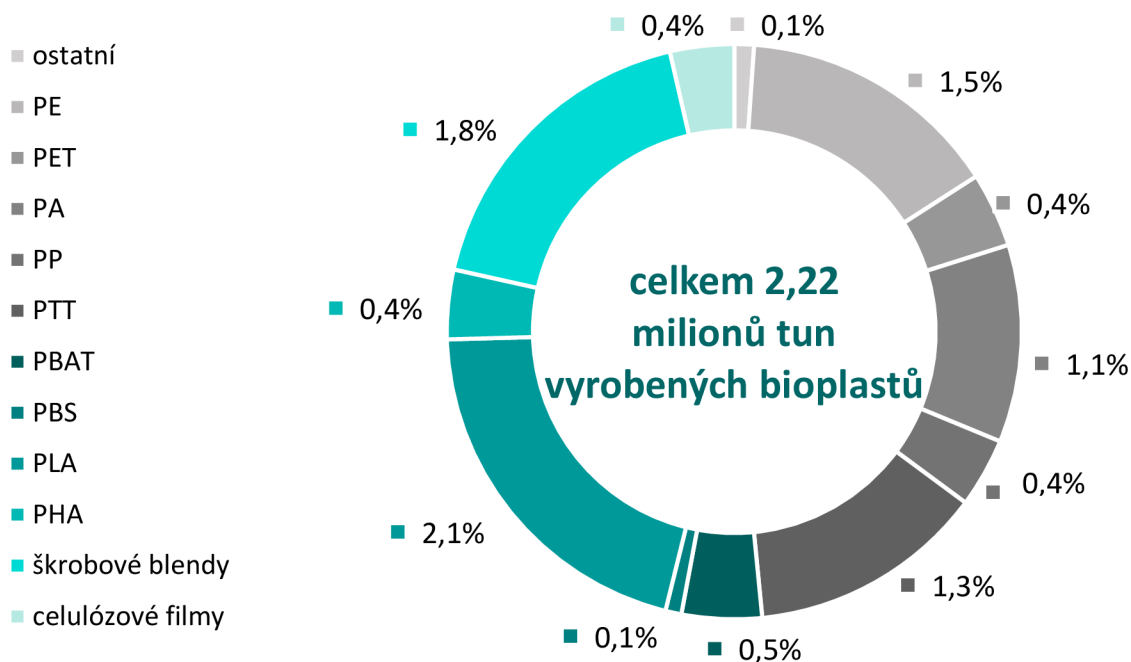
Nejvíce studií zaměřených na mikrobiální polymery se zabývá poly(β -hydroxyalkanoáty) (PHA), které představují přírodní polyestery. Stále více pozornosti se věnuje polymerům založených na produkci pomocí bakterií [73]. PHA může řada bakterií akumulovat jako intracelulární rezervní materiál. Některé organismy, mají-li bohatý zdroj uhlíku a omezené množství dusíku, mohou akumulovat PHA od 30 do 80 % suché hmotnosti biomasy [64]. Všechny PHA mají stejnou konfiguraci s chirálním centrem na třetím uhlíku, což je velmi důležité pro jejich fyzikální vlastnosti a enzymovou aktivitu zahrnutou v procesech biosyntézy a biodegradace [74]. Obecný vzorec monomerních jednotek polyhydroxyalkanoátů je $[-O-CH(R)-CH_2-CO-]$, v závislosti na velikosti alkylového substituentu (R) se liší mechanické vlastnosti. Jedná se tak o rozmanité druhy materiálů od pevných a křehkých přes pružné plasty, nebo silné houževnaté elastomery [64]. PHA je skupinou zahrnující více než 100 různých alifatických polyesterů, které se řadí mezi termoplasty s vlastnostmi podobnými konvenčním plastům z petrochemického průmyslu. K jejímu objevení došlo díky jednoduchému homopolyesteru, kterým je poly(3-hydroxybutyrát) [74, 75].

Poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB, **Obrázek 7**) je přirozeně se vyskytující polyester, který se hromadí v bakteriálních buňkách jako zdroj uhlíku a energie [76]. Poprvé byl objeven roku 1925 francouzským mikrobiologem Mauricem Lemoignem při jeho práci s bakterií *Bacillus megaterium* [67]. P3HB je za stresových podmínek vyvolaných nedostatkem živin produkován řadou jak gramnegativních, tak i grampozitivních bakterií (*Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Methylobacterium* sp.) [77]. Jedná se o hydrofobní materiál, vykazující vysokou krystalinitu (nad 50 %), vysokou teplotu tání (180 °C) a nízkou pružnost. Jeho zpracování je komplikováno tím, že se během jeho tání velmi rychle zkracují polymerní řetězce, a tak dochází k negativnímu ovlivnění jeho mechanických vlastností. To omezuje jeho možné využití v průmyslovém měřítku [78, 79]. Zlepšení mechanických vlastností P3HB lze dosáhnout přidáním dalších polymerů, např. PLA, tvorbou kopolymerů (např. s kyselinou 3-hydroxyvalerovou za vzniku polyhydroxybutyrát-ko-hydroxyvalerátu, PHBV), případně přidáním plastifikátorů. Tato aditiva ale mohou výrazně zpomalit biodegradaci výsledného produktu [80, 81]. Proto se do těchto směsí následně přidávají další biodegradaci usnadňující látky, jako např. škrob. Další z nevýhod P3HB jsou jeho vysoké výrobní náklady. Ty lze snížit použitím odpadních materiálů (např. použitý řepkový fritovací olej), jako vstupní suroviny. Je možné využít i biomasu, odpadní produkty z cukrovarnictví, nebo hydrolyzát kávových sedlin [79, 82]. Nicméně i tak jsou náklady několikanásobně vyšší než u plastů na bázi ropných produktů [83].



Obrázek 7: Chemická struktura poly(3-hydroxybutyrátu) [84].

Vzhledem k tomu, že P3HB slouží v mikroorganismech jako zásobní energetická molekula, jsou mikroorganismy vybaveny depolymerizačním systémem pro její využití, a to schopností produkovat jak extracelulární, tak intracelulární enzym PHA depolymerázu. Degradace P3HB začíná fotodegradací zahrnující termooxidační degradaci, polymer křehne a rozpadá se na menší fragmenty, dokud polymerní řetězce nedosáhnou dostatečně nízké molekulové hmotnosti vhodné k metabolizaci. P3HB je možné rozložit i pomocí termální degradace, spojením termální a chemické, případně termální a mechanické degradace. Rovněž může podléhat abiotické degradaci a biodegradaci [85].



Obrázek 8: Celosvětová produkce bio-based polymerů v roce 2022, převzato a upraveno dle [86]. Bio-based nebiodegradabilní: ostatní, polyethylen (PE), polyethylen tereftalát (PET), polyamid (PA), polypropylen (PP), polytrimethylen tereftalát (PTT), biodegradabilní: poly(butylen adipát tereftalát) (PBAT), polybutylensukcinát (PBS), polylaktid (PLA), polyhydroxyalkanoáty (PHA), škrobové blendy a celulózoové filmy.

Známy jsou i další mikrobiální polyestery. Jednotlivé kultivační podmínky, jako je pH, teplota, koncentrace a zdroj uhlíku, ale i druh mikroorganismů vedou k produkci různých polymerů [87]. Biodegradabilní polymery mohou být upravovány většinou modifikovaných konvenčních technik ke zpracování plastů. Uplatnění našly v medicíně, zemědělství a jako obalové materiály [64]. **Obrázek 8** uvádí celosvětovou produkci bio-based polymerů za rok 2022 a je z něj patrné, že nejpopulárnější je PLA.

4. Biodegradace mikroplastů

Obecně jsou mikroplasty fragmenty syntetických plastových materiálů, nerozložitelných za přírodních podmínek a nerozpustných ve vodě. Vzhledem k širokému spektru různých mikroplastů přítomných v životním prostředí je jejich biologická odbouratelnost za asistovaných podmínek brána v úvahu při studiu biotechnologických procesů, jako je biostimulace, bioaugmentace a enzymatická biodegradace, a které lze následně využít při jejich biodegradaci [88]. Syntetické polymery jako je PE, PP a PS degradují velmi pomalu [89]. V současnosti jsou klíčové depolymerizační enzymy podílející se na rozkladu těchto polymerů neznámé a o mikrobiální degradaci jejich mikroplastů a plastových zbytků je k dispozici pouze malé množství informací [90]. To samé platí i o odhadech týkajících se doby rozkladu těchto plastů [91].

Proces biodegradace polymerů lze rozdělit do čtyř kroků – biodeteriorace, depolymerizace, bioasimilace a mineralizace [92]. V prvním kroku (biodeteriorace) dochází k tvorbě mikrobiálního biofilmu na povrchu částic plastu, přítomné mikroorganismy vylučují extracelulární enzymy katalyzující depolymerizaci polymerního řetězce na oligomery, dimery, nebo monomery. Povrchovou degradací je tedy polymerní materiál fragmentován na menší částice. K jejich tvorbě může dojít i pomocí nebiologické hydrolyzy případně oxidačních a/nebo fotolýzních reakcí. Následně jsou během bioasimilace tyto malé molekuly přijímány do mikrobiální buňky, kde jsou přeměněny na primární a sekundární metabolity. Ty jsou nakonec mineralizovány na konečné produkty biodegradace: CO₂ (u aerobní biodegradace), CO₂ a CH₄ (v případě anaerobní biodegradace), H₂O a N₂ [93, 94].

Mechanismus biodegradace ovlivňují jak chemické, tak fyzikální vlastnosti plastů a hrají důležitou roli v biodegradačních procesech. Jsou to povrchové vlastnosti (plocha povrchu, hydrofilní/hydrofobní vlastnosti), chemická struktura polymeru, molekulová hmotnost a její distribuce, teplota skelného přechodu, teplota tání, modul pružnosti, krystalinita a krystalická struktura [95]. Velký vliv na tvorbu biofilmu na povrchu částic mikroplastů mají i podmínky prostředí, a to zejména ve sladkovodním a mořském ekosystému. Tvorbu biofilmu přímo ovlivňuje pH, koncentrace živin, salinita, ale i roční období, a tedy teplota, a nakonec UV záření [58].

5. Stanovení mikroplastů

V prostředí lze sledovat různé typy mikroplastů, proto jsou vyvíjeny kvantitativní a kvalitativní metody pro jejich stanovení. Díky nim je pak možné posoudit míru kontaminace různých lokalit mikroplasty, případně určit schopnost mikroplasty zadržet [96, 97]. Analýza mikroplastů ve vzorcích pocházejících ze životního prostředí, jako je voda, sedimenty, půda, ale i biologické tkáně, je spojena s celou řadou problémů [98].

Již během odběru vzorků je důležité identifikovat potenciální zdroje kontaminace a případně tak zajistit jejich odstranění. Následně jsou v případě kapalných vzorků mikroplasty často odděleny flotací, hustotní separací nebo filtrací [99]. Půdní vzorky jsou nejprve vysušeny a přesítovány (doporučená velikost ok je 5 mm) a následně je provedena izolace mikroplastů

z půdní matrice, a to obvykle za použití hustotní separace [98, 100]. Organické sloučeniny, které by mohly být přítomny ve vzorku a potenciálně narušovat stanovení mikroplastů lze odstranit jejich rozkladem. U konvenčních plastů lze díky jejich odolnosti použít silná oxidační činidla, nejčastěji peroxid vodíku [101], rovněž lze použít enzymatickou degradaci [35].

Následně je třeba vzorky identifikovat a kvantifikovat. Zásadním krokem, kterým lze přímo a rychle zjistit povrchovou strukturu, je vizuální identifikace. Mikroplasty je pak možné klasifikovat podle jejich charakteristik jako je velikost, tvar a barva. Lze je tak třídit do velikostních skupin, ale i kategorií dle tvaru – vlákna, fragmenty, kuličky, pěna a film [101]. Použití mikroskopie je jednoduché, rychlé a levné, nevýhodou je velká chybovost – falešně pozitivní a negativní výsledky analýz [102]. Vizuální detekce je tedy nepřesná a měla by být kombinována s jinými metodami. Již pouze kombinací se spektrofotometrickými metodami (FTIR a Ramanova spektroskopie) je možné definitivně potvrdit přítomnost a identitu částic a jejich polymerní typ. FTIR je možné použít pro částice <10 μm , pro částice <1 μm se pak používá Ramanova spektroskopie, která je ale vhodná pouze pro materiály odolávající fotodegradaci, např. PVC [98]. Hlavní nevýhodou těchto technik je jejich časová náročnost, malá reprezentativnost, robustnost a nezbytná příprava vzorku. Zpřesnění analýzy je možné dosáhnout využitím elektronového mikroskopu [98, 103].

Stále častěji jsou využívány destruktivní analytické metody založené na pyrolýze vzorku. Ty mají potenciál překonat nevýhody mikroskopických metod, a to jak při přípravě vzorku, tak v umožnění semi-quantitativních až kvantitativních analýz [104]. Dobře zavedenou metodou pro stanovení mikroplastů je pyrolýzní plynová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí (Py-GC-MS) [103]. Tato technika eliminuje potřebu předpřípravy vzorku, protože zkoumá přímo vzorek pevného polymeru a lze ji použít k současné identifikaci typů polymerů včetně jejich organických přísad [98]. Další vhodnou analytickou metodou ke stanovení mikroplastů ve vzorcích půdy je termogravimetrie (TG) [104].

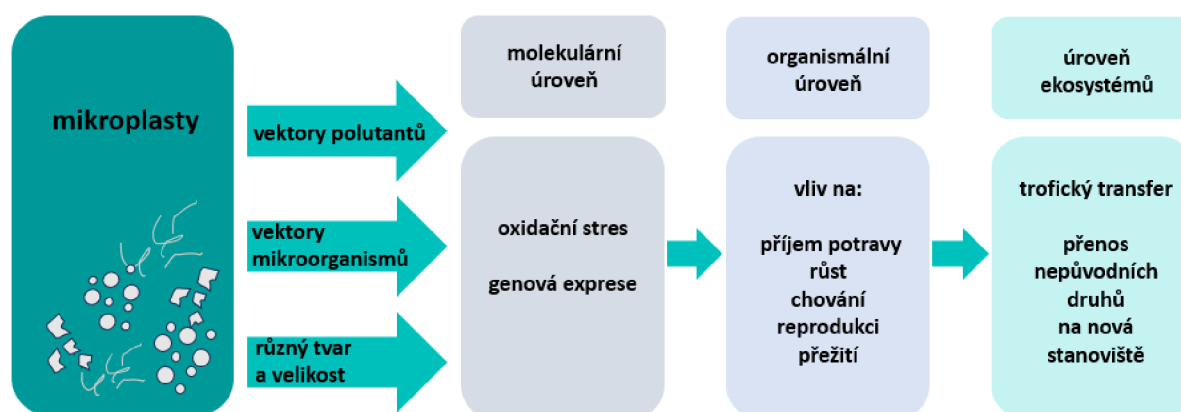
Rovněž jsou vyvíjeny metody pro kvalitativní a kvantitativní analýzu částic biodegradabilních polymerů, které mohou být kvůli své pomalé a nedokonalé degradaci také zdrojem velkého množství mikroplastů v životním prostředí. Je známa metoda založená na propanolytické a hydrolytické depolymeraci plastového materiálu a stanovení vzniklých produktů pomocí iontové chromatografie, využívá se pro stanovení P3HB a polyhydroxyvalerátu (PHV) v aktivovaném kalu [105]. Pro stanovení PLA byla vyvinuta metoda využívající Py-GC-MS [106].

Problematická je i analýza mikroplastů požitých drobnými živými organismy jako je zooplankton, a to jednak kvůli nízké koncentraci, tak velikosti částic [107, 108]. Metody používané pro kvantifikaci mikroplastů zahrnují fluorescenční značení mikroplastů kombinované se spektrofotometrickými technikami [107, 109, 110], stereo-mikroskopické techniky [111–121], stanovení objemové koncentrace částic pomocí analyzátorů velikosti částic [122], gravimetrické metody [121], vyšetření obsahu střev organismů [116, 123], nebo Py-GC-MS [124]. Mnohé z těchto metod však mohou mít významná omezení – např. fluorescenční značení může vést k vymývání barviva v tělech organismů. Tento fakt může vést k falešně pozitivním výsledkům. Při vizuální kontrole mohou být některé částice přehlédnuty a při použití metod digesce k získání mikroplastů ze střev, případně při rozkladu

celých organismů může potenciálně docházet ke ztrátě části mikroplastů, a to zejména u méně odolných biodegradabilních mikroplastů [118, 125].

6. Vliv mikroplastů na akvatické organismy

Mikroplasty mohou mít velmi odlišné typy účinků na složky životního prostředí (**Obrázek 9**). Účinky na vodní organismy jsou pozorovatelné při vysokých koncentracích mikroplastů v akvatickém ekosystému. Malé rozměry částic umožňují jejich požití živými organismy a tím jejich akumulaci v potravním řetězci. Požití mikroplastů organismy vede k omezení příjmu potravy a následně ke snížení energetických zásob, čímž jsou ovlivněny i další fyziologické funkce [33, 126]. Množství mořských živočichů žije přisedle na úlomcích plastů – mikroorganismy, ale i větší organismy kolonizují povrch plastových úlomků. Tyto organismy mohou být spolu s plasty přenášeny na velké vzdálenosti do nepůvodních stanovišť [33]. Ačkoli většina studií byla doposud zaměřena především na ekologický problém kontaminace mořských ekosystémů plasty, některé nedávné výzkumy zdůraznily, že jsou stejně závažným environmentálním rizikem i pro sladkovodní ekosystémy [127].



Obrázek 9: Vliv mikroplastů na vodní biotu. Převzato a upraveno dle [59].

Vzhledem ke svým vlastnostem jsou mikroplasty schopné adsorbovat hydrofobní látky, jako jsou perzistentní organické polutanty, přítomné ve vodním prostředí. Ty pak mohou být spolu s částicemi mikroplastů přenášeny na dlouhé vzdálenosti. Takto zprostředkovaný transport tak může zvýšit mobilitu těchto látek [128, 129]. Vzhledem k tomu, že koncentrace polutantů nasorbovaných na částicích mikroplastů může být o několik řádů vyšší než v okolní vodě a že mikroplasty jsou přijímány širokou škálou organismů, může docházet i ke zvýšenému příjmu těchto polutantů vodními organismy [130]. Následně může v tělech organismů docházet k uvolňování nejenom těchto látek, ale i chemických aditiv přidávaných ke zlepšení vlastností plastů (plastifikátory, retardéry hoření, tepelné stabilizátory, aj.). Mimo potenciálních fyzických dopadů po požití mikroplastů tak může docházet i k nepříznivým účinkům na zdraví organismů [126, 131]. Ekotoxikologické studie zabývající se mikroplasty se proto zaměřují na dva typy látek – na chemické látky samotného polymeru a jeho přísad, a na chemické látky nasorbované na povrchu mikroplastů z okolního prostředí (polychlorované bifenyly, kovy, aj.). Tyto látky mohou být toxické, mutagenní, nebo působit jako endokrinní disruptory [132].

Většina zájmu o mikroplasty a jejich vliv na vodní společenstva se soustředila především na živé organismy. Rostlinné organismy byly do značné míry zanedbávány, i když hrají v ekosystémech ústřední roli, a to jak troficky, strukturně, tak funkčně [133, 134]. Mimo to rostliny, jakožto organismy na rozhraní mezi abiotickými a biotickými složkami ekosystému, přebírají důležitou roli systémů včasného varování. Tyto systémy jsou nezbytné pro včasné zachycení kontaminace s potenciálem omezit tak biomagnifikační procesy jak v potravním řetězci, tak v životním prostředí [135]. Ceschin a kol. [127] uvádí, že hlavními fytotoxickými účinky mikroplastů jsou inhibice fotosyntézy, omezení růstu výhonků a kořenů a rovněž respiračních aktivit. K tomu pravděpodobně dochází kvůli adsorpci mikroplastů na površích rostlin a tím tvorbě fyzické blokády pro světlo a vzduch.

Mikroplasty s nízkou hustotou jsou distribuovány v horních vrstvách pomalu tekoucích vod, kde se často setkávají s pleustofyty, vodními rostlinami volně plovoucími na hladině, které mají kořeny a spodní plochu v přímém kontaktu s vodou. Velmi rozšířenými pleustofyty jsou okřehky (*Lemnaceae*), které, i když se vyznačují velmi drobnou vegetativní částí, jsou schopny vytvořit plovoucí rostlinný povrch, který může snadno zachytit plastové částice v pomalu tekoucí vodě jezer, rybníků, menších vodních nádrží, kanálů, ale i řek [127, 136]. Vzhledem k tomuto faktu by mohly být tyto rostliny použity pro odstraňování plastů z vodního prostředí fytostabilizací. Ta zahrnuje stabilizaci a vazbu kontaminantu adsorpcí na listy a kořeny, čímž se sníží jeho disperze ve vodě. Může to být způsobeno elektrostatickými silami celulózových složek rostlinných buněk, které mohou přitahovat mikroplasty a jejich adsorpce je usnadněna drsností rostlinných povrchů, které poskytují mnoho míst pro plastové částice. Důležitou roli může hrát i povrchová morfologie rostlin – u řas platí, že čím složitější je povrchová struktura stélky, tím větší je jejich schopnost zachytit mikroplasty [127, 137].

První studii, která se zabývala účinky mikroplastů přítomných v akvatickém ekosystému na biotu, provedl roku 2008 Brown a kol. [138]. Zabývali se translokací částic mikroplastů ze střev do oběhového systému organismu mlže *Mytilus edulis* (Slávka jedlá). Počet provedených studií roste od roku 2012, nejčastěji jsou zaměřeny na mořské živočichy, a to od drobných korýšů, přes ryby až po savce a ptáky. Biotesty se sladkovodními organismy využívají především drobné korýše (*Daphnia magna*) a ryby (*Danio rerio*). Sledovány jsou různé ekotoxikologické efekty, jako je mortalita, vliv na reprodukci, neurotoxické účinky, biotransformace enzymů, genotoxicita, fyzické změny, změny v chování, oxidační stres nebo cytotoxicita [139].

Vlivem PE a PET mikroplastů připravených ze čtyř komerčních produktů se zabývali Kokalj a kol. [112]. Organismy *D. magna* a *Artemia franciscana* byly exponovány částicím o velikosti 0,02 až 200 μm v koncentraci 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Ve všech případech byly částice mikroplastů nalezeny ve vnitřnostech testovacích organismů. Zatímco u organismu *D. magna* nebyly pozorovány žádné akutní účinky, u *A. franciscana* došlo k inhibici růstu. Akutním vlivem PET mikrovláken v koncentračním rozmezí 12,5 až 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ na korýše *D. magna* se zabývali i Jemec a kol. [116]. Mortalitu pozorovali pouze v případě, kdy nebyly organismy před testem nakrmeny. Nicméně výsledky jejich pozorování ukázaly, že organismy *D. magna* byly schopny požít nejen krátká vlákna o délce 300 μm , ale i ta velmi dlouhá (1 400 μm). Akutní vliv sekundárních PET mikroplastů o velikosti $<53 \mu\text{m}$ nezaznamenali ani de Castro a kol. [140], nicméně během

chronického testu pozorovali snížení a zpoždění reprodukce, mikroplasty rovněž přilnuly k tělesným schránkám organismu *Daphnia similis*, což způsobilo změny v jejich chování.

Rehse a kol. [141] se zabývali vlivem PE mikročástic ve dvou velikostních frakcích 1 až 4 μm a 90 až 106 μm a šesti koncentracích v rozmezí 12,5 až 400 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ na organismus *D. magna*. Po 96hodinové expozici pozorovali u menších částic nárůst imobilizace organismů se zvyšující se dávkou a časem, větší částice nemohly být organismem požity, a pravděpodobně proto nevyvolaly žádné pozorovatelné účinky. Vlivem požití PE mikročástic (63 až 75 μm , 25 až 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) na organismus *D. magna* se zabývali i Caniff a kol. [113]. Nepozorovali žádný významný účinek na přežití a reprodukci. Navíc se zabývali i vlivem těchto částic na růst řasy *Raphidocelis subcapitatus*, během 5denního testu zjistili, že přítomnost PE částic o koncentraci 130 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ v médiu vedla ke stimulaci růstu řasy.

Účinkem PE mikroplastů o velikosti 1 až 10 μm na 3 různé druhy perlooček (*D. magna*, *Daphnia pulex* a *Ceriodaphnia dubia*) se zabývali Jaikumar a kol. [142]. Provedli prodloužený akutní test (72 a 96 h) a sledovali i vliv teploty (18, 22 a 26 °C) jako dalšího možného stresoru. U druhů *D. magna* a *D. pulex* citlivost organismů s teplotou prudce vzrostla a mikroplasty měly pro oba druhy podobný účinek na mortalitu, u *C. dubia* byla reakce stabilní napříč teplotami, ale mikroplasty pro ně byly toxičtější. Mortalita byla silně závislá na čase a vzrostla po 48hodinové expozici. Následně provedli se stejnými druhy korýšů i studii porovnávající chronické účinky těchto mikroplastů. Výsledky ukázaly inhibici reprodukce všech sledovaných druhů v závislosti na dávce. Citlivost druhů rostla se zmenšující se velikostí těla – *C. dubia* byl nejcitlivějším druhem, *D. magna* pak nejméně citlivým druhem [143].

Akutní a chronický vliv PS mikročástic o velikosti 6 μm na různě staré organismy sledovali Eltemsah a Bøhn [144]. Organismy mladší 24 h a dospělé jedince ve věku 9 dní druhu *D. magna* vystavili PS mikrokuličkám v koncentracích 5 až 300 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Během 48 h nebyla pozorována akutní toxicita, avšak do 120 h došlo ke zvýšení mortality, přičemž mladší organismy byly cca o 50 % citlivější. Chronický test byl proveden v koncentračním rozmezí 5 až 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. I v tomto případě byly mladší organismy citlivější – došlo k mírnému zvýšení mortality oproti kontrole, snížení růstu a ovlivnění reprodukce. Devítidenní organismy nevykazovaly zvýšenou mortalitu a byla u nich pozorována stimulace reprodukce oproti kontrole, s rostoucí koncentrací mikroplastů klesala rychlost růstu a velikost těl potomků.

Účinkem PS mikročástic na organismus *D. magna* se zabývala i práce De Felice a kol. [114], ve které byly použity částice o velikosti 1 a 10 μm v koncentracích 0,125 až 12,5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. U obou velikostí ve všech koncentracích byl pozorován výskyt částic PS v zažívacím traktu testovacích organismů, a to i po 96 h od konce testu, kdy byly organismy umístěny v čistém médiu. V nejvyšší koncentraci byla zaznamenána stimulace růstu, zvýšení plavecké aktivity a změny ve fototaktickém chování. Rovněž došlo ke zvýšení reprodukční aktivity. Změnu v plavecké aktivitě lze vnímat jako snahu organismu odplavat z kontaminovaného prostředí, případně jako pokus zbavit se nežádoucích částic, stimulaci reprodukční aktivity je pak možné vyložit jako úsilí organismů v nepříznivém a znečištěném prostředí investovat zbylou energii namísto do přežití, do zachování rodu. Byly tak ovlivněny vlastnosti a chování korýše *D. magna*, které mohou potenciálně vést k negativním dopadům na populační dynamiku tohoto zooplanktonického druhu.

PS mikročásticím o velikosti 1 až 5 μm vystavil organismus *D. magna* i Bosker a kol. [145], 10denní jedince umístil po 10 organismech do čistého média. Rozvinutou populaci po 30 dnech exponoval po dobu 21 dní mikroplastům. Pozoroval výrazné nepříznivé účinky na populaci, tj. snížení počtu jedinců i jejich celkové biomasy. Tento fakt může, vzhledem k významu organismu *D. magna* v potravním řetězci, mít dopad na fungování sladkovodního ekosystému.

Martins a Guilhermino [146] provedly studii transgeneračních účinků částic mikroplastů o velikosti 1 až 5 μm na 4 generace organismu *D. magna*. Monitorována byla mortalita mateřských organismů, jejich růst a reprodukce, včetně rychlosti růstu populace. Koncentrace 0,1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ vedla k 10 až 100% mortalitě, u dalších sledovaných parametrů došlo k jejich významnému zhoršení napříč jednotlivými generacemi. Výsledky této studie naznačují, že zotavení organismu *D. magna* z chronické expozice částicím mikroplastů může trvat několik generací a že nepřetržitá expozice po celé generace může vést až k vyhynutí populace.

Účinky nebiodegradabilních PE a PS srovnali s účinky biodegradabilního polyhydroxybutyrátu (blíže nespecifikováno) v ekologicky relevantních koncentracích Zebrowski a kol. [147]. Sledovali vliv těchto polymerů ve formě mikročástic o velikosti 23 až 27 μm na tři různé dvojice blízce příbuzných planktonních druhů rodu *Daphnia*: *D. pulex* a *D. magna*, *D. magna* a *Daphnia galeata*, *D. pulex* a *D. galeata*. Výsledky ukázaly, že každý typ mikroplastu má jiný vliv na populaci daného druhu; v přítomnosti PE a PS došlo ke snížení počtu jedinců odolnějšího druhu v každé ze tří dvojic, což bylo alespoň částečně způsobeno mortalitou mateřských organismů, nikoliv reprodukční aktivity. V přítomnosti polyhydroxybutyrátu došlo ke zvýšení hustoty populace organismu *D. magna* na úkor ostatních druhů. Přítomnost mikroplastů rovněž ovlivnila rychlost eliminace podřadného druhu. Výsledky tedy naznačují, že dlouhodobá expozice ekologicky relevantním koncentracím jak biodegradabilních, tak nebiodegradabilních mikroplastů může ovlivnit hustotu populace spolu s druhovým zastoupením ve společenstvech zooplanktonu, a tím i fungování vodních ekosystémů.

Subletální efekt a vliv na příjem potravy organismu *D. magna* v přítomnosti mikročástic polyhydroxybutyrátu a PLA, ale i konvenčních plastů sledovali Savva a kol. [148]. Organismy mladší 24 h byly vystaveny jak samotným mikročásticím, tak i jejich výluhům. Výsledky ukázaly, že negativní účinky samotných biodegradabilních mikročástic byly 5krát vyšší než účinky vyvolané jejich výluhem. Zároveň byl jejich účinek byl výraznější než u konvenčních mikroplastů. Chronickým účinkem PLA, PVC a polyuretanu (PUR) v porovnání s přírodním kaolinem na organismus *D. magna* se zabývala studie autorů Zimmermann a kol. [149]. Použity byly částice menší než 59 μm v koncentracích 10 až 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Ze studie vyplývá, že všechny 3 typy mikroplastů negativně ovlivnily testovací organismy, přičemž největší vliv na reprodukci byl zaznamenán u PVC, nejvyšší mortalitu pak způsobovala přítomnost PLA. Ze studie tedy vyplývá, že bioplasty a biodegradabilní plasty tak mohou vyvolat negativní účinky jako konvenční materiály.

Studie zabývající se účinky mikroplastů na sladkovodní rostliny jsou stále vzácné a týkají se velmi malého počtu druhů, jsou to např. mikrořasy rodu *Scenedesmus* a *Chlorella* a některé rostliny jako je *Lemna minor* a *Myriophyllum spicatum*. Některé z těchto studií však ukazují,

že obecně jsou rostliny ovlivněny pouze tehdy, jsou-li koncentrace mikroplastů vyšší, než je v životním prostředí běžné [127].

Vlivem PS mikroplastů na sladkovodní řasu *Chlorella pyrenoidosa* se zabývali Mao a kol. [150]. Sledovali účinky částic o velikosti 0,1 a 1 μm v koncentracích 10 až 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 30 dní. Od počátku expozice do rané exponenciální fáze růstu pozoroval nepříznivé účinky závislé na dávce: inhibice růstu, snížení fotosyntetické aktivity a fyzické poškození buněčných struktur. Mechanismy účinků lze připsat fyzickému poškození a oxidačnímu stresu. Po adaptaci řas na prostředí, během konce exponenciální fáze růstu a stacionární fáze, došlo ke stimulaci růstu, zvýšení fotosyntetické aktivity a uzdravení buněčných struktur. Wu a kol. [151] se zabývali vlivem PP a PVC mikročástic na fotosyntetický systém řasy *Ch. pyrenoidosa* a sinice *Microcystis flos-aquae*. V nižších koncentracích (5 až 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) došlo ke zvýšení fotosyntetické aktivity vlivem snahy organismů odolávat stresu, ve vyšších koncentracích (50 až 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) byl pozorován negativní účinek. Řasu *Chlorella vulgaris* vystavili PS mikroplastům o velikosti 0,5 μm Tunali a kol. [152], u vyšších koncentrací (50 až 1 000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) pozorovali významnou inhibici růstu a snížení obsahu chlorofylu *a*. Míra inhibice s časem klesala. Studie zaměřené na řasu *Chlamidomonas reinhardtii* ukazují, že PS a PVC mikročástice mohou negativně ovlivnit nejen růst, ale i koncentraci chlorofylu *a* [153, 154].

Vlivem mikrokuliček PE z kosmetických produktů v koncentracích 10 až 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ na sladkovodní rostlinu *L. minor* se zabývala práce Kalčíkové a kol. [136]. Specifická rychlost růstu ani obsah chlorofylu *a* a *b* nebyly po 7denním experimentu ovlivněny. Mechanické blokování ale ovlivnilo rychlost růstu kořenů a ostré částice zapříčinily snížení viability kořenových buněk. Stejného výsledku po expozici rostliny *L. minor* PE mikročásticím dosáhli i Mateos-Cárdenas a kol. [155], navíc uvádí, že PE mikroplasty se mohou adsorbovat na povrchu rostliny. Uvedené výsledky potvrzuje u různých typů mikroplastů i práce Rozman a kol. [156]. Ve své další práci Rozman a kol. [157] rovněž zmiňuje, že k negativnímu vlivu na specifickou rychlost růstu, obsah chlorofylu, celkovou antioxidační kapacitu (TAC), aktivitu elektronového transportního řetězce (ETS) a obsah energeticky bohatých molekul nedošlo ani po 12týdenní expozici rostliny *L. minor* PE mikroplastům.

CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Jak vyplývá z předcházejících částí, v současnosti roste zájem odborné i laické veřejnosti o poznatky týkající se vlivu mikroplastů, ať už konvenčních nebo biodegradabilních, na životní prostředí a na živé organismy. Je tomu tak proto, že plasty stále více kontaminují životní prostředí, v němž mohou degradovat a fragmentovat na malé částice. Jak bylo již také zmíněno, mikroplasty mohou vznikat i používáním biodegradabilních plastů, které jsou považovány za ekologičtější variantu oproti konvenčním plastům. Vznik mikroplastů je v tomto případě především důsledkem nedokonalého nebo zpomaleného rozkladu, a to především v situaci, kdy není dosaženo optimálních podmínek pro biodegradaci. Studie zabývající se problematikou mikroplastů z biodegradabilních plastů prozatím nepřinesly jednoznačné odpovědi týkající se jejich možného vlivu na živé organismy. Navíc, stávající studie se ve větší míře zaměřují na akutní účinky. Autoři prací došli ve většině případů k závěrům, že mikroplasty nemají žádný, nebo jen velmi malý akutní dopad na testovací organismy. Proto je pro posouzení dopadů na ekosystémy nezbytné se zaměřit na chronické, případně pak multigenerační testy. Rovněž je také důležité se nezabývat pouze běžně sledovanými parametry, jako je mortalita, inhibice, rychlost růstu nebo reprodukční schopnosti testovacích organismů, ale zaměřit se i na další ekotoxikologické ukazatele, poukazující na efekty na suborganismální úrovni jako jsou např. biomarkery oxidačního stresu.

Studii zabývající se chronickým vlivem mikroplastů, a to jak konvenčních, tak biodegradabilních, je tedy zatím velmi málo na to, aby šlo dělat jakékoliv závěry o jejich vlivu na živé organismy z dlouhodobé perspektivy. Jestliže náhrada konvenčních plastů biodegradabilními povede k rychlejšímu vzniku mikroplastů, jak předpovídají někteří autoři [80, 158], je velmi důležité zabývat se potenciálními vlivy biodegradabilních mikroplastů na všechny složky životního prostředí.

Tato práce se snaží přispět k pochopení výše zmíněných problémů. Z těchto důvodů byly pro všechny experimenty uvedené v této disertační práci zvoleny mikroplasty na bázi P3HB, tj. biodegradabilní plast, který si získává stále větší pozornost a popularitu. V některých experimentech byl pro srovnání použit také konvenční PET, jako zástupce nebiodegradovatelných polyesterů. V práci byl sledován vliv těchto mikroplastů na vybrané organismy sladkovodního ekosystému z řad producentů a konzumentů – řase *Desmodesmus subspicatus*, rostlině *Lemna minor* a korýši *Daphnia magna*. Výchozími metodikami pro tuto práci byly odpovídající normy využívané ke stanovení ekotoxicity pomocí příslušných biotestů (OECD). Za statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolou považujeme ty, u kterých p-hodnota při použití Dunnetova testu byla menší 0,05. Další kapitolou práce jsou pak vybrané analytické metody vhodné ke stanovení množství mikroplastů požitých živými organismy.

Z výše uvedeného textu a literární rešerše tedy vyplývají dílčí výzkumné otázky:

- **O1:** Vyvolá přítomnost biodegradabilních mikroplastů P3HB negativní efekt u sladkovodní rostliny *L. minor*?
- **O2:** Bude v přítomnosti P3HB mikroplastů pozorován vliv na růst řasy *D. subspicatus*?
- **O3:** Je možné stanovit mikroplasty požitými drobnými planktonními organismy bez jejich extrakce případně digesce organismu?

- **O4:** Ovlivní přítomnost P3HB mikroplastů negativně organismus *D. magna*?

V následujících kapitolách jsou diskutovány výsledky dosažené během doktorského studia autorky této práce. Část výsledků již byla publikována, část bude publikována v nejbližší době (viz přílohy na konci této práce) a část dosažených výsledků nelze pro publikaci použít ale jsou zde uvedeny pro podporu některých tvrzení. Účelem následujícího textu je informovat čtenáře o výsledcích disertační práce a zároveň představit myšlenkové postupy, získané zkušenosti a různé přístupy, které byly zkoumány.

Přesto, že experimenty byly prováděny výhradně autorkou disertační práce, následující text je psán v plurálu. Je tomu tak proto, že některé uváděné myšlenky a závěry jsou výsledkem společné diskuse více autorů a konkrétního autora je tak někdy těžké určit.

DISKUZE VÝZKUMNÝCH OTÁZEK

1 Výzkumná otázka 1: Vyvolá přítomnost biodegradabilních mikroplastů P3HB negativní efekt u sladkovodní rostliny *L. minor*?

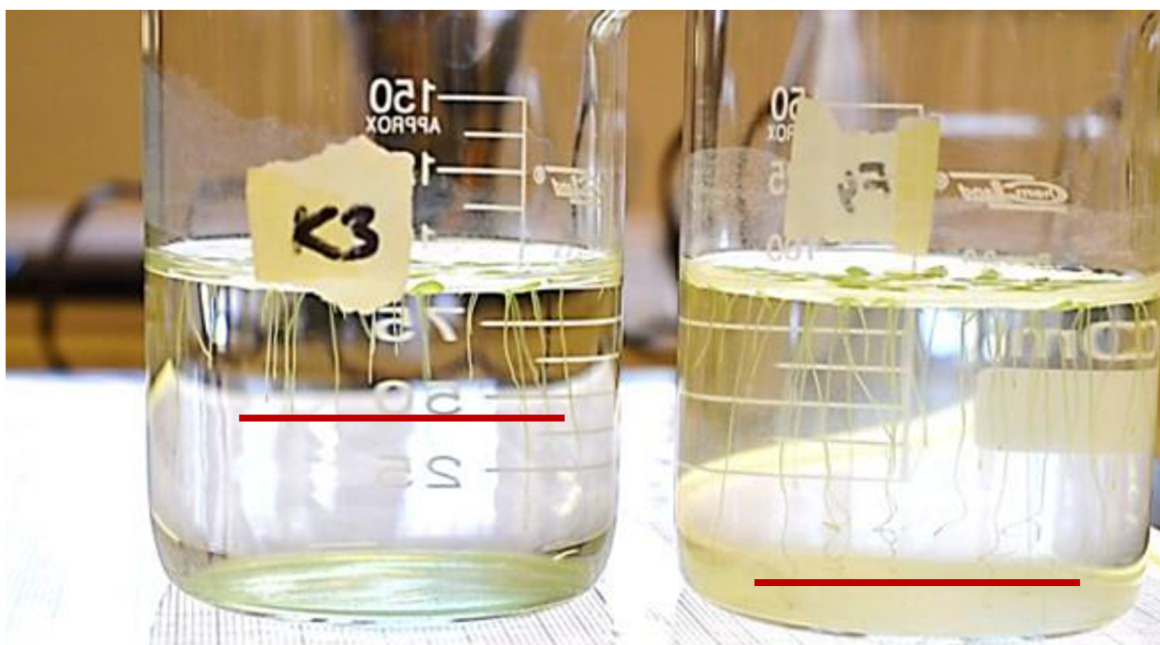
Možný negativní efekt mikroplastů P3HB na sladkovodní rostlinu *L. minor*, jakožto zástupce producentů sladkovodního ekosystému, byl sledován prostřednictvím ekotoxikologických experimentů na základě literární rešerše (viz výše) a běžně používané normy pro testování vlivu chemických látek na tuto rostlinu OECD No. 221 [159]. Předchozí studie uvádí, že přítomnost konvenčních mikroplastů může ovlivnit růst a vývoj rostlin z čeledi *Lemnaceae* [127, 160]. Rovněž uvádí, že přírodní materiály jako např. mikročástice dřeva nebo celulózy nemají na rostlinu *L. minor* žádný vliv [161]. Z toho tedy vyplývá, že nejprve byly prováděny akutní testy z jejichž výsledků pak vyvstaly další otázky a hypotézy, a ty byly dále ověřovány.

Jak je uvedeno v **Příloze A**, části **2.1 Příprava mikroplastů**, byly P3HB mikroplasty nejprve za mokra přesítovány na ocelových sítích o velikosti ok 63 a 125 μm a následně byly obě velikostní frakce (mikroplasty $<63 \mu\text{m}$ a 63 až 125 μm) sušeny za laboratorní teploty v digestoři. Důležité je zmínit, že (jak je uvedeno v **Příloze A, Obrázek S1 a S2, Supporting information**) výše zmíněná velikost částic neodpovídá přesně velikostem $<63 \mu\text{m}$ a 63 až 125 μm . Je tomu tak proto, že částice mikroplastů nebyly před sítováním odděleny, jako tomu bylo dále při přípravě suspenzí (**Příloha A, část 2.2 Design experimentu**). V následujícím textu jsou nicméně velikostní frakce P3HB mikroplastů označovány jako částice $<63 \mu\text{m}$ a částice $<125 \mu\text{m}$, a to kvůli jednodušší a přehlednější orientaci.

Studium krátkodobého vlivu mikroplastů P3HB na rostlinu *L. minor*

Vzhledem k tomu, že zatím nebyl publikován žádný standardizovaný nebo závazný postup pro testování ekotoxicity mikroplastů, využili jsme několik „tradičních“ přístupů pro expozici rostliny *L. minor* mikroplastům P3HB: tj. sledovali jsme vliv (i) suspenze mikroplastů P3HB (bez výměny po celou dobu testu), (ii) s výměnou suspenze během testu podle Li a kol. [162], (iii) výluhu z mikroplastů P3HB a (iv) metodou přímého navážení mikroplastů P3HB do testovací nádoby (kvůli povrchovému napětí zůstaly některé nedostatečně smáčené částice P3HB plavat na hladině). Přesné postupy jsou popsány v **Příloze A, část 2.2 Design experimentu**, zde jsou uvedeny pouze ve zkratce: na základě výše uvedené normy OECD No. 221 [159] probíhaly experimenty za kontrolovaných podmínek (teplota $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperioda 16:8 světlo:tma, světelná intenzita 4200 lx) po dobu 7 dní. Sledován byl vliv dvou velikostních frakcí P3HB, a to částic $<63 \mu\text{m}$ a částic $<125 \mu\text{m}$ v koncentracích 0, 10, 50 a 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ v suspenzi/výluhu na specifickou rychlost růstu, obsah fotosyntetických pigmentů a délku kořene rostliny *L. minor*. Abychom zjistili, zda nějaký efekt nemá i samotná biodegradace P3HB, byly výsledky porovnávány s efektem vyvolaným přítomností PET mikroplastů o stejné velikosti a ve stejných koncentracích, v tomto případě byla ale testována pouze suspenze. Důvodem pro použití PET mikroplastů byly jednak podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako má P3HB (hustota, smáčivost) a také to, že se jedná o materiál ze skupiny polyesterů.

Získané výsledky ukázaly, že specifická rychlost růstu byla negativně ovlivněna pouze při testu s výluhem připraveným z mikroplastů P3HB, tj. ve variantě (iii). Tento efekt byl navíc závislý na koncentraci P3HB ve výluhu: výluh připravený z mikroplastů P3HB v koncentracích 10, 50 a 100 mg·l⁻¹ způsobil inhibici růstu 4,7 %, 4,0 % a 16,0 % u částic <63 μm a 2,8 %, 7,6 % a 17,7 % pro částice <125 μm. Ke statisticky významné inhibici tedy docházelo pouze v nejvyšších koncentracích (**Příloha A, Obrázek 1**). Rovněž nebyl v žádném případě pozorován negativní vliv na obsah zkoumaných fotosyntetických pigmentů (chlorofyly, karotenoidy) v listech rostliny *L. minor* ve srovnání s kontrolou (**Příloha A, Obrázek 2 a 3**). Předpokládáme, že zanedbatelný vliv přítomnosti suspenzí mikroplastů P3HB na růst rostliny *L. minor* a obsah fotosyntetických pigmentů v listech může být způsoben omezeným kontaktem částic s rostlinou. Protože P3HB má hustotu vyšší, než je hustota vody (přibližně 1,23 g·cm⁻³) [61], klesá rychle ke dnu a zanechává rostlině dostatek plochy potřebné pro růst. Z výsledků testu tedy vyplývá, že nebyl pozorován žádný významný negativní efekt přítomnosti mikroplastů P3HB na rostlinu *L. minor* během akutních testů.



Obrázek 10: Porovnání délky kořenů rostliny *L. minor* po 7denní expozici mikroplastů P3HB <63 μm, vpravo kontrolní ošetření, vlevo nejvyšší testovaná koncentrace (100 mg·l⁻¹). Vlastní fotografie.

Nicméně, bylo pozorováno, že přítomnost mikroplastů P3HB ovlivnila růst kořene ve smyslu prodloužení jeho délky v porovnání s kontrolou (**Obrázek 10**). Tento efekt byl závislý na koncentraci mikroplastů P3HB, tj. s rostoucí koncentrací se prodlužovala délka kořene. Efekt byl statisticky významný téměř u všech variant a u obou velikostních frakcí mikroplastů P3HB (**Příloha A, Obrázek 4**). Naproti tomu, u PET mikroplastů docházelo ke statisticky významné stimulaci růstu kořene pouze v nejvyšší koncentraci (100 mg·l⁻¹, **Příloha A, Obrázek 4**). Z literární rešerše vyplývá, že rostou-li rostliny v prostředí s nedostatkem živin (především dusíku), růst jejich kořenů se paradoxně zrychluje a může docházet i k rozšíření větvení postranních kořenů; vše se dá popsat jako snaha rostliny zvýšit absorpční kapacitu kořenového systému [163]. Naše pozorování jsou v souladu s poznatky autorů Cedergreena a Madsena [164], kteří uvádí, že vysoké koncentrace živin v médiu vedou ke zkrácení, ale i k úplné absenci

kořene rostliny *L. minor*, zatímco nízké koncentrace živin a stopových prvků způsobují jeho prodlužování. Vzhledem k tomu, že *L. minor* je rostlinou bez postranních kořenů, ale pouze s jedním hlavním kořenem, jeho prodloužení je tedy jediným způsobem, jak zvětšit jeho absorpční kapacitu. Výše uvedené informace nás vedly ke dvěma možným závěrům, které by mohly vysvětlit příčiny vyčerpání živin v médiu a s ním spojeným prodlužováním kořene rostliny *L. minor*. Domníváme se, že to mohlo být způsobeno buď 1) v důsledku sorpce živin na mikroplasty P3HB a jejich nedostupností pro rostlinu, jak uvádí He a kol. [165], nebo 2) tvorbou biofilmu na povrchu biodegradabilního polymeru, a tedy konkurenčním využíváním živin mikroorganismy.

V návaznosti na hypotézu 1) jsme provedli sorpční experimenty, jejichž postup je podrobně popsán v **Příloze A**, části **2.5 Sorpční experiment**. Ve zkratce, obě velikostní frakce mikroplastů P3HB a PET byly připraveny ve stejných koncentracích a vystaveny stejným podmínkám jako při testu s rostlinou *L. minor* viz **Příloha A**, část **2.2 Design experimentu**. V čase 0, 24 a 168 h byly odebrány vzorky suspenze, ve kterých byl po filtraci spektrofotometricky stanoven obsah dusičnanového dusíku. Bylo zjištěno (viz **Příloha A**, **Obrázek S5, Supporting Information**), že mikroplasty P3HB byly schopné adsorbovat více N-NO_3^- než PET mikroplasty, což je v souladu s faktem, že významné prodlužování délky kořene rostliny *L. minor* bylo pozorováno ve všech testovaných koncentracích P3HB. Naproti tomu, PET mikroplasty způsobily statisticky významné prodloužení délky kořene pouze v nejvyšší koncentraci. Hypotézu 2), která bere v potaz rozvoj biofilmu na povrchu mikroplastů, jsme ověřili vizuálně. Dokladem je, mimo jiné, i fotografie částic mikroplastů P3HB a PET o velikosti $<63 \mu\text{m}$ na začátku a na konci testu s rostlinou *L. minor* (viz **Příloha A**, **Obrázek 5**). Pozorovali jsme, že rozvoj biofilmu probíhá ve větší míře a zastoupení mikroorganismů je rozmanitější na mikroplastech P3HB.

Adsorpce živin i rozvoj biofilmu tedy probíhaly u obou typů mikroplastů odlišně, a to navzdory podobné smáčivosti P3HB a PET [166] a srovnatelné velikosti částic. Důvodem pozorované větší a rychlejší tvorby biofilmu na mikroplastech P3HB může být skutečnost, že P3HB je (snadno) biodegradabilní plast a představuje zdroj uhlíku pro celou řadu mikroorganismů [167]. Dostupná literatura týkající se tvorby biofilmu na biodegradabilních plastech poukazuje mimo jiné na fakt, že růst biofilmu lze pozorovat již během několika hodin až dní a jeho přítomnost může výrazně měnit některé vlastnosti mikroplastů, přičemž v některých případech může dokonce zvýšit jejich environmentální rizika a ekotoxicitu [168, 169]. Mezi vlastnosti mikroplastů, které biofilm ovlivňuje patří hydrofobicita (změna kontaktního úhlu), změny funkčních skupin (vznikají C-O a C=O vazby, tvoří se alifatické a aromatické sloučeniny), celková měrná hmotnost, velikost mikroplastu, měrný povrch a drsnost, a obecně dochází ke změnám ve fyzikálním a chemickém chování [170]. Jak uvádí některé studie [171, 172], biofilm vytvořený na částicích PE, kromě již zmíněného snížení hydrofobicity a zvětšení specifického povrchu, také zvýšil adsorpci polutantů. Na povrchu mikroplastů může navíc docházet ke koncentraci nutrientů rozptýlených v okolním prostředí, ty jsou důležité pro tvorbu a udržení biofilmu [173]. Biofilmy vytvořené na částicích mikroplastů takto mohou ovlivnit cykly dusíku a fosforu v prostředí [174]. Z výše uvedeného tedy vyplývá, že snížení koncentrace nutrientů v médiu a následné prodlužování kořenů rostliny *L. minor* bylo pravděpodobně způsobeno tvorbou biofilmu na částicích P3HB.

Tento závěr pak potvrzuje i fakt, že pouze u experimentů, kde byl použit výluh mikroplastů P3HB došlo k významné inhibici růstu rostliny *L. minor*, a to u obou velikostních frakcí. Existuje

možnost, že by inhibice mohla být způsobena chemikáliemi, které byly použity při výrobě P3HB a mohly se z mikroplastů vyluhovat do média během přípravy výluhů. Jedná se např. o chloroform používaný k extrakci P3HB, konkrétně k lýze buněk, které P3HB (bio)syntetizují [175]. Jako pravděpodobnější se ale jeví možnost, že již během přípravy výluhu došlo k tvorbě biofilmu na povrchu částic P3HB, sorpci a spotřebě nutrientů biofilmem a výluh použitý pro test ekotoxicity tak obsahoval nutrienty v mnohem nižší koncentraci, což vedlo k ovlivnění růstu rostliny a prodloužení kořene.

Pro potvrzení hypotézy, že nedostatek živin v médiu může vést k prodlužování kořene rostliny *L. minor*, byly dále provedeny experimenty s menším množstvím nutrientů v médiu. *L. minor* byla proto inkubována v „ochuzeném“ Steinbergově médiu obsahujícím o 5 %, 10 %, 20 %, 30 % a 40 % méně nutrientů než kontrola. Experiment probíhal za stejných podmínek jako varianta s mikroplasty (**Příloha A, 2.2 Design experimentu**). Výsledky potvrdily výše uvedenou hypotézu: s klesající koncentrací nutrientů dojde k mírné inhibici růstu *L. minor* ve srovnání s kontrolou (nejvyšší zaznamenaná inhibice činila 6,5 % a to ve vzorku s nejnižší koncentrací nutrientů), navíc ve všech případech došlo ke stimulaci růstu kořene, která se zvyšovala s klesající koncentrací nutrientů v médiu (**Příloha A, Obrázek 6**).

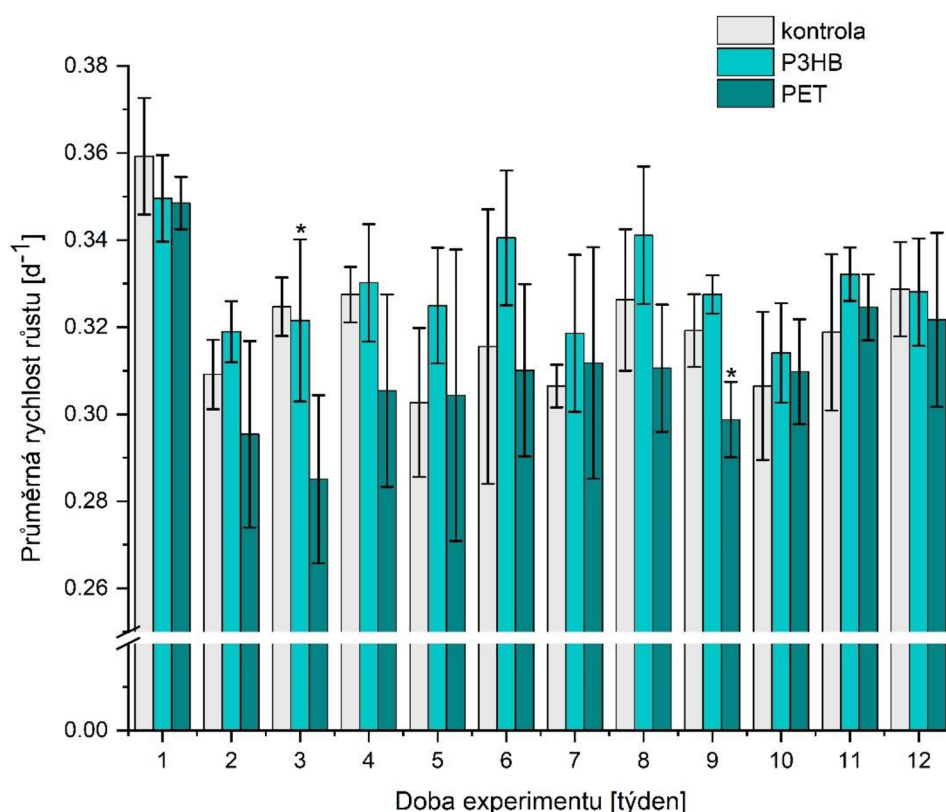
Obecně je známo, že ponořené rostliny jsou schopné přijímat nutrienty jak kořeny, tak svými výhonky, přičemž příjem nutrientů ze sedimentu se odvíjí od jejich dostupnosti ve vodě. Arts a kol. [176] uvádí, že měření délky kořene proto může být citlivější metodou pro stanovení vlivu polutantů na ponořené rostliny než např. hodnocení růstu a množství biomasy. Plovoucí rostliny, jako je i *L. minor*, jsou jedinečné v tom, že pro příjem nutrientů kořeny i výhonky využívají stejného zdroje [164]. Dostupnost živin ve vodě tedy může mít na tyto rostliny mnohem větší vliv. Je třeba také zmínit, že podobný problém s dostupností nutrientů mohou mít i suchozemské rostliny. Brtnický a kol. [177] uvádí, že přidavek mikroplastů P3HB do půdy zvyšuje mikrobiální aktivitu díky preferenčnímu využití P3HB jako snadného zdroje uhlíku. Rychlá biodegradace P3HB tak vede k rychlému vyčerpání půdního dusíku v plastisféře (mikrobiální okolí mikroplastu) a také v okolí kořenů rostlin, což má za následek silně inhibiční účinek na jejich růst. Nicméně, půdy jsou díky velkému zastoupení mikroorganismů mikrobiálně aktivnějším prostředím než voda, ve vodním prostředí proto mohou být do „boje“ o příjem nutrientů mezi rostlinami a mikroorganismy zapojeny i abiotické faktory, jako je sorpce.

Z krátkodobého ekologického hlediska stimulace růstu kořene v přítomnosti mikroplastů P3HB pro rostlinu *L. minor* pravděpodobně nepředstavuje velký problém. Důležité však je, že tento efekt poukazuje na fluktuaci koncentrace nutrientů ve vodě způsobenou tvorbou biofilmu a biodegradací P3HB. Fluktuace mohou být významné pro růst řas a vodních rostlin, které jsou zdrojem potravy pro mnoho malých bezobratlých živočichů a ryb. Kul a kol. [178] uvádí, že nedostatek dusíku snižuje koncentraci chlorofylu v listech rostlin, obsah proteinů a škrobu a má negativní vliv na množství květů a plodů. Nicméně, v našem případě jsme změny v obsahu fotosyntetických pigmentů u rostliny *L. minor* nepozorovali a ve většině případů nebyly pozorovány ani negativní změny v jejím růstu. Z našich výsledků tedy vyplývá, že za daných podmínek se rostlina snížené koncentraci nutrientů v médiu přizpůsobila pouze prodloužením kořene a významný negativní účinek tak nebyl pozorován. Nicméně, jak bylo zmíněno výše, prodloužení kořene je indikátorem stresu, který může při dlouhodobějším působení představovat pro kondici daného organismu problém. Z tohoto důvodu bylo potřeba

se pro objektivní posouzení vlivu P3HB mikroplastů na tuto rostlinu zaměřit i na jejich dlouhodobý vliv.

Studium dlouhodobého vlivu mikroplastů P3HB na rostlinu *L. minor*

Během dlouhodobého experimentu jsme na základě výše uvedených výsledků vystavili rostlinu *L. minor* po dobu 12 týdnů suspenzím P3HB a PET mikroplastů $<63 \mu\text{m}$ v koncentraci $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Experiment byl proveden za stejných podmínek jako krátkodobý test (viz **Příloha A, 2.2 Design experimentu**). Každý týden byla rostlina přesazena do nově připravených suspenzí. Mimo vlivu na rychlost růstu a délku kořene, které byly sledovány každý týden, byl pro hodnocení případného stresu vyvolaného přítomností mikroplastů každý druhý týden stanoven také obsah fotosyntetických pigmentů v listech *L. minor*, celková antioxidační kapacita (TAC), aktivita elektronového transportního řetězce (ETS) a obsah energeticky bohatých molekul, konkrétně sacharidů a proteinů. Pro sledování vlivu přítomnosti P3HB a PET mikroplastů na TAC, aktivitu ETS a obsah energeticky bohatých molekul, byly vzorky homogenizovány v draselno-fosfátovém pufru, odstředěny a supernatant byl následně použit pro další analýzu dle práce Rozman a kol. [157].

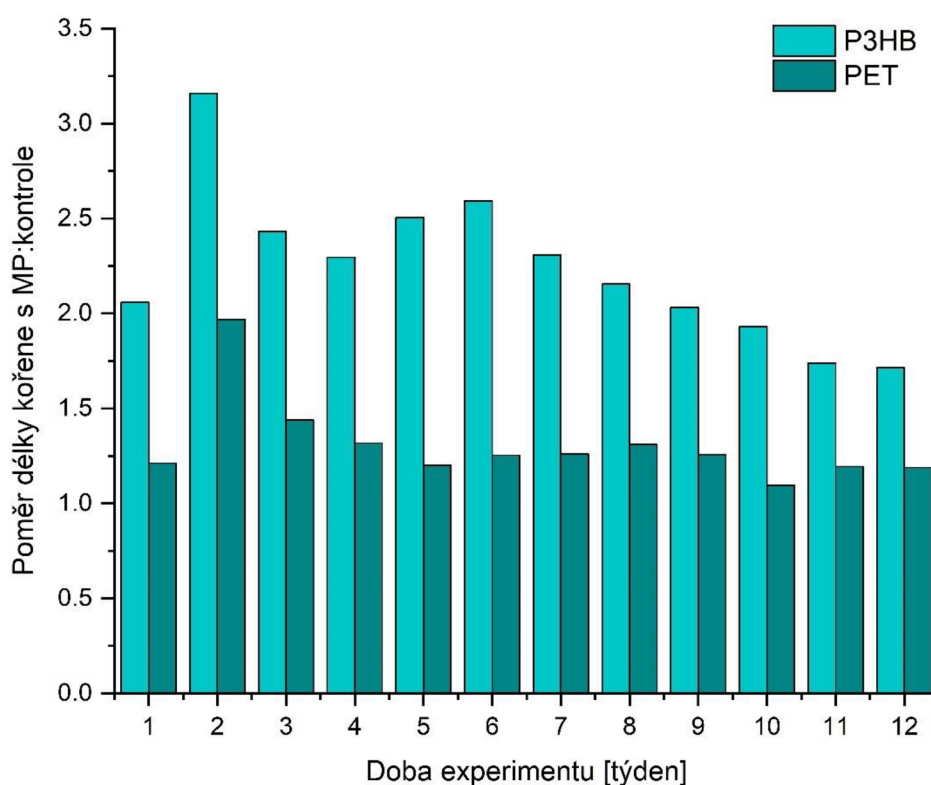


Obrázek 11: Průměrná rychlost růstu rostliny *L. minor* v průběhu dlouhodobého experimentu s mikroplasty P3HB a PET o velikosti $<63 \mu\text{m}$ v koncentraci $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Hvězdička značí statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolou (p -hodnota $<0,05$).

Rychlost růstu rostliny *L. minor* byla významně ovlivněna pouze ve dvou případech: pro P3HB mikroplasty ve 3. týdnu experimentu a pro PET mikroplasty v 9. týdnu experimentu (**Obrázek 11**). To koresponduje s výsledky krátkodobého (7denního) experimentu, kdy nebyla ani v koncentraci mikroplastů $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ zaznamenána významná inhibice růstu *L. minor* (viz

výše a **Příloha A, Obrázek 1**). Rovněž jsou tyto výsledky v souladu s prací Rozman a kol. [157], která uvádí, že ani PE mikroplasty neměly po 12 týdnech experimentu významný účinek na růst rostliny *L. minor*.

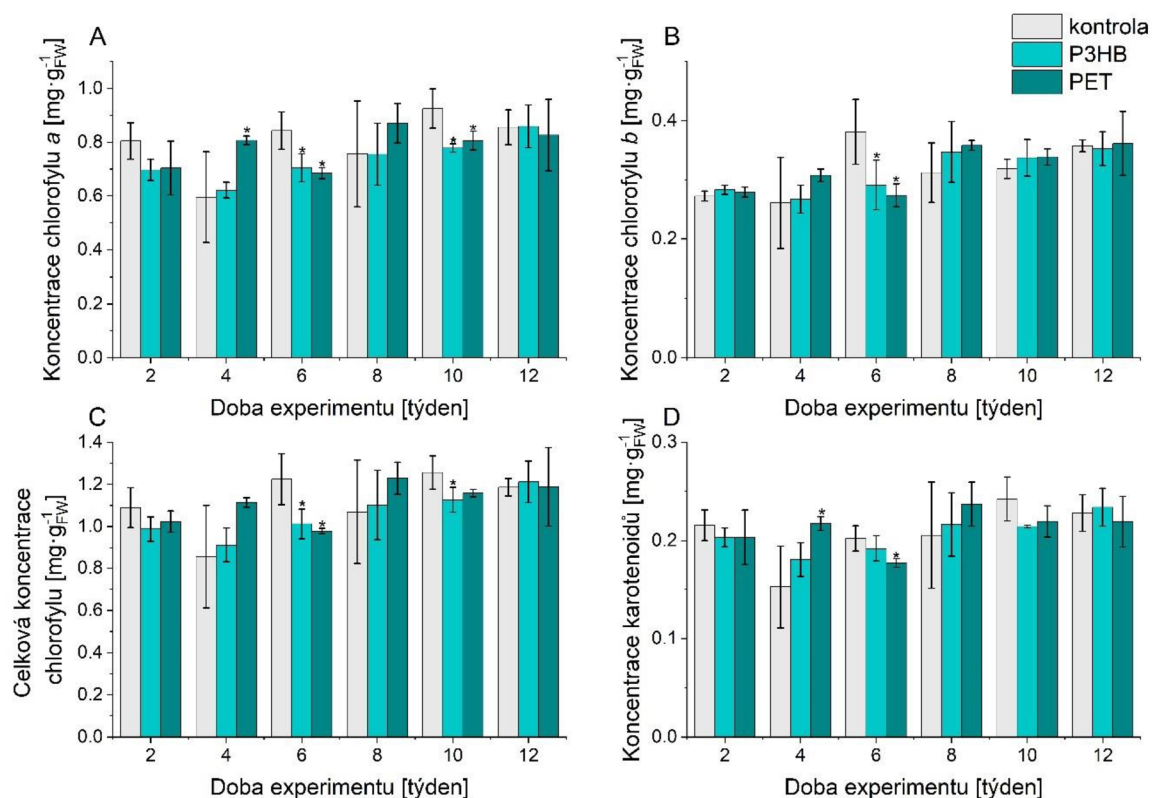
Významný vliv na růst kořenů rostliny *L. minor* byl pozorován po celou dobu experimentu (**Obrázek 12**). Nejvyšší stimulace růstu kořenů byla zaznamenána ve druhém týdnu (u P3HB byla délka kořene 3,2x vyšší, u PET pak 2x vyšší), následně se postupně snižovala a na konci experimentu dosahovala v případě P3HB mikroplastů dokonce nižších hodnot než po prvním týdnu. V případě PET mikroplastů byla stimulace růstu kořenů na začátku a na konci experimentu srovnatelná. Tyto výsledky potvrzují naše výše uvedené závěry, že v přítomnosti mikroplastů P3HB dochází k větším úbytkům nutrientů v médiu, a to pravděpodobně vlivem tvorby biofilmu na povrchu částic mikroplastů. Domníváme se, že v případě dlouhodobé expozice je možné, že se rostliny začaly na dlouhodobý nedostatek nutrientů adaptovat, a proto pozorovaná stimulace růstu kořenů s časem klesala.



Obrázek 12: Poměr délky kořenů rostlin exponovaných suspenzím mikroplastů (P3HB, PET <math><63 \mu\text{m}</math>, v koncentraci

Ani obsah fotosyntetických pigmentů v listech rostliny *L. minor* nebyl ve většině případů významně ovlivněn (**Obrázek 13**). Mu a kol. [179] uvádí, že nedostatek dusíku má vliv na fotosyntézu rostlin. Celkový obsah chlorofylu v listech rostliny *L. minor* byl oproti kontrole významně snížen pouze v 6. a 10. týdnu experimentu. Domníváme se, že rostlina byla schopná na úbytek živin v médiu reagovat především prodloužením kořene a tato reakce byla pro její následný růst a udržení životaschopnosti dostatečná. Sledování dlouhodobých účinků mikroplastů P3HB a PET na rostlinu *L. minor* tedy ukázalo, že přítomnost mikroplastů zásadně neovlivnila rychlost růstu rostliny a ani obsah fotosyntetických pigmentů, což je v souladu i se studií Rozman a kol. [157]. Navíc je pravděpodobné, že je rostlina *L. minor* schopná, díky své

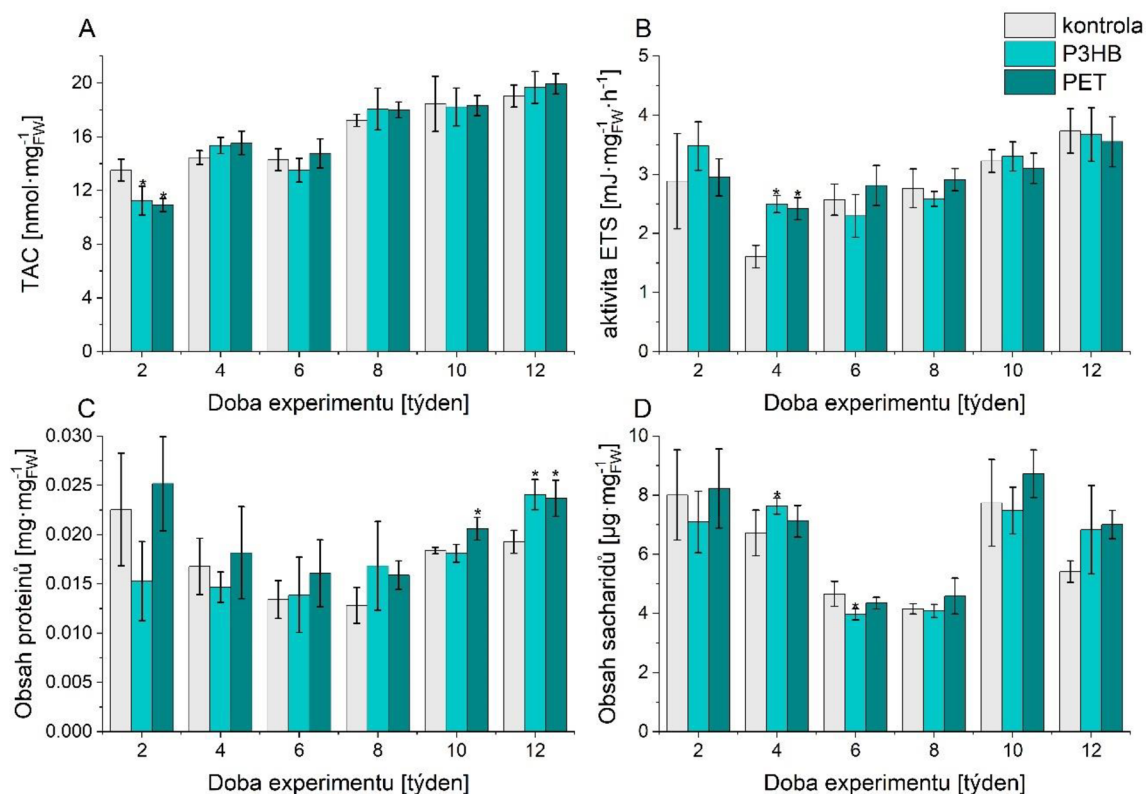
vysoké adaptabilitě na různé polutanty [180, 181], tolerovat vysoké koncentrace mikroplastů i v dlouhém časovém období.



Obrázek 13: Obsah fotosyntetických pigmentů v listech rostliny *L. minor* v průběhu dlouhodobého experimentu s mikroplasty P3HB a PET o velikosti $<63 \mu\text{m}$ v koncentraci $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$: A – koncentrace chlorofylu a, B – koncentrace chlorofylu b, C – celková koncentrace chlorofylů, D – koncentrace karotenoidů. Hvězdička značí statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolou (p -hodnota $<0,05$).

Výsledky dalších analýz, tj. TAC, aktivity ETS a obsah sacharidů a proteinů, ukázaly podobný trend: většina z nich se v přítomnosti mikroplastů ve srovnání s kontrolou nezměnila (Obrázek 14). Jak ve své práci uvádí Liao a kol. [182], nízké hodnoty TAC mohou značit oxidační stres, nebo zvýšenou náchylnost k oxidačnímu poškození. Nicméně, v našem případě bylo významné snížení TAC pozorováno pouze ve druhém týdnu experimentu, kdy došlo i k největšímu nárůstu v délce kořene *L. minor*. Vzhledem k tomu, že v dalších týdnech již tento efekt pozorován nebyl, domníváme se, že se rostlina na přítomnost mikroplastů adaptovala. Přítomnost mikroplastů tedy nezpůsobuje u rostliny *L. minor* významný oxidační stres, což potvrzují i minimální změny v obsahu fotosyntetických pigmentů k jejichž ovlivnění během oxidačního stresu také běžně dochází [183]. Podobně ve většině případů nedošlo ani k významným změnám v aktivitě ETS, která je ukazatelem metabolické aktivity a respirace organismů [184]. Zvýšení aktivity ETS bylo pozorováno pouze po dobu prvních čtyř týdnů experimentu, následně se hodnoty vrátili na úroveň kontroly (Obrázek 14), rychlost respirace rostliny *L. minor* se tedy celkově nezměnila. Podobný efekt ve své studii zaznamenali i Rozman a kol. [157], kteří sledovali dlouhodobý vliv přítomnosti PE mikroplastů na *L. minor*. Zvýšení aktivity ETS pozorovali pouze po prvním týdnu experimentu a následně se hodnoty vrátili na úroveň kontroly. V souladu se malým pozorovaným vlivem obou typů mikroplastů

na rychlost růstu a respiraci rostliny *L. minor* nebyl ve většině případů ovlivněn ani obsah energeticky bohatých molekul (sacharidů a proteinů, **Obrázek 14**). Pozorované změny byly spíše sporadické a zahrnují např. nárůst v obsahu proteinů v posledním, tj. 12. týdnu, experimentu.



Obrázek 14: A – Celková antioxidační kapacita, B – aktivita elektronového transportního řetězce, C – obsah proteinů a D – obsah sacharidů. Hvězdička značí statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolou (p -hodnota $<0,05$).

Přestože ani při dlouhodobé interakci nebyl pozorován významný negativní vliv přítomnosti mikroplastů P3HB a PET na rostlinu *L. minor*, je zřejmé, že interakce mezi mikroplasty a vodními rostlinami mohou mít důležité ekologické důsledky. Např. vysoké koncentrace mikroplastů spojené s rostlinnou biomasou by mohly, vzhledem k tomu, že vodní rostliny jsou důležitým zdrojem potravy pro řadu organismů, ovlivnit trofický transport mikroplastů do vyšších úrovní potravního řetězce [185, 186].

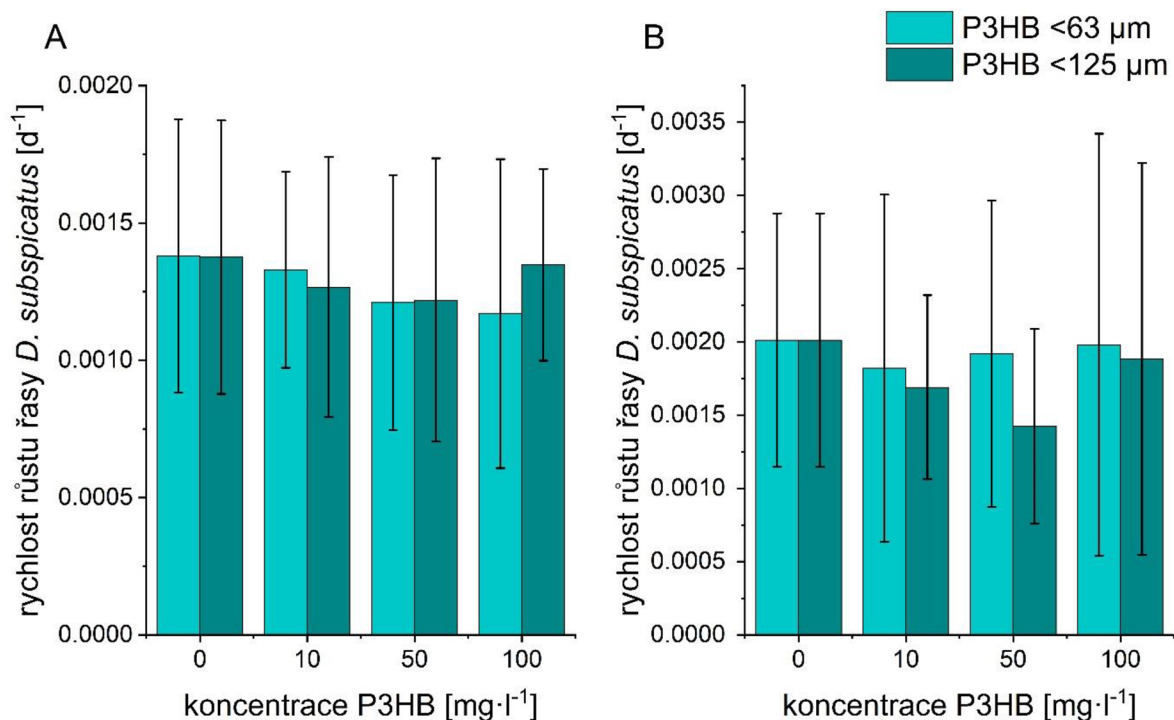
Odpovědí na výzkumnou otázku 1 tedy je, že mikroplasty P3HB v krátkodobém ani dlouhodobém měřítku nevykazují negativní účinek na růst rostliny *L. minor*. Je důležité zmínit, že ve všech případech docházelo k významnému nárůstu délky kořene ve srovnání s kontrolou. Vytvořili jsme a částečně i potvrdili hypotézu, že tento efekt je způsoben úbytkem živin v médiu, a to pravděpodobně vlivem tvorby biofilmu na povrchu biodegradabilních mikroplastů P3HB.

2 Výzkumná otázka 2: Bude v přítomnosti P3HB mikroplastů pozorován vliv na růst řasy *D. subspicatus*?

Další otázkou, která byla v rámci této práce řešena, bylo posouzení vlivu přítomnosti částic P3HB na růst sladkovodní řasy *D. subspicatus*. Tento druh jsme zvolili nejen proto, že je v laboratoři Ekotoxikologie na Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí (Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně) používán ke krmení laboratorní kultury organismu *D. magna*, ale hlavně proto, že je uveden jako vhodný druh normou OECD No. 201 [187] pro stanovení vlivu chemických látek na sladkovodní řasy. Podle této normy bylo také postupováno během experimentů. Stejně jako u rostliny *L. minor* není dosud normovaný přístup ke stanovení vlivu mikroplastů na řasy, proto jsme zvolili dva různé postupy, a to stanovení vlivu výluhu připraveného z mikroplastů P3HB a vlivu suspenze.

První fází bylo samotné zavedení a validace testu s řasou *D. subspicatus*. Jako referenční látka byl použit 3,5-dichlorfenol. Následně byly na základě výše uvedené normy OECD No. 201 [187] provedeny za kontrolovaných podmínek po dobu 72 h samotné experimenty. Opět byl zjišťován vliv dvou velikostních frakcí P3HB (částice <63 μm a částice <125 μm) v koncentracích 10, 50 a 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ na rychlost růstu řasy *D. subspicatus*. Pro kultivaci řasy bylo po konzultaci s prof. RNDr. Luděkem Bláhou, Ph.D. z pracoviště RECETOX, Masarykova Univerzita, Brno, kde toto médium s úspěchem používají, použito 50 % ZBM médium (kombinace Zehnder média a Bristol modifikovaného Bold média).

Jak vyplývá z výsledků (**Obrázek 15**), v obou případech docházelo k inhibici růstu, avšak tento efekt nebyl jednoznačně závislý na koncentraci P3HB, a to ani v případě výluhu, ani v suspenzi. Výluh připravený z mikroplastů P3HB v koncentracích 10, 50 a 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ způsobil inhibici růstu 3,1 %, 12,1 % a 14,8 % u částic <63 μm , respektive 7,9 %, 11,3 % a 2,0 % pro <125 μm . V případě suspenze pak po 72 h byla pozorována inhibice růstu 9,5 %, 4,6 % a 1,5 % pro částice P3HB <63 μm , respektive 16,0 %, 29,3 % a 6,4 % u částic <125 μm . Vzhledem k tomu, že nebylo možné stanovit počet řasových buněk v suspenzi, byly uvedené inhibice růstu vypočítány z hodnot optických hustot řasových suspenzí před a po testu. Hodnoty u suspenzí byly korigovány optickou hustotou suspenze samotných mikroplastů. Z výsledků tedy vyplývá, že přítomnost mikroplastů P3HB negativně ovlivňuje růst sladkovodní řasy *D. subspicatus*.



Obrázek 15: Růstová rychlost řasy *D. subspicatus* ve výluhu (A) a v suspenzi (B) připravené z mikroplastů P3HB.

V případě výluhu může být tento efekt způsoben jednak tím, že stejně jako v předcházejícím případě s rostlinou *L. minor* dochází během jeho přípravy k sorpci nutrientů potřebných pro růst řasy na mikroplasty P3HB a tvorbě biofilmu na povrchu částic, který rovněž živiny spotřebovává. Druhou možností, jak již bylo uvedeno výše, je možné uvolnění chemikálií použitých při výrobě P3HB do výluhu. Nicméně, tuto možnost jsme, vzhledem k povaze efektu, jenž byl pozorován u rostliny *L. minor*, vyloučili (významná inhibice růstu byla při testu s výluhem pozorována pouze ve vysokých koncentracích, viz **Příloha A, Obrázek 1**). Domníváme se tedy, že již na začátku testu tak měla řasa *D. subspicatus* ve srovnání s kontrolním vzorkem k dispozici omezené množství živin. Lze tak vysvětlit zvýšení inhibice jejího růstu spolu s rostoucí koncentrací mikroplastů P3HB <63 µm. Menší částice mají větší specifický povrch, umožňující intenzivnější sorpci, což bylo potvrzeno výše, kde uvádíme, že v přítomnosti větší velikostní frakce mikroplastů P3HB (<125 µm) dochází k přibližně o 10 % menšímu úbytku dusičnanového dusíku než v případě menší velikostní frakce (viz **Příloha A, Obrázek S5, Supporting Information**). Tato skutečnost vysvětluje i výsledky experimentu s výluhem připraveným za použití větší velikostní frakce mikroplastů P3HB. Zde byla vyšší inhibice růstu pozorována pouze u koncentrace 10 a 50 mg·l⁻¹. Pokles inhibice v nejvyšší koncentraci (100 mg·l⁻¹) může být pravděpodobně způsoben tím, že dochází k větší a rychlejší agregaci částic mikroplastů P3HB, a tedy ke snížení velikosti specifického povrchu, který je k dispozici pro sorpci nutrientů z média. Toto tvrzení podporují i výsledky sorpčního experimentu, u kterého jsme sledovali procentuální úbytek dusičnanového dusíku v médiu pro rostlinu *L. minor*. Dusík je základním makronutrientem, jeho koncentrace významně ovlivňuje růst řas a jejich biochemické složení – při vyčerpání dusíku v kulturačním médiu dochází ke snížení produkce biomasy, a naopak ke stimulaci produkce lipidů [188]. Toto bylo

potvrzeno již v dřívějších pracích, například Yang a kol. [189] pozoroval v podmínkách s nedostatkem dusíku inhibici růstu řasy *Chlamydomonas reinhardtii* až o 31,7 %.

Inhibice růstu řasy byla pozorována i v případě suspenzí připravených z obou velikostních frakcí mikroplastů P3HB, přičemž větší efekt byl zaznamenán v suspenzích připravených z mikroplastů P3HB <125 μm. Pro obě velikostní frakce byl v nejvyšší testované koncentraci (100 mg·l⁻¹) pozorován pokles inhibice růstu. Su a kol. [190] uvádí, že přítomnost biodegradabilních mikroplastů způsobuje podobnou toxicitu jako konvenční mikroplasty. Porovnávali vliv konvenčních mikroplastů PA a PE s biodegradabilními PLA a PBS na mořskou řasu *Chlorella vulgaris*, maximální zaznamenaná inhibice pro PE byla 47,2 % v koncentraci 1 000 mg·l⁻¹, pro PA, PLA a PBS pak 40,4 %, 48,0 % a 34,3 % v koncentraci 100 mg·l⁻¹. Zmiňuje, že fyzikálně-chemické vlastnosti mikroplastů a chemické změny přispívají k jejich inhibičním účinkům na růst řas a že inhibiční účinky způsobené biodegradabilními mikroplasty lze přičíst jejich heteroagregaci s řasovými buňkami.

Nicméně, k námi pozorované inhibici růstu řasy *D. subspicatus* v suspenzi mikroplastů P3HB je nutno přistupovat kriticky. A to proto, že navzdory kontinuálnímu třepání suspenzí docházelo během testu k agregaci a sedimentaci mikroplastů P3HB na dno testovacích nádob a zde pak následně k rozvoji biofilmu. Jak uvádí Nava a kol. [191], mikroplasty představují dostupný povrch pro kolonizaci řadou fyto-bentických organismů přítomných ve sladkovodních ekosystémech a malé povrchy mikroplastů mohou hostit mnoho různých druhů řas. Spolu s homoagregací částic mikroplastů P3HB tak mohlo docházet i k heteroagregaci mikroplastů a řasy *D. subspicatus*, a následně k rychlejší sedimentaci. Různé druhy řas vyvolávají degradaci polymerů, protože řasami syntetizované enzymy pomáhají snižovat aktivační energii potřebnou k přerušení chemických vazeb polymeru. Řasy by tak mohly potenciálně být jednou z možností pro odstranění plastů z životního prostředí pomocí bioremediace [192].

Odpovědí na výzkumnou otázku 2 tedy je, že v přítomnosti mikroplastů P3HB dochází pravděpodobně k inhibici růstu řasy *D. subspicatus*. Stejný vliv na tento organismus má i výluh připravený z mikroplastů P3HB. Nicméně, z našich výsledků vyplývá, že metoda zvolená pro zjištění vlivu suspenze nebyla ideální vzhledem k sedimentaci částic na dno testovací nádoby a tvorbě biofilmu. Pro správné pochopení mechanismu působení, ale i ověření správnosti získaných výsledků bude potřeba ještě další výzkum. Vhodné by bylo zajistit udržení mikroplastů v suspenzi po celou dobu testu, což lze buď intenzivnějším mícháním, sonikací nebo za pomoci pomocných látek. Je zřejmé, že poslední dvě možnosti by měly podstatný vliv na celý experiment. Možností by tedy bylo provádět experiment místo se suspenzí s plasty umístěnými do experimentální nádoby a sledovat tak alespoň vliv P3HB na růst řasy na jeho povrchu. Dále pak je možno zvolit k hodnocení rychlosti růstu řasy jinou metodu, než je měření optické hustoty suspenze, tj. použít například některých mikroskopických technik. Dále pak se zaměřit na možné další efekty, které přítomnost mikroplastů P3HB může u řas vyvolávat, např. obsah fotosyntetických pigmentů, aj.

3 Výzkumná otázka 3: Je možné stanovit mikroplasty požitá drobnými planktonními organismy bez jejich extrakce případně digesce organismu?

Během práce na literární rešerši týkající se vlivu mikroplastů na sladkovodní organismus *D. magna* jsme zjistili, že se množství studií zabývá požitím částic mikroplastů. Požití mikroplastů bylo doposud popsáno u více než 70 sladkovodních organismů [193]. Bylo zjištěno, že požití mikroplastů může způsobit blokaci další přijímané potravy, agregovat a blokovat tak trávicí trakt organismů, omezit příjem potravy nebo mohou být mikroplasty translokovány do oběhového systému. Nicméně studií, které by poskytovaly informaci o množství požitých mikroplastů drobnými sladkovodními organismy je překvapivě jen omezené množství. To lze vysvětlit tím, že kvantitativní a kvalitativní analýza mikroplastů požitých zooplanktonními organismy je stále vzhledem k velikosti těchto organismů spolu s malým množstvím požitých mikroplastů náročná. Například, Lin a kol. [121] použili gravimetrické stanovení mikroplastů požitých organismem *D. magna*. Velikostně sjednocené organismy exponovali čistému médiu a PS mikroplastům a jejich celkovou hmotnost na konci experimentu porovnávali. Tento přístup je však problematický vzhledem k proměnlivé hmotnosti jednotlivých organismů. Například, jak je uvedeno v **Příloze B**, části **Diskuze** suchá hmotnost organismů *D. magna* se v našem případě pohybovala v rozmezí 160 až 660 µg. Další metody zahrnují fluorescenční značení mikroplastů kombinované s využitím spektrofotometrických metod, stereo/mikroskopická stanovení, stanovení objemové koncentrace částic pomocí analyzátorů velikosti částic, kontroly obsahu trávicích traktů organismů, nebo pyrolýzní plynovou chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrometrií [107, 109–124]. Tyto metody však často vyžadují buď náročnou přípravu vzorku nebo použité metody nemají dostatečně nízké meze detekce.

Jak bylo diskutováno výše a v **Příloze B**, mnohé metody běžně používané k analýze mikroplastů požitých živými organismy mají významná omezení. Zaměřili jsme se proto na vývoj přístupu pro přímou kvantifikaci mikroplastů v malých vodních organismech, pro tyto účely jsme se rozhodli využít základní termoanalytické metody, jako je diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC) a termogravimetrie (TG). Obě tyto metody jsou robustní, citlivé a běžně používané pro kvalitativní i kvantitativní analýzu vzorků. Vzhledem k návaznosti na naše další experimenty byl jako modelový organismus použit sladkovodní bezobratlý *D. magna*, který neselektivně požívá částice o velikosti <1 µm až do přibližně 70 µm [111] a rovněž je hojně využívaným modelovým organismem při studiu vlivu mikroplastů [194]. Přesné postupy přípravy vzorků a použitých metod, včetně podrobných výsledků jsou popsány v **Příloze B**.

Metody termické analýzy se používají ke stanovení mikroplastů v různých složkách životního prostředí, většinou jako pyrolýzní techniky spojené s analýzou plynů [195, 196]. Metoda DSC byla již dříve použita ke stanovení mikroplastů v různých environmentálních matricích, a to především u vzorků vody po jejich předchozím zakoncentrování a sušení [197–203]. Ani DSC, ani TG však zatím nebyly použity k přímé analýze mikroplastů požitých zooplanktonem bez jakékoliv úpravy (kromě sušení). Podstatou DSC měření bylo stanovení enthalpie tání požitého mikroplastu P3HB, která je úměrná obsahu krystalického podílu P3HB. S využitím znalosti obsahu krystalického podílu (obvykle kolem 50%, případně ji lze dopředu stanovit) a enthalpie tání pro 100% krystalický P3HB (tabelovaná hodnota) lze pak snadno spočítat podíl P3HB

v organismu. U TG byl pak využit odečet hmotnostního úbytku organismu s a bez P3HB v teplotním intervalu 200-400°C.

Výsledky obou metod, DSC i TG, vykazovaly stejný trend, a to nárůst množství P3HB ve vzorku spolu s rostoucí koncentrací P3HB v suspenzi při přípravě organismů *D. magna* (**Příloha B, Obrázek 2 a 4**). Konkrétně, při použití DSC byl obsah P3HB v případě organismů vystavených suspenzi P3HB v koncentraci 100 mg·l⁻¹ pro menší velikostní frakci <63 µm 10,3 hmotnostních %, pro frakci <125 µm pak 6,3 hmotnostních %. To odpovídá 34 µg požitých mikroplastů P3HB <63 µm jedním organismem *D. magna* po 21denní expozici, resp. 22 µg u frakce <125 µm. Výsledky dosažené metodou TG byly srovnatelné (**Příloha B, Obrázek 4**). Vzhledem k povaze vzorků bohužel nebylo možné stanovit limit detekce (LOD), ani limit kvantifikace (LOQ) pro žádnou z metod. Proto jsme pro ověření citlivosti provedli DSC experiment pouze s jedním organismem *D. magna*, který byl exponován nejnižší koncentrací mikroplastů P3HB v suspenzi (1,56 mg·l⁻¹). Tento experiment prokázal, že DSC je dostatečně citlivou metodou k posouzení přítomnosti P3HB v tomto typu vzorku. Rovněž takto stanovené množství P3HB ve vzorku odpovídá množství, která jsme získali v případě větších množství vzorku.

U DSC byl v případech nižší expoziční koncentrace P3HB mikroplastů (1,56 a 3,125 mg·l⁻¹) při přípravě vzorků organismů *D. magna* pozorován posun teploty tání o 3 °C k vyšším hodnotám oproti samotnému P3HB. Vyšší expoziční koncentrace naopak vykazovaly minimální rozdíly v teplotách tání v porovnání s čistým P3HB (**Příloha B, Obrázek 6**). Domníváme se, že tento posun může být způsoben distribucí mikroplastů v trávicím traktu organismu *D. magna*. Je-li expoziční koncentrace mikroplastů nižší, organismy jsou schopné požit větší množství potravy, mikroplasty pak penetrují dále do organismu, a jsou tak v jejich trávicím traktu lépe tepelně izolovány. To následně způsobuje posun jejich teploty tání měřený metodou DSC k vyšším hodnotám. Naopak v případě vyšších expozičních koncentrací P3HB mikroplastů (6,25 až 25 mg·l⁻¹), které jsou spojeny s větší mírou jejich příjmu organismy, dochází v trávicím traktu organismů k agregaci částic mikroplastů. Tyto agregáty jsou pak méně izolovány a neproniknou tak hluboko v tělech organismů *D. magna*, nedochází zde tedy k velkému rozdílu v hodnotách teplot tání oproti čistému P3HB.

Jak již bylo zmíněno, výsledky získané použitím obou metod (DSC i TG) byly srovnatelné a lišily se pouze v nízkých koncentracích (viz **Příloha B, Obrázek 5**). Zmíněná odchylka může být způsobena odečtem dvou TG křivek (TG křivky organismu exponovanému P3HB mikroplastům a organismu pocházejícího z kontrolního ošetření), což mohlo způsobit chybu kvantitativního stanovení P3HB mikroplastů.

Mimo výhod, které se s použitím DSC pojí, jako je robustnost, citlivost, ale i možnost analyzovat vzorek bez jeho předchozí přípravy, má tato metoda i jistá omezení. V případě naší aplikace je to teplota tání studovaných mikroplastů, je nutné totiž respektovat teplotní degradaci schránek organismů. *D. magna* patří do řádu *Cladocera*, těla těchto organismů jsou uzavřena nekalifikovanou schránkou, která je z velké části složena z chitinu [204]. Tento polysacharid začíná degradovat při teplotách mírně nad 200 °C [205], což potvrzují i námi provedené TG analýzy (**Příloha B, Obrázek 3**). V případě analýzy při vyšší teplotě, by pak degradační produkty *D. magna* způsobily problémy v DSC peci, došlo by k její kontaminaci,

kteřá má za následek zhoršení citlivosti přístroje a v nejzazším případě i poškození cely. Námí navržená metoda je tedy použitelná pro analýzu mikroplastů s nižšími teplotami tání jako je HDPE ($T_t = 125\text{ °C}$), LDPE ($T_t = 106 - 112\text{ °C}$), PLA ($T_t = 150 - 160\text{ °C}$), PP ($T_t = 130 - 171\text{ °C}$), méně vhodná je pak pro PVC ($T_t = 115 - 245\text{ °C}$), a nevhodná pro PET ($T_t = 245 - 265\text{ °C}$) a PS ($T_t = 207 - 297\text{ °C}$) [206–213]. Rovněž je nutné zmínit, že použití DSC by mohlo být problematické i při stanovení neznámých vzorků mikroplastů, a to proto, že např. krystalinita zkoumaného P3HB není vždy známa a může se lišit. P3HB použité v naší práci mělo krystalinitu 49 %, literatura však uvádí hodnoty mezi 50 až 80 % [75, 214, 215]. Nicméně, vyšší hodnoty krystalinity by zapříčinily pouze mírné snížení výsledku P3HB mikroplastů v tělech organismů *D. magna*. Rozdílná krystalinita není problémem v případě, že by tato metoda byla použita k hodnocení požití mikroplastů organismy během ekotoxikologických studií nebo experimentů v mezokosmu, kde lze vlastnosti materiálu kontrolovat a předem analyzovat.

Odpovědí na výzkumnou otázku 3 tedy je, že pomocí metod termické analýzy jako jsou DSC a TG je možné stanovit mikroplasty požitá drobnými planktonními organismy bez předchozí úpravy vzorku, jakými jsou extrakce, digesce a apod. Obě metody jsou rychlé a robustní a poskytují informace o hmotnosti mikroplastů vztažených k hmotnosti organismů, které je požily, nemohou tedy poskytnout údaje o počtu částic. Nicméně, metoda DSC se jeví jako metoda citlivější k analýze mikroplastů přítomných ve vzorku v nízkých koncentracích. Přestože jsme při vývoji této metody analyzovali pouze jeden typ mikroplastů (P3HB), lze předpokládat, že za splnění předpokladu nízké teploty tání (viz výše) je tato metoda vhodná pro více typů polymerů případně i analýze různých typů mikroplastu v jednom organismu. Zde by pak bylo nutné použít k separaci píků tání například dekonvoluční metody.

4 Výzkumná otázka 4: Ovlivní přítomnost P3HB mikroplastů negativně organismus *D. magna*?

Poslední otázka, která byla v rámci práce řešena, se týkala možného negativního vlivu mikroplastů P3HB na drobného sladkovodního korýše *D. magna*. Jak vyplývá z literární rešerše (viz výše), *D. magna* je běžně používaným modelovým organismem pro studium vlivu mikroplastů na sladkovodní biotu. To je dáno především díky jeho globálnímu zastoupení ve vodním prostředí a jeho významné roli v potravním řetězci, kdy spojuje primární producenty a konzumenty vyšších trofických úrovní. Výše uvedené studie upozorňují na možný negativní vliv konvenčních mikroplastů na organismus *D. magna*. Vzhledem k očekávanému nárůstu použití biodegradabilních plastů v mnoha odvětvích průmyslu je tedy vhodné zjistit, zda mají tyto materiály podobný nepříznivý účinek. V naší práci jsme proto sledovali vliv přítomnosti mikroplastů P3HB na organismus *D. magna*, a to opět ve dvou velikostních frakcích. Jak je uvedeno v **Příloze C, část 2 Materiál a metody**, kde jsou popsány přesné postupy. V práci jsme využili postupy uváděné v OECD normách [216, 217]. V krátkosti, organismy *D. magna* byly za kontrolovaných podmínek – teplota 20 ± 1 °C a světelný režim světlo:tma 16:8 (800 – 1 000 lux) – exponovány suspenzím mikroplastů P3HB ve dvou velikostních frakcích (<63 μm a <125 μm). V případě akutního testu jsme organismy *D. magna* ve dvou věkových kategoriích (mladší 24 h a staré 7 dní) vystavili po dobu 96 h působení výluhu z mikroplastů a jejich suspenzím v koncentracích 0, 6,25, 12,5, 25, 50 a 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 96 h. Chronické testy pak byly pro obě velikostní frakce mikroplastů P3HB provedeny pouze se suspenzí, koncentrační rozmezí zde muselo být vzhledem k vysoké mortalitě testovacích organismů upraveno na 0, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5 a 25 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. V případě multigeneračních experimentů pak byl sledován vliv suspenze P3HB v koncentraci 1,56 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ na čtyři po sobě jdoucí generace organismu *D. magna*.

Zjistili jsme, že 96hodinová expozice suspenzi ani výluhu z částic mikroplastů P3HB nevede ke zvýšení imobilizace a mortality, a to jak u juvenilních, tak ani u 7 dní starých organismů. Jak zmiňujeme výše a v **Příloze C**, nedávné studie ukázaly, že ani v případě konvenčních mikroplastů, jako je PE, PET nebo PS, nebyla během standardní doby expozice při akutních testech toxicity (48 h) pozorována zvýšená inhibice a mortalita, nicméně po delší expoziční době (96 až 120 h) docházelo k jejich postupnému zvýšení [112, 113, 116, 141, 142, 144]. Zvyšující se mortalitu, spolu s rostoucí koncentrací P3HB mikroplastů v suspenzi, jsme však zaznamenali při chronických experimentech, a to u obou velikostních P3HB (<63 μm a <125 μm , **Příloha C, Obrázek 1**). Spolu s rostoucí koncentrací docházelo rovněž k postupnému snižování velikosti organismů *D. magna* a k inhibici jejich reprodukční aktivity. Tento efekt autoři nepozorovali u mikroplastů PE a PET, nicméně byl pozorován u mikroplastů PS [114, 140, 143, 144]. Savva a kol. [148], porovnávali vliv přítomnosti biodegradabilních mikroplastů PLA a polyhydroxybutyrátu s konvenčními mikroplasty HDPE. Uvádí, že přítomnost biodegradabilních mikroplastů může mít výraznější subletální účinky a snižuje schopnost příjmu potravy organismu *D. magna*. Mírnou inhibici růstu organismů a mírné snížení reprodukční aktivity v následujících generacích jsme pozorovali i během multigeneračního experimentu (**Příloha C, Obrázek 2**), kdy byl sledován vliv nízké koncentrace P3HB mikroplastů (1,56 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) na 4 generace organismu *D. magna* (přesný postup viz **Příloha C**, část

2.5 Multigenerační experiment). Mírný vliv přítomnosti mikroplastů pozorovali i autoři Schür a kol. [218]. Po expozici organismu *D. magna* PS mikroplastům zaznamenali zvýšenou mortalitu, sníženou reprodukční aktivitu a omezení růstu organismů. Pro vyloučení možnosti, že je tento efekt způsoben samotnou přítomností částic, použili jako kontrolu přírodní částice kaolinu, v jehož přítomnosti k výše uvedeným účinkům nedocházelo.

Výše zmíněné efekty byly výraznější v případě, kdy byla použita menší velikostní frakce mikroplastů P3HB (<63 µm). S velikostí mikroplastů souvisí i schopnost organismů tyto částice pozřít – jak je uvedeno výše a v **Příloze B**, kdy organismy *D. magna* byly schopny pozřít více částic mikroplastů P3HB v případě menší velikostní frakce. Vliv velikosti potvrzuje i studie, kterou provedli González-Pleiter a kol. [219]. Autoři uvádí, že sekundární nanočástice P3HB způsobily akutní imobilizaci u 85 % organismů *D. magna* po 48 h expozice.

Potenciální biologické účinky biodegradabilních plastů na živé organismy zatím nejsou známy, ještě méně informací máme o tom, zda jsou tyto účinky nějakým způsobem ovlivněny biologickou rozložitelností plastů. Jak je uvedeno výše, biodegradace je spojena s rozvojem biofilmu na povrchu mikroplastů. Přítomnost biofilmu v přítomnosti mikroplastů P3HB jsme pozorovali v rámci řešení Výzkumné otázky 1 a je popsána v **Příloze A**. Literatura uvádí, že octnou-li se plastové částice, nebo produkty ve vodním prostředí, velmi rychle se na nich vytvoří vrstva adsorbovaných anorganických a organických polutantů. Následně dochází na povrchu plastu k tvorbě biofilmu, a to v řádu hodin [168, 169]. Tvorba biofilmu je dynamický proces, který obecně zahrnuje mikrobiální adhezi, sekreci extracelulárních polymerních látek a mikrobiální proliferaci [172]. Jak bylo uvedeno dříve, přítomnost biofilmu na povrchu mikroplastů může měnit jejich vlastnosti, jako je např. hustota, velikost povrchu, aj.

Mimo to může tvorba biofilmu na povrchu mikroplastů ovlivnit i jejich dostupnost pro vodní organismy – biofilm může do okolního vodního prostředí uvolňovat signály, tzv. infochemikálie, které přimějí organismy k tomu, aby mikroplasty požily. Tento jev je zvláště významný u organismů, které přijímají potravu selektivně a za běžných podmínek by tak částice mikroplastů nepožřely [220]. Dalším problémem spojeným s tvorbou biofilmu na povrchu mikroplastů je jeho potenciál transportovat patogeny, a to nejen napříč ekosystémem, ale i do těl živých organismů [221].

Jak vyplývá z našich výsledků, došlo v přítomnosti P3HB mikroplastů k určitému posunu mortality organismu *D. magna* oproti mortalitě organismů vystaveným konvenčním mikroplastům (PE, PET a PS). Vzhledem k tomu, že tento organismus je schopný mikroplasty P3HB pozřít, jak uvádíme v **Příloze B**, domníváme se, že příčinou pozorovaného časového posunu v mortalitě organismu *D. magna*, která byla pozorována až během chronických experimentů, mohl být právě rozvoj biofilmu. Předpokládáme, že organismy mohly s P3HB mikroplasty pozřít i biofilm přítomný na jejich povrchu a následně jej využít jako zdroj živin. K mechanickému zablokování jejich trávicího traktu tak dochází později, než tomu je v případně konvenčních mikroplastů, na jejichž povrchu se biofilm netvoří tak rychle (viz **Příloha A, Obrázek 5**).

Jak je uvedeno výše, biodegradace biodegradabilních polymerů není vždy zaručena. Primární problém je v tom, že se jedná o proces vyžadující specifické podmínky jako je teplota,

vlhkost, pH a přítomnost mikroorganismů [222]. V případě, že tyto podmínky nejsou splněny, degradabilita biodegradabilních a konvenčních mikroplastů je z hlediska životnosti podobná a oba typy materiálů tak přispívají k tvorbě plastového odpadu a podílejí se na znečištění životního prostředí [62, 223]. Navíc k tvorbě biodegradabilních mikroplastů může docházet rychleji, než je tomu v případě konvenčních materiálů [224]. Některé studie navíc ukázaly, že tvorba biofilmu na povrchu mikroplastů chrání tyto částice před působením UV záření a podporuje jejich usazování na dně vodního tělesa a omezuje tak rychlost jejich degradace [225].

Odpovědí na výzkumnou otázku 4 tedy je, že mikroplasty P3HB nevykazují žádný negativní akutní účinek na organismus *D. magna*, nicméně během chronických a multigeneračních experimentů dochází ke zvýšení mortality, snížení reprodukční aktivity a pomalejšímu růstu organismů. Tento jev je závislý nejen na koncentraci mikroplastů P3HB v testované suspenzi, ale i na velikosti částic – menší velikostní frakce způsobovala výraznější efekt. Domníváme se, že výše uvedené souvisí s požitím mikroplastů P3HB organismem *D. magna* a blokadí jeho trávicího traktu. Rovněž se zdá, že přítomnost biodegradabilních mikroplastů má potenciál být pro organismus *D. magna* nebezpečnější, než je tomu u konvenčních mikroplastů (tedy s ohledem na současné znalosti dané problematiky).

ZÁVĚR

S neustále rostoucím problémem se znečištěním životního prostředí plasty přitahují stále větší pozornost biodegradabilní plasty. Tyto nové materiály jsou v určitých aplikacích považovány za eko-náhradu konvenčních plastů. Předpokládá se, že by se tyto materiály měly v životním prostředí rozložit, biodegradovat na CO₂ (u aerobní biodegradace), CO₂ a CH₄ (v případě anaerobní biodegradace), H₂O a N₂. Problémem však je, že proces biodegradace vyžaduje specifické podmínky, jako je teplota, pH, vlhkost a přítomnost mikroorganismů, kterých není v životním prostředí vždy dosaženo. Pokud nejsou tyto podmínky splněny, je životnost konvenčních a biodegradabilních plastů v zásadě stejná a po vstupu do životního prostředí tak může docházet k jejich fragmentaci a tvorbě biodegradabilních mikroplastů. Jejich environmentální a ekologické účinky, jako je adsorpce a uvolňování toxických látek, včetně jejich role jako vektorů mikroorganismů a rostlin, je tedy potřeba studovat.

Zatím existuje málo studií, zabývajících se dopadem biodegradabilních mikroplastů na sladkovodní ekosystém. V naší práci bylo zjištěno, že přítomnost biodegradabilního P3HB během krátkodobého ani dlouhodobého testu nevyvolá negativní efekt na růst a obsah fotosyntetických pigmentů rostliny *L. minor*. Jediným pozorovaným efektem byl růst délky kořene spolu s rostoucí koncentrací P3HB v suspenzi. Jednoznačně negativní efekt na rychlost růstu v přítomnosti P3HB nebyl pozorován ani u řasy *D. subspicatus*. Během akutních experimentů s organismem *D. magna* rovněž nebyl zaznamenán negativní vliv na mortalitu. Nicméně, během dlouhodobých experimentů docházelo k nárůstu mortality, omezení růstu a reprodukční aktivity organismů. Navíc, jak ze všech našich experimentů vyplývá, menší částice měly větší negativní efekt na sledované organismy.

Pozorované efekty byly pravděpodobně způsobeny tvorbou biofilmu na povrchu biodegradabilních mikroplastů P3HB a s ním spojeným snížením koncentrace živin v médiu. K tvorbě biofilmu na povrchu mikroplastů dochází velmi rychle, vytvořený biofilm (a mikroorganismy v něm žijící) může jednak způsobit rychlejší vyčerpání živin ve vodním prostředí, ale rovněž má vliv na rychlost požití mikroplastů živými organismy. Vzhledem k tomu, že námi testované druhy organismů jsou základem potravy pro organismy vyšších trofických úrovních, může tak jejich prostřednictvím docházet i k ovlivnění dalších organismů. Je tedy zřejmé, že negativní vliv biodegradabilních mikroplastů na akvatický ekosystém může být za určitých podmínek srovnatelný, nebo dokonce i větší, než vliv konvenčních materiálů. Jejich využití a nakládání s nimi tedy vyžaduje pečlivé zvážení a je vždy nutné posoudit i jejich potenciální dopady na životní prostředí.

REFERENCE

- [1] HOSLER, Dorothy, Sandra L. BURKETT a Michael J. TARKANIAN. Prehistoric Polymers: Rubber Processing in Ancient Mesoamerica. *Science*. 1999, **284**(5422), 1988–1991. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.284.5422.1988
- [2] ANDRADY, Anthony L. a Mike A. NEAL. Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009, **364**(1526), 1977–1984. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2008.0304
- [3] SAUNDERS, C. W. a L. T. TAYLOR. A review of the synthesis, chemistry and analysis of nitrocellulose. *Journal of Energetic Materials*. 1990, **8**(3), 149–203. ISSN 0737-0652. Dostupné z: doi:10.1080/07370659008012572
- [4] KIM, Jaehwan, Sungryul YUN a Zoubeida OUNAIES. Discovery of Cellulose as a Smart Material. *Macromolecules*. 2006, **39**(12), 4202–4206. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma060261e
- [5] GEYER, Roland, Jenna R. JAMBECK a Kara Lavender LAW. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. 2017, **3**(7). ISSN 2375-2548. Dostupné z: doi:10.1126/sciadv.1700782
- [6] BROOKS, Amy L., Shunli WANG a Jenna R. JAMBECK. The Chinese import ban and its impact on global plastic waste trade. *Science Advances*. 2018, **4**(6). ISSN 2375-2548. Dostupné z: doi:10.1126/sciadv.aat0131
- [7] BAHL, Shashi, Jigmat DOLMA, Jashan JYOT SINGH a Shankar SEHGAL. Biodegradation of plastics: A state of the art review. *Materials Today: Proceedings*. 2021, **39**, 31–34. ISSN 22147853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2020.06.096
- [8] OECD. *Global Plastics Outlook: Economic Drivers, Environmental Impacts and Policy Options*. 2022. ISBN 9789264654945. Dostupné z: doi:10.1787/de747aef-en
- [9] PLASTICS EUROPE. *Plastics – the Facts 2022*. 2022. Dostupné z: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>
- [10] SUDESH, Kumar a Tadahisa IWATA. Sustainability of Biobased and Biodegradable Plastics. *CLEAN – Soil, Air, Water*. 2008, **36**(5–6), 433–442. ISSN 1863-0650. Dostupné z: doi:10.1002/clen.200700183
- [11] HUANG, Jan-Chan, Aditya S. SHETTY a Ming-Song WANG. Biodegradable plastics: A review. *Advances in Polymer Technology*. 1990, **10**(1), 23–30. ISSN 0730-6679. Dostupné z: doi:10.1002/adv.1990.060100103
- [12] HOPEWELL, Jefferson, Robert DVORAK a Edward KOSIOR. Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009, **364**(1526), 2115–2126. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2008.0311
- [13] SO, Mandy Wing Kwan, Lyle Dennis VORSATZ, Stefano CANNICCI a Christelle NOT. Fate of plastic in the environment: From macro to nano by macrofauna. *Environmental*

- Pollution*. 2022, **300**, 118920. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2022.118920
- [14] D'AMBRIÈRES, Woldemar. Plastics recycling worldwide: current overview and desirable changes. *Field Actions Science Reports*. 2019, (Special Issue 19), 12–21. ISSN 1867-8521. Dostupné z: <https://journals.openedition.org/factsreports/5102>
- [15] THOMPSON, Richard C. Plastic Debris in the Marine Environment: consequences and solutions. In: *Marine Nature Conservation in Europe*. Bonn: Federal Agency for Nature Conservation, 2006, s. 107–116. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/gch2.201900081>
- [16] SIVAN, Alex. New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, **22**(3), 422–426. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2011.01.013
- [17] WINTON, Debbie J., Lucy G. ANDERSON, Stephen ROCLIFFE a Steven LOISELLE. Macroplastic pollution in freshwater environments: Focusing public and policy action. *Science of The Total Environment*. 2020, **704**, 135242. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135242
- [18] JAMBECK, Jenna R., Roland GEYER, Chris WILCOX, Theodore R. SIEGLER, Miriam PERRYMAN, Anthony ANDRADY, Ramani NARAYAN a Kara Lavender LAW. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*. 2015, **347**(6223), 768–771. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1260352
- [19] COLE, Matthew, Pennie LINDEQUE, Claudia HALSBAND a Tamara S. GALLOWAY. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*. 2011, **62**(12), 2588–2597. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.025
- [20] DERRAIK, José G.B. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*. 2002, **44**(9), 842–852. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/S0025-326X(02)00220-5
- [21] GOLDBERG, Edward D. Diamonds and plastics are forever? *Marine Pollution Bulletin*. 1994, **28**(8), 466. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/0025-326X(94)90511-8
- [22] VERSCHOOR, A J. *Towards a definition of microplastics Considerations for the specification of physico-chemical properties*. 2015. Dostupné z: <https://rivm.openrepository.com/handle/10029/575986>
- [23] SHAH, Aamer Ali, Fariha HASAN, Abdul HAMEED a Safia AHMED. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 2008, **26**(3), 246–265. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2007.12.005
- [24] MENÉNDEZ-PEDRIZA, Albert a Joaquim JAUMOT. Interaction of Environmental Pollutants with Microplastics: A Critical Review of Sorption Factors, Bioaccumulation

- and Ecotoxicological Effects. *Toxics*. 2020, **8**(2), 40. ISSN 2305-6304. Dostupné z: doi:10.3390/toxics8020040
- [25] CARPENTER, Edward J. a K. L. SMITH. Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science*. 1972, **175**(4027), 1240–1241. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.175.4027.1240
- [26] THOMPSON, Richard C., Ylva OLSEN, Richard P. MITCHELL, Anthony DAVIS, Steven J. ROWLAND, Anthony W. G. JOHN, Daniel MCGONIGLE a Andrea E. RUSSELL. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science*. 2004, **304**(5672), 838–838. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1094559
- [27] FRIAS, J.P.G.L. a Roisin NASH. Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin*. 2019, **138**, 145–147. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2018.11.022
- [28] HARTMANN, Nanna B., Thorsten HÜFFER, Richard C. THOMPSON, Martin HASSELLÖV, Anja VERSCHOOR, Anders E. DAUGAARD, Sinja RIST, Therese KARLSSON, Nicole BRENNHOLT, Matthew COLE, Maria P. HERRLING, Maren C. HESS, Natalia P. IVLEVA, Amy L. LUSHER a Martin WAGNER. Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environmental Science & Technology*. 2019, **53**(3), 1039–1047. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.8b05297
- [29] BOUCHER, J. a D. FRIOT. *Primary microplastics in the oceans: A global evaluation of sources*. 2017. ISBN 9782831718279. Dostupné z: doi:10.2305/IUCN.CH.2017.01.en
- [30] AKDOGAN, Zeynep a Basak GUVEN. Microplastics in the environment: A critical review of current understanding and identification of future research needs. *Environmental Pollution*. 2019, **254**, 113011. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.113011
- [31] RODRÍGUEZ-SEIJO, Andrés a Ruth PEREIRA. Morphological and Physical Characterization of Microplastics. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*. 2017, s. 49–66. ISSN 0166526X. Dostupné z: doi:10.1016/bs.coac.2016.10.007
- [32] WALDSCHLÄGER, Kryss, Simone LECHTHALER, Georg STAUCH a Holger SCHÜTTRUMPF. The way of microplastic through the environment – Application of the source-pathway-receptor model (review). *Science of The Total Environment*. 2020, **713**, 136584. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136584
- [33] DUIS, Karen a Anja COORS. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental Sciences Europe*. 2016, **28**(1), 2. ISSN 2190-4707. Dostupné z: doi:10.1186/s12302-015-0069-y
- [34] WU, Mengjie, Wenchang TANG, Shaohua WU, Hongyu LIU a Chunping YANG. Fate and effects of microplastics in wastewater treatment processes. *Science of The Total*

- Environment*. 2021, **757**, 143902. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143902
- [35] SUN, Jing, Xiaohu DAI, Qilin WANG, Mark C.M. VAN LOOSDRECHT a Bing-Jie NI. Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal. *Water Research*. 2019, **152**, 21–37. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2018.12.050
- [36] MURPHY, Fionn, Ciaran EWINS, Frederic CARBONNIER a Brian QUINN. Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environmental Science & Technology*. 2016, **50**(11), 5800–5808. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.5b05416
- [37] CARR, Steve A., Jin LIU a Arnold G. TESORO. Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Research*. 2016, **91**, 174–182. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2016.01.002
- [38] HUDCOVÁ, Hana, Jan VYMAZAL a Miloš ROZKOŠNÝ. Present restrictions of sewage sludge application in agriculture within the European Union. *Soil and Water Research*. 2019, **14**(2), 104–120. ISSN 18015395. Dostupné z: doi:10.17221/36/2018-SWR
- [39] ZUBRIS, Kimberly Ann V. a Brian K. RICHARDS. Synthetic fibers as an indicator of land application of sludge. *Environmental Pollution*. 2005, **138**(2), 201–211. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2005.04.013
- [40] MINTENIG, Svenja, Ivo INT-VEEN, Martin LÖDER a Gunnar GERDTS. *Mikroplastik in ausgewählten Kläranlagen des Oldenburgisch-Ostfriesischen Wasserverbandes (OOWV) in Niedersachsen Probenanalyse mittels Mikro-FTIR Spektroskopie*. 2014. Dostupné z: [https://www.muell-im-meer.de/de/aktivitaeten/mikroplastik-ausgewaehlten-kläranlagen-des-oldenburgisch-ostfriesischen](https://www.muell-im-meer.de/de/aktivitaeten/mikroplastik-ausgewaehlten-klaeranlagen-des-oldenburgisch-ostfriesischen)
- [41] RITCHIE, Hannah. *Where does the plastic in our oceans come from?* 2021. Dostupné z: <https://ourworldindata.org/ocean-plastics>
- [42] WALDSCHLÄGER, Kryss a Holger SCHÜTTRUMPF. Effects of Particle Properties on the Settling and Rise Velocities of Microplastics in Freshwater under Laboratory Conditions. *Environmental Science & Technology*. 2019, **53**(4), 1958–1966. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.8b06794
- [43] LEBRETON, Laurent C. M., Joost VAN DER ZWET, Jan-Willem DAMSTEEG, Boyan SLAT, Anthony ANDRADY a Julia REISSER. River plastic emissions to the world's oceans. *Nature Communications*. 2017, **8**(1), 15611. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms15611
- [44] HORTON, Alice A. a Simon J. DIXON. Microplastics: An introduction to environmental transport processes. *WIREs Water*. 2018, **5**(2), e1268. ISSN 2049-1948. Dostupné z: doi:10.1002/wat2.1268

- [45] NIZZETTO, Luca, Gianbattista BUSSI, Martyn N. FUTTER, Dan BUTTERFIELD a Paul G. WHITEHEAD. A theoretical assessment of microplastic transport in river catchments and their retention by soils and river sediments. *Environmental Science: Processes & Impacts*. 2016, **18**(8), 1050–1059. ISSN 2050-7887. Dostupné z: doi:10.1039/C6EM00206D
- [46] MANI, Thomas, Sebastian PRIMPKE, Claudia LORENZ, Gunnar GERDTS a Patricia BURKHARDT-HOLM. Microplastic Pollution in Benthic Midstream Sediments of the Rhine River. *Environmental Science & Technology*. 2019, **53**(10), 6053–6062. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.9b01363
- [47] WATKINS, Lisa, Susan MCGRATTAN, Patrick J. SULLIVAN a M. Todd WALTER. The effect of dams on river transport of microplastic pollution. *Science of The Total Environment*. 2019, **664**, 834–840. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.02.028
- [48] VERMEIREN, Peter, Cynthia C. MUÑOZ a Kou IKEJIMA. Sources and sinks of plastic debris in estuaries: A conceptual model integrating biological, physical and chemical distribution mechanisms. *Marine Pollution Bulletin*. 2016, **113**(1–2), 7–16. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2016.10.002
- [49] KOOL, Merel, Egbert H. van NES, Marten SCHEFFER a Albert A. KOELMANS. Ups and Downs in the Ocean: Effects of Biofouling on Vertical Transport of Microplastics. *Environmental Science & Technology*. 2017, **51**(14), 7963–7971. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.6b04702
- [50] PORTER, Adam, Brett P. LYONS, Tamara S. GALLOWAY a Ceri LEWIS. Role of Marine Snows in Microplastic Fate and Bioavailability. *Environmental Science & Technology*. 2018, **52**(12), 7111–7119. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.8b01000
- [51] MARTIN, Jake, Amy LUSHER, Richard C. THOMPSON a Audrey MORLEY. The Deposition and Accumulation of Microplastics in Marine Sediments and Bottom Water from the Irish Continental Shelf. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), 10772. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-11079-2
- [52] SHAHUL HAMID, Fauziah, Mehran Sanam BHATTI, Norkhairiyah ANUAR, Norkhairah ANUAR, Priya MOHAN a Agamuthu PERIATHAMBY. Worldwide distribution and abundance of microplastic: How dire is the situation? *Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy*. 2018, **36**(10), 873–897. ISSN 0734-242X. Dostupné z: doi:10.1177/0734242X18785730
- [53] PAN, Ting, Haiqing LIAO, Fang YANG, Fuhong SUN, Youjun GUO, Hao YANG, Dongxia FENG, Xingxuan ZHOU a Qianqian WANG. Review of microplastics in lakes: sources, distribution characteristics, and environmental effects. *Carbon Research*. 2023, **2**(1), 25. ISSN 2731-6696. Dostupné z: doi:10.1007/s44246-023-00057-1
- [54] AUTA, H.S., C.U EMENIKE a S.H FAUZIAH. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential

- solutions. *Environment International*. 2017, **102**, 165–176. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2017.02.013
- [55] HORTON, Alice A., Alexander WALTON, David J. SPURGEON, Elma LAHIVE a Claus SVENDSEN. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of The Total Environment*. 2017, **586**, 127–141. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.190
- [56] CHAE, Yooeun a Youn-Joo AN. Effects of food presence on microplastic ingestion and egestion in *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*. 2020, **240**, 124855. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124855
- [57] TANAKA, Kosuke a Hideshige TAKADA. Microplastic fragments and microbeads in digestive tracts of planktivorous fish from urban coastal waters. *Scientific Reports*. 2016, **6**(1), 34351. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep34351
- [58] SUN, Xiao-Long, Hong XIANG, Hao-Qin XIONG, Yi-Chuan FANG a Yuan WANG. Bioremediation of microplastics in freshwater environments: A systematic review of biofilm culture, degradation mechanisms, and analytical methods. *Science of The Total Environment*. 2023, **863**, 160953. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.160953
- [59] DU, Sen, Rongwen ZHU, Yujie CAI, Ning XU, Pow-Seng YAP, Yunhai ZHANG, Yide HE a Yongjun ZHANG. Environmental fate and impacts of microplastics in aquatic ecosystems: a review. *RSC Advances*. 2021, **11**(26), 15762–15784. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/D1RA00880C
- [60] ANDRADY, Anthony L. The plastic in microplastics: A review. *Marine Pollution Bulletin*. 2017, **119**(1), 12–22. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2017.01.082
- [61] SHRUTI, V.C. a Gurusamy KUTRALAM-MUNIASAMY. Bioplastics: Missing link in the era of Microplastics. *Science of The Total Environment*. 2019, **697**, 134139. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134139
- [62] WANG, Can, Jiefa YU, Ying LU, Di HUA, Xiao WANG a Xuehua ZOU. Biodegradable microplastics (BMPs): a new cause for concern? *Environmental Science and Pollution Research*. 2021, **28**(47), 66511–66518. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-021-16435-4
- [63] 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*. 2009, **364**(1526), 2127–2139. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2008.0289
- [64] VROMAN, Isabelle a Lan TIGHZERT. Biodegradable Polymers. *Materials*. 2009, **2**(2), 307–344. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma2020307

- [65] RIBONI, Nicolò, Federica BIANCHI, Antonella CAVAZZA, Maurizio PIERGIOVANNI, Monica MATTAROZZI a Maria CARERI. Mass Spectrometry-Based Techniques for the Detection of Non-Intentionally Added Substances in Bioplastics. *Separations*. 2023, **10**(4), 222. ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.3390/separations10040222
- [66] NAIR, Lakshmi S. a Cato T. LAURENCIN. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007, **32**(8–9), 762–798. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017
- [67] HANKERMEYER, Christine R. a Ronald S. TJEERDEMA. Polyhydroxybutyrate: Plastic Made and Degraded by Microorganisms. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York: Springer, 1999, s. 1–24. ISSN 01795953. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4612-1496-0_1
- [68] HARTMANN, M. H. High Molecular Weight Polylactic Acid Polymers. In: *Biopolymers from Renewable Resources*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998, s. 367–411. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-662-03680-8_15
- [69] TOKIWA, Yutaka a Buenaventurada P. CALABIA. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, **72**(2), 244–251. ISSN 01757598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-006-0488-1
- [70] *Polylactic acid Mw ~60,000 | Sigma-Aldrich*. [vid. 2020-06-21]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/38534?lang=en®ion=CZ>
- [71] FERREIRA, Filipe V., Luciana S. CIVIDANES, Rubia F. GOUVEIA a Liliane M.F. LONA. An overview on properties and applications of poly(butylene adipate- co -terephthalate)–PBAT based composites. *Polymer Engineering & Science*. 2019, **59**(s2), E7–E15. ISSN 0032-3888. Dostupné z: doi:10.1002/pen.24770
- [72] KATHURIA, Ajay a Shanju ZHANG. Sustainable and Repulpable Barrier Coatings for Fiber-Based Materials for Food Packaging: A Review. *Frontiers in Materials* [online]. 2022, **9**. ISSN 2296-8016. Dostupné z: doi:10.3389/fmats.2022.929501
- [73] LUENGO, José M, Belén GARCÍA, Angel SANDOVAL, Germán NAHARRO a Elías R OLIVERA. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*. 2003, **6**(3), 251–260. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-5274(03)00040-7
- [74] LENZ, Robert W. a Robert H. MARCHESSAULT. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules*. 2005, **6**(1), 1–8. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm049700c
- [75] DOS SANTOS, Antonio José, Luiz Veriano OLIVEIRA DALLA VALENTINA, Andrey Alayo HIDALGO SCHULZ a Márcia Adriana TOMAZ DUARTE. From Obtaining to Degradation of PHB:Material Properties. Part I. *Ingeniería y Ciencia*. 2017, **13**(26), 269–298. ISSN 17949165. Dostupné z: doi:10.17230/ingciencia.13.26.10
- [76] SHIMAO, Masayuki. Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001, **12**(3), 242–247. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/S0958-1669(00)00206-8

- [77] ANSARI, Sabbir a Tasneem FATMA. Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization. *PLOS ONE*. 2016, **11**(6), e0158168. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0158168
- [78] SAVENKOVA, L, Z GERBERGA, V NIKOLAEVA, A DZENE, I BIBERS a M KALNIN. Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films. *Process Biochemistry*. 2000, **35**(6), 573–579. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-9592(99)00107-7
- [79] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Sinisa PETRIK, Jana OBORNA, Radek PRIKRYL a Ivana MAROVA. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry*. 2014, **49**(9), 1409–1414. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2014.05.013
- [80] FOJT, Jakub, Jan DAVID, Radek PŘIKRYL, Veronika ŘEZÁČOVÁ a Jiří KUČERÍK. A critical review of the overlooked challenge of determining micro-bioplastics in soil. *Science of The Total Environment*. 2020, **745**, 140975. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140975
- [81] BAGHERI, Amir Reza, Christian LAFORSCH, Andreas GREINER a Seema AGARWAL. Fate of So-Called Biodegradable Polymers in Seawater and Freshwater. *Global Challenges*. 2017, **1**(4), 1700048. ISSN 2056-6646. Dostupné z: doi:10.1002/gch2.201700048
- [82] OBRUCA, Stanislav, Ivana MAROVA, Ondrej SNAJDAR, Ludmila MRAVCOVA a Zdenek SVOBODA. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters*. 2010, **32**(12), 1925–1932. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-010-0376-8
- [83] MANIKANDAN, N. Arul, Kannan PAKSHIRAJAN a G. PUGAZHENTHI. Techno-economic assessment of a sustainable and cost-effective bioprocess for large scale production of polyhydroxybutyrate. *Chemosphere*. 2021, **284**, 131371. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131371
- [84] *Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] natural origin | Sigma-Aldrich* [online]. [vid. 2020-06-21]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/363502?lang=en®ion=CZ>
- [85] DOS SANTOS, Antonio José, Luiz Veriano OLIVEIRA DALLA VALENTINA, Andrey Alayo HIDALGO SCHULZ a Marcia Adriana TOMAZ DUARTE. From obtaining to degradation of PHB: A literature review. Part II. *Ingeniería y Ciencia*. 2018, **14**(27), 207–228. ISSN 17949165. Dostupné z: doi:10.17230/ingciencia.14.27.9
- [86] EUROPEAN BIOPLASTICS. *Bioplastics market development update 2022*. [vid. 2023-11-29]. Dostupné z: <https://www.european-bioplastics.org/market/#>
- [87] LEE, Wing-Hin, Mohd N.M. AZIZAN a Kumar SUDESH. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by

- Comamonas acidovorans. *Polymer Degradation and Stability*. 2004, **84**(1), 129–134. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polyimdegradstab.2003.10.003
- [88] MIRI, Saba, Rahul SAINI, Seyyed Mohammadreza DAVOODI, Rama PULICHARLA, Satinder Kaur BRAR a Sara MAGDOULI. Biodegradation of microplastics: Better late than never. *Chemosphere*. 2022, **286**, 131670. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131670
- [89] WEINSTEIN, John E., Brittany K. CROCKER a Austin D. GRAY. From macroplastic to microplastic: Degradation of high-density polyethylene, polypropylene, and polystyrene in a salt marsh habitat. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2016, **35**(7), 1632–1640. ISSN 0730-7268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.3432
- [90] RU, Jiakang, Yixin HUO a Yu YANG. Microbial Degradation and Valorization of Plastic Wastes. *Frontiers in Microbiology*. 2020, **11**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.00442
- [91] CHAMAS, Ali, Hyunjin MOON, Jiajia ZHENG, Yang QIU, Tarnuma TABASSUM, Jun Hee JANG, Mahdi ABU-OMAR, Susannah L. SCOTT a Sangwon SUH. Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2020, **8**(9), 3494–3511. ISSN 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.9b06635
- [92] LUCAS, Nathalie, Christophe BIENAIME, Christian BELLOY, Michèle QUENEUDEC, Françoise SILVESTRE a José-Edmundo NAVA-SAUCEDO. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere*. 2008, **73**(4), 429–442. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.064
- [93] HAIDER, Tobias P., Carolin VÖLKER, Johanna KRAMM, Katharina LANDFESTER a Frederik R. WURM. Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. *Angewandte Chemie International Edition*. 2019, **58**(1), 50–62. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201805766
- [94] SUZUKI, Miwa, Yuya TACHIBANA a Ken-ichi KASUYA. Biodegradability of poly(3-hydroxyalkanoate) and poly(ϵ -caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments. *Polymer Journal*. 2021, **53**(1), 47–66. ISSN 0032-3896. Dostupné z: doi:10.1038/s41428-020-00396-5
- [95] TOKIWA, Yutaka, Buenaventurada CALABIA, Charles UGWU a Seiichi AIBA. Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009, **10**(9), 3722–3742. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms10093722
- [96] SUN, Jing, Xiaohu DAI, Qilin WANG, Mark C.M. VAN LOOSDRECHT a Bing Jie NI. *Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal*, ISSN 18792448. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2018.12.050
- [97] ELERT, Anna M., Roland BECKER, Erik DUEMICHEN, Paul EISENTRAUT, Jana FALKENHAGEN, Heinz STURM a Ulrike BRAUN. Comparison of different methods for MP detection: What can we learn from them, and why asking the right question before

- measurements matters? *Environmental Pollution*. 2017, **231**, 1256–1264. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2017.08.074
- [98] SILVA, Ana B., Ana S. BASTOS, Celine I.L. JUSTINO, João P. DA COSTA, Armando C. DUARTE a Teresa A.P. ROCHA-SANTOS. Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry - A review. *Analytica Chimica Acta*. 2018, **1017**, 1–19. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2018.02.043
- [99] ZHANG, Shaoliang, Xiaomei YANG, Hennie GERTSEN, Piet PETERS, Tamás SALÁNKI a Violette GEISSEN. A simple method for the extraction and identification of light density microplastics from soil. *Science of The Total Environment*. 2018, **616–617**, 1056–1065. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.213
- [100] BLÄSING, Melanie a Wulf AMELUNG. Plastics in soil: Analytical methods and possible sources. *Science of The Total Environment*. 2018, **612**, 422–435. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.086
- [101] 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*. 2018, **109**, 163–172. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.10.006
- [102] SHIM, Won Joon, Sang Hee HONG a Soeun Eo EO. Identification methods in microplastic analysis: a review. *Analytical Methods*. 2017, **9(9)**, 1384–1391. ISSN 1759-9660. Dostupné z: doi:10.1039/C6AY02558G
- [103] DÜMICHEN, Erik, Paul EISENTRAUT, Claus Gerhard BANNICK, Anne-Kathrin BARTHEL, Rainer SENZ a Ulrike BRAUN. Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method. *Chemosphere*. 2017, **174**, 572–584. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.02.010
- [104] DAVID, Jan, Helena Doležalová WEISSMANNOVÁ, Zacharias STEINMETZ, Lucie KABELÍKOVÁ, Michael Scott DEMYAN, Jana ŠIMEČKOVÁ, David TOKARSKI, Christian SIEWERT, Gabriele E. SCHAUMANN a Jiří KUČERÍK. Introducing a soil universal model method (SUMM) and its application for qualitative and quantitative determination of poly(ethylene), poly(styrene), poly(vinyl chloride) and poly(ethylene terephthalate) microplastics in a model soil. *Chemosphere*. 2019, **225**, 810–819. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.03.078
- [105] HESSELMANN, Rolf P.X., Thomas FLEISCHMANN, Roland HANY a Alexander J.B. ZEHNDER. Determination of polyhydroxyalkanoates in activated sludge by ion chromatographic and enzymatic methods. *Journal of Microbiological Methods*. 1999, **35(2)**, 111–119. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7012(98)00107-9
- [106] ARRIETA, Marina Patricia, Francisco PARRÉS, Juan LÓPEZ a Alfonso JIMÉNEZ. Development of a novel pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry method for the analysis of poly(lactic acid) thermal degradation products. *Journal of Analytical and*

- Applied Pyrolysis*. 2013, **101**, 150–155. ISSN 01652370. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaap.2013.01.017
- [107] COLE, Matthew, Pennie LINDEQUE, Elaine FILEMAN, Claudia HALSBAND, Rhys GOODHEAD, Julian MOGER a Tamara S. GALLOWAY. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science and Technology*. 2013, **47**(12), 6646–6655. ISSN 0013936X. Dostupné z: doi:10.1021/es400663f
- [108] SCHERER, Christian, Nicole BRENNHOLT, Georg REIFFERSCHIED a Martin WAGNER. Feeding type and development drive the ingestion of microplastics by freshwater invertebrates. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), 17006. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-17191-7
- [109] RIST, Sinja, Anders BAUN a Nanna B. HARTMANN. Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environmental Pollution*. 2017, **228**, 398–407. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2017.05.048
- [110] SADLER, Daniel E., Franziska S. BRUNNER a Stewart J. PLAISTOW. Temperature and clone-dependent effects of microplastics on immunity and life history in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*. 2019, **255**, 113178. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.113178
- [111] FRYDKJÆR, Camilla Krogh, Niels IVERSEN a Peter ROSLEV. Ingestion and Egestion of Microplastics by the Cladoceran *Daphnia magna*: Effects of Regular and Irregular Shaped Plastic and Sorbed Phenanthrene. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2017, **99**(6), 655–661. ISSN 0007-4861. Dostupné z: doi:10.1007/s00128-017-2186-3
- [112] KOKALJ, Anita Jemec, Urban KUNEJ a Tina SKALAR. Screening study of four environmentally relevant microplastic pollutants: Uptake and effects on *Daphnia magna* and *Artemia franciscana*. *Chemosphere*. 2018, **208**, 522–529. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2018.05.172
- [113] CANNIFF, Patrick M. a Tham C. HOANG. Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal growth. *Science of The Total Environment*. 2018, **633**, 500–507. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.176
- [114] DE FELICE, Beatrice, Valentina SABATINI, Stefano ANTENUCCI, Giacomo GATTONI, Nadia SANTO, Renato BACCHETTA, Marco Aldo ORTENZI a Marco PAROLINI. Polystyrene microplastics ingestion induced behavioral effects to the cladoceran *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 2019, **231**, 423–431. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.05.115
- [115] KIM, Dokyung, Haemi KIM a Youn-Joo AN. Effects of synthetic and natural microfibers on *Daphnia magna*—Are they dependent on microfiber type? *Aquatic Toxicology*. 2021, **240**, 105968. ISSN 0166445X. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquatox.2021.105968

- [116] JEMEC, Anita, Petra HORVAT, Urban KUNEJ, Marjan BELE a Andrej KRŽAN. Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*. 2016, **219**, 201–209. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2016.10.037
- [117] ELIZALDE-VELÁZQUEZ, Armando, Analicia M. CARCANO, Jordan CRAGO, Micah J. GREEN, Smit A. SHAH a Jaclyn E. CAÑAS-CARRELL. Translocation, trophic transfer, accumulation and depuration of polystyrene microplastics in *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Environmental Pollution*. 2020, **259**, 113937. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2020.113937
- [118] SCHÜR, Christoph, Sinja RIST, Anders BAUN, Philipp MAYER, Nanna B. HARTMANN a Martin WAGNER. When Fluorescence Is not a Particle: The Tissue Translocation of Microplastics in *Daphnia magna* Seems an Artifact. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2019, **38**(7), 1495–1503. ISSN 0730-7268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.4436
- [119] HOFFSCHRÖER, Nadine, Niklas GRASSL, Arne STEINMETZ, Lukas SZIEGOLEIT, Marita KOCH a Bettina ZEIS. Microplastic burden in *Daphnia* is aggravated by elevated temperatures. *Zoology*. 2021, **144**, 125881. ISSN 09442006. Dostupné z: doi:10.1016/j.zool.2020.125881
- [120] CASTRO, Gleyson B., Aline C. BERNEGOSSI, Mayara C. FELIPE a Juliano J. CORBI. Is the development of *Daphnia magna* neonates affected by short-term exposure to polyethylene microplastics? *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 2020, **55**(8), 935–946. ISSN 1093-4529. Dostupné z: doi:10.1080/10934529.2020.1756656
- [121] LIN, Hui, Yinqiu YUAN, Xiaoman JIANG, Jian-Ping ZOU, Xinghui XIA a Shenglian LUO. Bioavailability quantification and uptake mechanisms of pyrene associated with different-sized microplastics to *Daphnia magna*. *Science of The Total Environment*. 2021, **797**, 149201. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149201
- [122] COLOMER, Jordi, Mara F. MÜLLER, Aina BARCELONA a Teresa SERRA. Mediated food and hydrodynamics on the ingestion of microplastics by *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*. 2019, **251**, 434–441. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.05.034
- [123] WANG, Mengjing a Wen-Xiong WANG. Selective ingestion and response by *Daphnia magna* to environmental challenges of microplastics. *Journal of Hazardous Materials*. 2023, **458**, 131864. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2023.131864
- [124] NAKANO, Risa, Ridvan Kaan GÜRSES, Yuji TANAKA, Yasuyuki ISHIDA, Takashi KIMOTO, Shinya KITAGAWA, Yoshinori IIGUNI a Hajime OHTANI. Pyrolysis-GC-MS analysis of ingested polystyrene microsphere content in individual *Daphnia magna*. *Science of The Total Environment*. 2022, **817**, 152981. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.152981
- [125] KLUN, Barbara, Ula ROZMAN, Monika OGRIZEK a Gabriela KALČÍKOVÁ. The first plastic produced, but the latest studied in microplastics research: The assessment of leaching,

- ecotoxicity and bioadhesion of Bakelite microplastics. *Environmental Pollution*. 2022, **307**, 119454. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2022.119454
- [126] ANBUMANI, Sadasivam a Poonam KAKKAR. Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018, **25**(15), 14373–14396. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-018-1999-x
- [127] CESCHIN, Simona, Flaminia MARIANI, Dario DI LERNIA, Iole VENDITTI, Emanuele PELELLA a Maria Adelaide IANNELLI. Effects of Microplastic Contamination on the Aquatic Plant *Lemna minuta* (Least Duckweed). *Plants*. 2023, **12**(1), 207. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants12010207
- [128] ZARFL, Christiane a Michael MATTHIES. Are marine plastic particles transport vectors for organic pollutants to the Arctic? *Marine Pollution Bulletin*. 2010, **60**(10), 1810–1814. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2010.05.026
- [129] YURTSEVER, Meral. Glitters as a Source of Primary Microplastics: An Approach to Environmental Responsibility and Ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. 2019, **32**(3), 459–478. ISSN 1187-7863. Dostupné z: doi:10.1007/s10806-019-09785-0
- [130] ANDRADY, Anthony L. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 2011, **62**(8), 1596–1605. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.030
- [131] OEHLMANN, Jörg, Ulrike SCHULTE-OEHLMANN, Werner KLOAS, Oana JAGNYTSCH, Ilka LUTZ, Kresten O. KUSK, Leah WOLLENBERGER, Eduarda M. SANTOS, Gregory C. PAULL, Katrien J. W. VAN LOOK a Charles R. TYLER. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009, **364**(1526), 2047–2062. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2008.0242
- [132] S. WEIS, Judith. Improving microplastic research. *AIMS Environmental Science*. 2019, **6**(5), 326–340. ISSN 2372-0352. Dostupné z: doi:10.3934/environsci.2019.5.326
- [133] RILLIG, Matthias C., Lisa ZIERSCH a Stefan HEMPEL. Microplastic transport in soil by earthworms. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), 1362. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-01594-7
- [134] KALČÍKOVÁ, Gabriela. Aquatic vascular plants – A forgotten piece of nature in microplastic research. *Environmental Pollution*. 2020, **262**, 114354. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2020.114354
- [135] CESCHIN, Simona, Amii BELLINI a Massimiliano SCALICI. Aquatic plants and ecotoxicological assessment in freshwater ecosystems: a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021, **28**(5), 4975–4988. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-020-11496-3

- [136] KALČÍKOVÁ, Gabriela, Andreja ŽGAJNAR GOTVAJN, Aleš KLADNIK a Anita JEMEC. Impact of polyethylene microbeads on the floating freshwater plant duckweed *Lemna minor*. *Environmental Pollution*. 2017, **230**, 1108–1115. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2017.07.050
- [137] BHATTACHARYA, Priyanka, Sijie LIN, James P. TURNER a Pu Chun KE. Physical Adsorption of Charged Plastic Nanoparticles Affects Algal Photosynthesis. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2010, **114**(39), 16556–16561. ISSN 1932-7447. Dostupné z: doi:10.1021/jp1054759
- [138] BROWNE, Mark A., Awantha DISSANAYAKE, Tamara S. GALLOWAY, David M. LOWE a Richard C. THOMPSON. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science and Technology*. 2008, **42**(13), 5026–5031 [vid. 2021-04-20]. ISSN 0013936X. Dostupné z: doi:10.1021/es800249a
- [139] DE SÁ, Luís Carlos, Miguel OLIVEIRA, Francisca RIBEIRO, Thiago Lopes ROCHA a Martyn Norman FUTTER. Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Science of The Total Environment*. 2018, **645**, 1029–1039. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.207
- [140] CASTRO, Daniela Grijó de, Ana Luiza Fonseca DESTRO, Eder Carlos Lopes COIMBRA, Aurea Luiza Lemes da SILVA a Ann Honor MOUNTEER. Effects of PET microplastics on the freshwater crustacean *Daphnia similis* Claus, 1976. *Acta Limnologica Brasiliensia*. 2023, **35**. ISSN 2179-975X. Dostupné z: doi:10.1590/s2179-975x4422
- [141] REHSE, Saskia, Werner KLOAS a Christiane ZARFL. Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 2016, **153**, 91–99. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.133
- [142] JAIKUMAR, Gayathri, Jan BAAS, Nadja R. BRUN, Martina G. VIJVER a Thijs BOSKER. Acute sensitivity of three Cladoceran species to different types of microplastics in combination with thermal stress. *Environmental Pollution*. 2018, **239**, 733–740. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2018.04.069
- [143] JAIKUMAR, Gayathri, Nadja R. BRUN, Martina G. VIJVER a Thijs BOSKER. Reproductive toxicity of primary and secondary microplastics to three cladocerans during chronic exposure. *Environmental Pollution*. 2019, **249**, 638–646. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.03.085
- [144] ELTEMSAH, Yehia Sayed a Thomas BØHN. Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*. 2019, **254**, 112919. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.07.087
- [145] BOSKER, Thijs, Gabriël OLT Hof, Martina G. VIJVER, Jan BAAS a S. Henrik BARMENTLO. Significant decline of *Daphnia magna* population biomass due to microplastic exposure.

- Environmental Pollution*. 2019, **250**, 669–675 [vid. 2021-04-20]. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.04.067
- [146] MARTINS, Alexandra a Lúcia GUILHERMINO. Transgenerational effects and recovery of microplastics exposure in model populations of the freshwater cladoceran *Daphnia magna* Straus. *Science of The Total Environment*. 2018, **631–632**, 421–428. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.054
- [147] ZEBROWSKI, Marcin Lukasz, Ewa BABKIEWICZ, Aleksandra BŁAŻEJEWSKA, Szymon PUKOS, Julia WAWRZEŃCZAK, Wojciech WILCZYNSKI, Jacek ZEBROWSKI, Mirosław ŚLUSARCZYK a Piotr MASZCZYK. The effect of microplastics on the interspecific competition of *Daphnia*. *Environmental Pollution*. 2022, **313**, 120121. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2022.120121
- [148] SAVVA, Katerina, Marinella FARRÉ a Carlos BARATA. Sublethal effects of bio-plastic microparticles and their components on the behaviour of *Daphnia magna*. *Environmental Research*. 2023, **236**, 116775. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2023.116775
- [149] ZIMMERMANN, Lisa, Sarah GÖTTLICH, Jörg OEHLMANN, Martin WAGNER a Carolin VÖLKER. What are the drivers of microplastic toxicity? Comparing the toxicity of plastic chemicals and particles to *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*. 2020, **267**, 115392. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2020.115392
- [150] MAO, Yufeng, Hainan AI, Yi CHEN, Zhenyu ZHANG, Peng ZENG, Li KANG, Wei LI, Weikang GU, Qiang HE a Hong LI. Phytoplankton response to polystyrene microplastics: Perspective from an entire growth period. *Chemosphere*. 2018, **208**, 59–68. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2018.05.170
- [151] WU, Yanmei, Peiyong GUO, Xiaoyan ZHANG, Yuxuan ZHANG, Shuting XIE a Jun DENG. Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater algae. *Journal of Hazardous Materials*. 2019, **374**, 219–227. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2019.04.039
- [152] TUNALI, Merve, Edwin Nnaemeka UZOEFUNA, Mehmet Meric TUNALI a Orhan YENIGUN. Effect of microplastics and microplastic-metal combinations on growth and chlorophyll a concentration of *Chlorella vulgaris*. *Science of The Total Environment*. 2020, **743**, 140479. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140479
- [153] LI, Shuangxi, Panpan WANG, Chao ZHANG, Xiangjun ZHOU, Zhihong YIN, Tianyi HU, Dan HU, Chenchen LIU a Liandong ZHU. Influence of polystyrene microplastics on the growth, photosynthetic efficiency and aggregation of freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Science of The Total Environment*. 2020, **714**, 136767. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136767
- [154] WANG, Qiongjie, Xiaoxue WANGJIN, Yong ZHANG, Ningxin WANG, Yulai WANG, Guanhua MENG a Yihua CHEN. The toxicity of virgin and UV-aged PVC microplastics on the growth of freshwater algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Science of The Total*

- Environment*. 2020, **749**, 141603. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141603
- [155] MATEOS-CÁRDENAS, Alicia, David T. SCOTT, Gulzara SEITMAGANBETOVA, van Pelt FRANK N.A.M., O'Halloran JOHN a Jansen MARCEL A.K. Polyethylene microplastics adhere to *Lemna minor* (L.), yet have no effects on plant growth or feeding by *Gammarus duebeni* (Lillj.). *Science of The Total Environment*. 2019, **689**, 413–421. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.359
- [156] ROZMAN, Ula, Tilen TURK, Tina SKALAR, Marija ZUPANČIČ, Nataša ČELAN KOROŠIN, Marjan MARINŠEK, Jesus OLIVERO-VERBEL a Gabriela KALČÍKOVÁ. An extensive characterization of various environmentally relevant microplastics – Material properties, leaching and ecotoxicity testing. *Science of The Total Environment*. 2021, **773**, 145576. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145576
- [157] ROZMAN, Ula, Anita JEMEC KOKALJ, Andraž DOLAR, Damjana DROBNE a Gabriela KALČÍKOVÁ. Long-term interactions between microplastics and floating macrophyte *Lemna minor*: The potential for phytoremediation of microplastics in the aquatic environment. *Science of The Total Environment*. 2022, **831**, 154866. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.154866
- [158] SINTIM, Henry Y., Andy I. BARY, Douglas G. HAYES, Marie E. ENGLISH, Sean M. SCHAEFFER, Carol A. MILES, Alla ZELENYUK, Kaitlyn SUSKI a Markus FLURY. Release of micro- and nanoparticles from biodegradable plastic during in situ composting. *Science of The Total Environment*. 2019, **675**, 686–693 [vid. 2023-01-04]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2019.04.179
- [159] OECD. *Test No. 221: Lemna sp. Growth Inhibition Test*. 2006. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. ISBN 9789264016194. Dostupné z: doi:10.1787/9789264016194-en
- [160] CUI, Rongxue, Jin Il KWAK a Youn-Joo AN. Multigenerational effects of microplastic fragments derived from polyethylene terephthalate bottles on duckweed *Lemna minor*: Size-dependent effects of microplastics on photosynthesis. *Science of The Total Environment*. 2023, **872**, 162159. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2023.162159
- [161] ROZMAN, Ula a Gabriela KALČÍKOVÁ. The Response of Duckweed *Lemna minor* to Microplastics and Its Potential Use as a Bioindicator of Microplastic Pollution. *Plants*. 2022, **11**(21), 2953. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants11212953
- [162] LI, Ling, Markus SILLANPÄÄ, Meri TUOMINEN, Kari LOUNATMAA a Eija SCHULTZ. Behavior of titanium dioxide nanoparticles in *Lemna minor* growth test conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013, **88**, 89–94. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2012.10.024

- [163] HERMANS, Christian, John P. HAMMOND, Philip J. WHITE a Nathalie VERBRUGGEN. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science*. 2006, **11**(12), 610–617. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2006.10.007
- [164] CEDERGREEN, Nina a Tom Vindbæk MADSEN. Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*. *New Phytologist*. 2002, **155**(2), 285–292. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00463.x
- [165] HE, Beibei, Godfred O. DUODU, Llew RINTOUL, Godwin A. AYOKO a Ashantha GOONETILLEKE. Influence of microplastics on nutrients and metal concentrations in river sediments. *Environmental Pollution*. 2020, **263**, 114490. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2020.114490
- [166] FOJT, Jakub, Pavla DENKOVÁ, Martin BRTNICKÝ, Jiří HOLÁTKO, Veronika ŘEZÁČOVÁ, Václav PECINA a Jiří KUČERÍK. Influence of Poly-3-hydroxybutyrate Micro-Bioplastics and Polyethylene Terephthalate Microplastics on the Soil Organic Matter Structure and Soil Water Properties. *Environmental Science & Technology*. 2022, **56**(15), 10732–10742. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.2c01970
- [167] SWIONTEK BRZEZINKA, Maria, Agnieszka RICHERT, Agnieszka KALWASIŃSKA, Joanna ŚWIĄTCZAK, Edyta DEJA-SIKORA, Maciej WALCZAK, Marta MICHALSKA-SIONKOWSKA, Katarzyna PIEKARSKA a Beata KACZMAREK-SZCZEPAŃSKA. Microbial degradation of polyhydroxybutyrate with embedded polyhexamethylene guanidine derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, **187**, 309–318. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.07.135
- [168] SOORIYAKUMAR, Prasanthi, Nanthi BOLAN, Manish KUMAR, Lal SINGH, Ying YU, Yang LI, Chanusha WERALUPITIYA, Meththika VITHANAGE, Sammani RAMANAYAKA, Binoy SARKAR, Fang WANG, Deirdre B. GLEESON, Dongke ZHANG, M.B. KIRKHAM, Jörg RINKLEBE a Kadambot H. M SIDDIQUE. Biofilm formation and its implications on the properties and fate of microplastics in aquatic environments: A review. *Journal of Hazardous Materials Advances*. 2022, **6**, 100077. ISSN 27724166. Dostupné z: doi:10.1016/j.hazadv.2022.100077
- [169] OKEKE, Emmanuel Sunday, Timothy Prince Chidike EZEORBA, Yao CHEN, Guanghua MAO, Weiwei FENG a Xiangyang WU. Ecotoxicological and health implications of microplastic-associated biofilms: a recent review and prospect for turning the hazards into benefits. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022, **29**(47), 70611–70634. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-022-22612-w
- [170] WANG, Jianlong, Xuan GUO a Jianming XUE. Biofilm-Developed Microplastics As Vectors of Pollutants in Aquatic Environments. *Environmental Science & Technology*. 2021, **55**(19), acs.est.1c04466. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.1c04466
- [171] LOBELLE, Delphine a Michael CUNLIFFE. Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin*. 2011, **62**(1), 197–200. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2010.10.013

- [172] TU, Chen, Tao CHEN, Qian ZHOU, Ying LIU, Jing WEI, Joanna J. WANIEK a Yongming LUO. Biofilm formation and its influences on the properties of microplastics as affected by exposure time and depth in the seawater. *Science of The Total Environment*. 2020, **734**, 139237. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139237
- [173] HE, Siying, Meiyong JIA, Yinping XIANG, Biao SONG, Weiping XIONG, Jiao CAO, Haihao PENG, Yang YANG, Wenjun WANG, Zhaohui YANG a Guangming ZENG. Biofilm on microplastics in aqueous environment: Physicochemical properties and environmental implications. *Journal of Hazardous Materials*. 2022, **424**, 127286. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127286
- [174] CHEN, Xianchuan, Xiaofei CHEN, Yanhui ZHAO, Hane ZHOU, Xiong XIONG a Chenxi WU. Effects of microplastic biofilms on nutrient cycling in simulated freshwater systems. *Science of The Total Environment*. 2020, **719**, 137276. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137276
- [175] POSPISILOVA, Aneta, Ivana NOVACKOVA a Radek PRIKRYL. Isolation of poly(3-hydroxybutyrate) from bacterial biomass using soap made of waste cooking oil. *Bioresource Technology*. 2021, **326**, 124683. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124683
- [176] ARTS, Gertie H.P., J. Dick M. BELGERS, Conny H. HOEKZEMA a Jac T.N.M. THISSEN. Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environmental Pollution*. 2008, **153**(1), 199–206. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2007.07.019
- [177] BRTNICKY, M., V. PECINA, J. HOLATKO, T. HAMMERSCHMIEDT, A. MUSTAFA, A. KINTL, J. FOJT, T. BALTAZAR a J. KUCERIK. Effect of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate amendment on the soil biochemical properties and fertility under varying sand loads. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2022, **9**(1), 75. ISSN 2196-5641. Dostupné z: doi:10.1186/s40538-022-00345-9
- [178] KUL, Raziye, Melek EKINCI, Metin TURAN, Selda ORS a Ertan YILDIRIM. How Abiotic Stress Conditions Affects Plant Roots. In: *Plant Roots*. 2021. ISBN 978-1-83968-276-6. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.95286
- [179] MU, Xiaohuan a Yanling CHEN. The physiological response of photosynthesis to nitrogen deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2021, **158**, 76–82. ISSN 09819428. Dostupné z: doi:10.1016/j.plaphy.2020.11.019
- [180] OZENGIN, Nihan a Ayse ELMACI. Performance of duckweed (*Lemna minor* L.) on different types of wastewater treatment. *Journal of environmental biology*. 2007, **28**(2), 307–14. ISSN 0254-8704.
- [181] MECHORA, Špela, Vekoslava STIBILJ a Mateja GERM. Response of duckweed to various concentrations of selenite. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015, **22**(4), 2416–2422. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-014-3270-4

- [182] LIAO, Baolin, Junjie WANG, Baohua XIAO, Xiaodong YANG, Ziqiang XIE, Dongdong LI a Chengyong LI. Effects of acute microplastic exposure on physiological parameters in *Tubastrea aurea* corals. *Marine Pollution Bulletin*. 2021, **165**, 112173. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2021.112173
- [183] ALKIMIN, G.D., D. DANIEL, S. FRANKENBACH, J. SERÔDIO, A.M.V.M. SOARES, C. BARATA a B. NUNES. Evaluation of pharmaceutical toxic effects of non-standard endpoints on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Science of The Total Environment*. 2019, **657**, 926–937. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2018.12.002
- [184] ARÍSTEGUI, Javier a María F. MONTERO. Plankton community respiration in Bransfield Strait (Antarctic Ocean) during austral spring. *Journal of Plankton Research*. 1995, **17**(8), 1647–1659. ISSN 0142-7873. Dostupné z: doi:10.1093/plankt/17.8.1647
- [185] OCKENDEN, Amy, Louis A. TREMBLAY, Nadia DIKAREVA a Kevin S. SIMON. Towards more ecologically relevant investigations of the impacts of microplastic pollution in freshwater ecosystems. *Science of The Total Environment*. 2021, **792**, 148507. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148507
- [186] TANG, Yuanqiang, Yunguo LIU, Yu CHEN, Wei ZHANG, Jianmin ZHAO, Shaoyao HE, Chunping YANG, Tao ZHANG, Chunfang TANG, Chen ZHANG a Zisong YANG. A review: Research progress on microplastic pollutants in aquatic environments. *Science of The Total Environment*. 2021, **766**, 142572. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142572
- [187] OECD. *Test No. 201: Alga, Growth Inhibition Test*. 2006. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. ISBN 9789264069923. Dostupné z: doi:10.1787/9789264069923-en
- [188] YAAKOB, Maizatul Azrina, Radin Maya Saphira Radin MOHAMED, Adel AL-GHEETHI, Ravishankar ASWATHNARAYANA GOKARE a Ranga Rao AMBATI. Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview. *Cells*. 2021, **10**(2), 393. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells10020393
- [189] YANG, Lei, Jun CHEN, Shan QIN, Min ZENG, Yongguang JIANG, Lang HU, Peng XIAO, Wenlong HAO, Zhangli HU, Anping LEI a Jiangxin WANG. Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels*. 2018, **11**(1), 40. ISSN 1754-6834. Dostupné z: doi:10.1186/s13068-018-1041-z
- [190] SU, Yuanyuan, Zhiruo CHENG, Yipeng HOU, Shengyou LIN, Liu GAO, Zezheng WANG, Ruiqi BAO a Licheng PENG. Biodegradable and conventional microplastics posed similar toxicity to marine algae *Chlorella vulgaris*. *Aquatic Toxicology*. 2022, **244**, 106097. ISSN 0166445X. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquatox.2022.106097
- [191] NAVA, Veronica, Miguel G. MATIAS, Andreu CASTILLO-ESCRIVÀ, Beata MESSYASZ a Barbara LEONI. Microalgae colonization of different microplastic polymers in

- experimental mesocosms across an environmental gradient. *Global Change Biology*. 2022, **28**(4), 1402–1413. ISSN 1354-1013. Dostupné z: doi:10.1111/gcb.15989
- [192] MANZI, Habasi Patrick, Reda A.I. ABOU-SHANAB, Byong-Hun JEON, Junling WANG a El-Sayed SALAMA. Algae: a frontline photosynthetic organism in the microplastic catastrophe. *Trends in Plant Science*. 2022, **27**(11), 1159–1172. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2022.06.005
- [193] KLEIN, Kristina, Sebastian HESS, Sandra NUNGESS, Ulrike SCHULTE-OEHLMANN a Jörg OEHLMANN. Particle shape does not affect ingestion and egestion of microplastics by the freshwater shrimp *Neocaridina palmata*. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021, **28**(44), 62246–62254. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-021-15068-x
- [194] PIKUDA, Oluwadamilola, Eva ROUBEAU DUMONT, Qiqing CHEN, Jun-Ray MACAIRAN, Stacey A. ROBINSON, Dimitrios BERK a Nathalie TUFENKJI. Toxicity of microplastics and nanoplastics to *Daphnia magna*: Current status, knowledge gaps and future directions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2023, **167**, 117208. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2023.117208
- [195] BOUZID, Nadia, Christelle ANQUETIL, Rachid DRIS, Johnny GASPERI, Bruno TASSIN a Sylvie DERENNE. Quantification of Microplastics by Pyrolysis Coupled with Gas Chromatography and Mass Spectrometry in Sediments: Challenges and Implications. *Microplastics*. 2022, **1**(2), 229–239. ISSN 2673-8929. Dostupné z: doi:10.3390/microplastics1020016
- [196] WOO, Hyunjeong, Kangmin SEO, Yonghyun CHOI, Jiwon KIM, Masayoshi TANAKA, Keunheon LEE a Jonghoon CHOI. Methods of Analyzing Microsized Plastics in the Environment. *Applied Sciences*. 2021, **11**(22), 10640. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app112210640
- [197] SHABAKA, Soha Hamdy, Mohamed GHOBASHY a Rasha Saad MAREY. Identification of marine microplastics in Eastern Harbor, Mediterranean Coast of Egypt, using differential scanning calorimetry. *Marine Pollution Bulletin*. 2019, **142**, 494–503. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2019.03.062
- [198] KÜHN, Susanne, Albert VAN OYEN, Andy M. BOOTH, André MEIJBOOM a Jan A. VAN FRANEKER. Marine microplastic: Preparation of relevant test materials for laboratory assessment of ecosystem impacts. *Chemosphere*. 2018, **213**, 103–113. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.032
- [199] RODRÍGUEZ CHIALANZA, Mauricio, Ignacio SIERRA, Andrés PÉREZ PARADA a Laura FORNARO. Identification and quantitation of semi-crystalline microplastics using image analysis and differential scanning calorimetry. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018, **25**(17), 16767–16775. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-018-1846-0

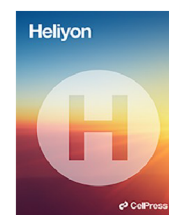
- [200] BITTER, Hajo a Susanne LACKNER. First quantification of semi-crystalline microplastics in industrial wastewaters. *Chemosphere*. 2020, **258**, 127388. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127388
- [201] MAJEWSKY, Marius, Hajo BITTER, Elisabeth EICHE a Harald HORN. Determination of microplastic polyethylene (PE) and polypropylene (PP) in environmental samples using thermal analysis (TGA-DSC). *Science of The Total Environment*. 2016, **568**, 507–511. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2016.06.017
- [202] IVLEVA, Natalia P. Chemical Analysis of Microplastics and Nanoplastics: Challenges, Advanced Methods, and Perspectives. *Chemical Reviews*. 2021, **121**(19), 11886–11936. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.1c00178
- [203] BITTER, Hajo a Susanne LACKNER. Fast and easy quantification of semi-crystalline microplastics in exemplary environmental matrices by differential scanning calorimetry (DSC). *Chemical Engineering Journal*. 2021, **423**, 129941. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2021.129941
- [204] EBERT, Dieter. *Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in Daphnia..* Bethesda: National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2005. ISBN 1932811060.
- [205] STAWSKI, D., S. RABIEJ, L. HERCZYŃSKA a Z. DRACZYŃSKI. Thermogravimetric analysis of chitins of different origin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2008, **93**(2), 489–494. ISSN 1388-6150. Dostupné z: doi:10.1007/s10973-007-8691-6
- [206] WEI, H., R.B. THOMPSON, C.B. PARK a P. CHEN. Surface tension of high density polyethylene (HDPE) in supercritical nitrogen: Effect of polymer crystallization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2010, **354**(1–3), 347–352. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2009.06.005
- [207] PRASAD, A. A quantitative analysis of low density polyethylene and linear low density polyethylene blends by differential scanning calorimetry and fourier transform infrared spectroscopy methods. *Polymer Engineering & Science*. 1998, **38**(10), 1716–1728. ISSN 0032-3888. Dostupné z: doi:10.1002/pen.10342
- [208] SREEKUMAR, Kalyani, B BINDHU a K VELURAJA. Perspectives of polylactic acid from structure to applications. *Polymers from Renewable Resources*. 2021, **12**(1–2), 60–74. ISSN 2041-2479. Dostupné z: doi:10.1177/20412479211008773
- [209] LIU, Liang, Alexander ILYUSHECHKIN, Daniel LIANG, Ashleigh COUSINS, Wendy TIAN, Cherry CHEN, Jon YIN a Liezl SCHOEMAN. Metal Hydride Composite Structures for Improved Heat Transfer and Stability for Hydrogen Storage and Compression Applications. *Inorganics*. 2023, **11**(5), 181. ISSN 2304-6740. Dostupné z: doi:10.3390/inorganics11050181
- [210] ZARBALI, Ali, Balázs PINKE a Alfréd MENYHÁRD. Robustness Study of a Tensile Modulus Prediction Model for Semicrystalline Polymers. *Periodica Polytechnica Chemical*

- Engineering*. 2023, **67**(2), 232–241. ISSN 1587-3765. Dostupné z: doi:10.3311/PPch.20991
- [211] SUMMERS, James W. The melting temperature (or not melting) of poly(vinyl chloride). *Journal of Vinyl and Additive Technology*. 2008, **14**(3), 105–109. ISSN 1083-5601. Dostupné z: doi:10.1002/vnl.20151
- [212] SELKE, S.E. a R.J. HERNANDEZ. Packaging: Polymers for Containers. In: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. Elsevier, 2001, s.6646–6652. Dostupné z: doi:10.1016/B0-08-043152-6/01175-X
- [213] WANG, Nan, Ran TU, Xin MA, Qiyuan XIE a Xi JIANG. Melting behavior of typical thermoplastic materials – An experimental and chemical kinetics study. *Journal of Hazardous Materials*. 2013, **262**, 9–15. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2013.08.024
- [214] MELČOVÁ, Veronika, Kateřina SVORADOVÁ, Přemysl MENČÍK, Soňa KONTÁROVÁ, Michala RAMPICHOVÁ, Věra HEDVIČÁKOVÁ, Věra SOVKOVÁ, Radek PŘIKRYL a Lucy VOJTOVÁ. FDM 3D Printed Composites for Bone Tissue Engineering Based on Plasticized Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(d,l-lactide) Blends. *Polymers*. 2020, **12**(12), 2806. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12122806
- [215] POSPISILOVA, Aneta, Juraj VODICKA, Monika TRUDICOVA, Zuzana JUGLOVA, Jiri SMILEK, Přemysl MENCIK, Jiri MASILKO, Eva SLANINOVA, Veronika MELCOVA, Michal KALINA, Stanislav OBRUCA a Petr SEDLACEK. Effects of Differing Monomer Compositions on Properties of P(3HB-co-4HB) Synthesized by *Aneurinibacillus* sp. H1 for Various Applications. *Polymers*. 2022, **14**(10), 2007. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14102007
- [216] OECD. *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*. 2004. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. ISBN 9789264069947. Dostupné z: doi:10.1787/9789264069947-en
- [217] OECD. *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*. 2012. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. ISBN 9789264185203. Dostupné z: doi:10.1787/9789264185203-en
- [218] SCHÜR, Christoph, Sebastian ZIPP, Tobias THALAU a Martin WAGNER. Microplastics but not natural particles induce multigenerational effects in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*. 2020, **260**, 113904. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.113904
- [219] GONZÁLEZ-PLEITER, Miguel, Miguel TAMAYO-BELDA, Gerardo PULIDO-REYES, Georgiana AMARIEI, Francisco LEGANÉS, Roberto ROSAL a Francisca FERNÁNDEZ-PIÑAS. Secondary nanoplastics released from a biodegradable microplastic severely impact freshwater environments. *Environmental Science: Nano*. 2019, **6**(5), 1382–1392. ISSN 2051-8153. Dostupné z: doi:10.1039/C8EN01427B

- [220] BOTTERELL, Zara L. R., Nicola BEAUMONT, Matthew COLE, Frances E. HOPKINS, Michael STEINKE, Richard C. THOMPSON a Penelope K. LINDEQUE. Bioavailability of Microplastics to Marine Zooplankton: Effect of Shape and Infochemicals. *Environmental Science & Technology*. 2020, **54**(19), 12024–12033. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.0c02715
- [221] RUMMEL, Christoph D., Annika JAHNKE, Elena GOROKHOVA, Dana KÜHNEL a Mechthild SCHMITT-JANSEN. Impacts of Biofilm Formation on the Fate and Potential Effects of Microplastic in the Aquatic Environment. *Environmental Science & Technology Letters*. 2017, **4**(7), 258–267. ISSN 2328-8930. Dostupné z: doi:10.1021/acs.estlett.7b00164
- [222] PICÓ, Yolanda a Damià BARCELÓ. Analysis and Prevention of Microplastics Pollution in Water: Current Perspectives and Future Directions. *ACS Omega*. 2019, **4**(4), 6709–6719. ISSN 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.9b00222
- [223] WEI, Xin-Feng, Martin BOHLÉN, Catrin LINDBLAD, Mikael HEDENQVIST a Aron HAKONEN. Microplastics generated from a biodegradable plastic in freshwater and seawater. *Water Research*. 2021, **198**, 117123. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2021.117123
- [224] LAMBERT, Scott a Martin WAGNER. Formation of microscopic particles during the degradation of different polymers. *Chemosphere*. 2016, **161**, 510–517. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2016.07.042
- [225] MOYAL, Joshua, Preeti H. DAVE, Mengjie WU, Shooka KARIMPOUR, Satinder K. BRAR, Huan ZHONG a Raymond W. M. KWONG. Impacts of Biofilm Formation on the Physicochemical Properties and Toxicity of Microplastics: A Concise Review. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2023, **261**(1), 8. ISSN 0179-5953. Dostupné z: doi:10.1007/s44169-023-00035-z

PŘÍLOHY

PŘÍLOHA A



Effects of biodegradable P3HB on the specific growth rate, root length and chlorophyll content of duckweed, *Lemna minor*

Petra Procházková^{a,*}, Sabina Mácová^a, Seçil Aydın^b, Helena Zlámalová Gargošová^a, Gabriela Kalčíková^c, Jiří Kučerík^a

^a Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

^b Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemistry-Metallurgical, Yıldız Technical University, 34210, Davutpaşa Esenler, Istanbul, Türkiye

^c Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, 113 Večna pot, SI-1000, Ljubljana, Slovenia

ARTICLE INFO

Keywords:

Biodegradable plastics
Duckweed
Ecotoxicity
Microbeads
Micro-bioplastics
P3HB

ABSTRACT

The extensive production and use of plastics have led to widespread pollution of the environment. As a result, biodegradable polymers (BDPs) are receiving a great deal of attention because they are expected to degrade entirely in the environment. Therefore, in this work, we tested the effect of two fractions (particles <63 μm and particles from 63 to 125 μm) of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) at different concentrations on the specific growth rate, root length, and photosynthetic pigment content of the freshwater plant *Lemna minor*. Microparticles with similar properties made of polyethylene terephthalate (PET) were also tested for comparison. No adverse effects on the studied parameters were observed for either size fraction; the only effect was the root elongation with increasing P3HB concentration. PET caused statistically significant root elongation only in the highest concentration, but the effect was not as extensive as for P3HB. The development of a biofilm on P3HB particles was observed during the experiment, and the nutrient sorption experiment showed that the sorption capacity of P3HB was greater than PET's. Therefore, depleting the nutrients from the solution could force the plant to increase the root surface area by their elongation. The results suggest that biodegradable microplastics may cause secondary nutrient problems in the aquatic environment due to their biodegradability.

1. Introduction

Due to the growing problem of plastic waste and pollution from conventional plastics, there is an increasing interest in producing environmentally friendly products from degradable materials [1,2]. Biodegradable polymers (BDPs) are polymeric materials that can be decomposed under aerobic conditions into carbon dioxide, water, and biomass by the enzymatic action of microorganisms or under anaerobic conditions to methane [3]. Simply put, they become plastics when mixed with additives, which improve their processability and properties. BDPs are being promoted as a viable alternative to conventional plastics in several industrial sectors, some in medicine, others in textile, personal care products, agriculture, and especially as packaging materials [4,5]. BDPs can be made from petrochemicals or renewable materials; they can be polymers produced by extraction from biomass (polysaccharides, polypeptides, lipids), polyesters made by microorganisms and plants or their mixtures [3,6,7].

* Corresponding author.

E-mail address: Petra.Prochazkova1@vut.cz (P. Procházková).

Considerable attention is paid to polymers produced from renewable sources, including polyhydroxyalkanoates (PHAs), a group of biodegradable linear polyesters 3, 4, 5, and 6-hydroxy acids, which can be produced under aerobic and anaerobic conditions by various gram-negative and gram-positive bacteria that use them as intracellular reserve materials [8–12]. PHAs were discovered through poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) [13,14]. P3HB is a relatively hydrophobic material with a crystallinity greater than 50 %, a high melting point (180 °C), and low elasticity. These properties complicate its processing and limit its possible use on an industrial scale [15,16]. The mechanical properties of P3HB can be improved by various additives, either polymers or plasticizers, or by forming copolymers [17]. However, these additives can have a negative effect on the biodegradation rate of the resulting material [18]. Therefore, substances that facilitate biodegradation, such as starch, are also added to these mixtures. Another disadvantage of P3HB is its high production cost, which can be slightly reduced by using waste materials as feedstock, e.g., used rapeseed frying oil [19]. Biomass, waste products of the sugar industry, or coffee bean hydrolysates can also be used for their production [20].

Similar to conventional plastics, biodegradable plastics can break down into small particles under natural conditions, resulting in large quantities of microplastics [17,21]. Despite their biodegradability, these particles can have a very long life because their degradation is influenced by biotic and abiotic environmental factors such as temperature, humidity, pH, biologically active substances, and the presence and activity of microorganisms [22,23]. Biodegradation processes of BDPs often need specific environmental conditions, and the biodegradation cannot be completed in many natural environments [24]. BDPs mainly showed high degradability in soil and compost environments. However, this is not always the case of the aquatic environment, for example the degree of biodegradation of polyhydroxybutyrate vary from 30 to 99 % depending on the conditions and the type of water [25].

Microplastics from BDPs have also been found to negatively affect freshwater and marine organisms [26]. In the freshwater amphipod *Gammarus fossarum*, a reduction in biomass gain was observed following exposure to polyhydroxybutyrate compared to the control as a result of their ingestion [27]. The effect of polylactic acid (PLA) microparticles on the marine organism *Arenicola marina* and microalgal biomass on the sediment surface was investigated by Green et al. [29]. There was no adverse effect of PLA on the viability of *A. marina*, but there was a significant decrease in microalgal biomass in PLA-containing sediment compared to the control [28]. However, in general, microplastics from BDPs are largely understudied, so understanding their impacts on the environment is still limited.

Due to the gradual acceptance of biodegradable replacements for conventional plastics, increased exposure of environmental components by micro-bioplastics can be expected due to their incomplete biodegradation. For this study, we selected P3HB due to its widespread applications and its growing, extensive use in packaging, agriculture, and biomedicine [29]. Further, the price of P3HB production is decreasing [30,31]. Consequently, it can be expected to be widely used in other branches, mainly as a replacement for polypropylene [32]. For those reasons, this study aimed to evaluate the effect of P3HB microplastics on the freshwater floating plant *Lemna minor* and compare the observed results to effects caused by PET microplastics with comparable properties. The effects of microplastics on the specific growth rate, photosynthetic pigments content, and root length are investigated.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of microparticles

The P3HB (ENMAT Y3000) microplastics with a spherical shape were used for ecotoxicological tests with *L. minor*. They were obtained as a powder from TianAn Biologic Materials Co., Ltd. (Ningbo City, China). A suspension of P3HB microplastics in MilliQ water was sieved on 63 and 125 µm mesh stainless-steel sieves, and both size fractions (<63 µm and from 63 to 125 µm) were subsequently dried in glass beakers at room temperature in a fume hood.

The PET microplastics were obtained as a powder produced during mechanical recycling from PETKA CZ a.s. (Brno, Czech Republic), repeatedly washed and then prepared similarly to P3HB to obtain the same size fractions.

2.2. Experimental design

The *L. minor* came from a laboratory culture at the Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection (Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Czech Republic). The plant was cultivated in Steinberg medium [33] under controlled conditions (temperature 23 ± 2 °C, photoperiod 16/8 h).

Due to the lack of standardised protocols for microplastic ecotoxicity testing, there is no accepted procedure for how organisms should be exposed in ecotoxicity tests. Accordingly, we used several approaches to expose *L. minor*. The effects of (i) suspension (without replacement), (ii) suspension exchange during the test, which used Li et al. [34] procedure in tests with TiO₂ nanoparticles, (iii) leachate and (iv) direct weighing (due to surface tension, some insufficiently wetted P3HB particles remained floating on the surface). Tests were conducted with both size fractions.

The suspension (i) was prepared by weighing the desired amount of P3HB and transferring it to a volumetric flask; then, the volumetric flask was filled to the mark with Steinberg medium. The suspension thus prepared was ultrasonicated for 10 min to disperse the particles.

In the case of the exchange test medium (ii), the suspension thus prepared was exchanged twice during the test.

Leachate (iii) was prepared as follows: a suspension of P3HB in Steinberg medium was prepared and then incubated for seven days under the same conditions as the *L. minor* test. The medium was then filtered through a 0.8 µm pore size filter.

In direct weighing (iv), P3HB was weighed in the required amount, transferred to a test vessel, and 100 mL of medium was added.

Since the results (Section 3) showed no significant difference between the preparation methods, the test was performed with PET in

suspension only (i). Also, leachate from PET was not tested because our previous study showed no effects of PET leachate on various endpoints of *L. minor* [35].

The experiments were conducted in 150 mL glass beakers, and each was filled with 100 mL of test suspension, leachate, or medium. The concentration of P3HB microparticles was 0, 10, 50, and 100 mg/L, corresponding to $3.20 \cdot 10^{13}$ particles in 1 g for the fraction $<63 \mu\text{m}$ and $2.39 \cdot 10^{13}$ particles in 1 g for the fraction $<125 \mu\text{m}$. The number of particles was determined based on their distribution in suspension (figure S1–S4 in Supporting Information). This concentration range was selected based on our initial tests and previous studies on the toxicity of microplastics to *L. minor* [36]. The PET was used in the same concentrations as P3HB.

Each experiment involved three replicates of the same exposure concentrations was repeated three times and was carried out according to the OECD guideline No. 221 [37] and used in many studies when microplastics were tested [36,38–40]. The initial number of leaves was nine, so more than 50 % of the surface area was available for plant growth. Roots were carefully removed from the plants before the start of the test. This experiment was conducted at a temperature of $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, and evaporation of the medium was prevented during the test by covering it with polyethylene foil. A photoperiod of 16/8 h (light/dark) was set at a light intensity of 4300 lx at the plant level, and the duration of the experiment was seven days.

Images of P3HB and PET microplastics were taken with an optical microscope and ocular camera, $10 \times /0.25$ objective before and after the experiment.

At the end of the experiment, the number of leaves was counted ($n = 9$), and the average specific growth was calculated (details are given in section 2.6, Data analysis).

2.3. Measurement of root length

L. minor ($n = 75$) were placed on laminated graph paper and photographed with a Nikon D3100 digital camera and an AF-S Micro NIKKOR 40 mm 1:2.8 G lens (Nikon, Japan). Afterward, the root length was evaluated in the ImageJ program.

2.4. Photosynthetic pigment determination

Photosynthetic pigments ($n = 9$), chlorophyll *a* and *b*, and total carotenoids were determined by a modified Arnon method described by Radić and Pevalek-Kozlina [41]. Approximately 30 mg of fresh plant material from each treatment was used for the photosynthetic pigment analysis. The samples were homogenized in 80 % ice-cold acetone (w/v), and the absorbance of the supernatant was read at 470, 642.8, and 646.2 nm.

2.5. Sorption experiment

Both P3HB and PET microplastic fractions were incubated in the Steinberg medium for seven days at the same concentrations (0, 10, 50, and 100 mg/L) and under the same conditions as in the *L. minor* assay. Media samples were collected at 0, 24, and 168 h and filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ pore size nylon filter. The nitrate-nitrogen concentration in these samples was determined spectrophotometrically using a commercial kit (Spectroquant®, Millipore, 109713).

To evaluate the effects of nutrient depletion of the medium, an additional test was also prepared in which the medium contained 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, and 40 % less nutrients than the original Steinberg medium. The ecotoxicity test with *L. minor* was then performed as described for P3BH.

2.6. Data analysis

The average specific growth rate after seven days of exposure was calculated according to ISO 20079 (2005) as follows:

$$\mu = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

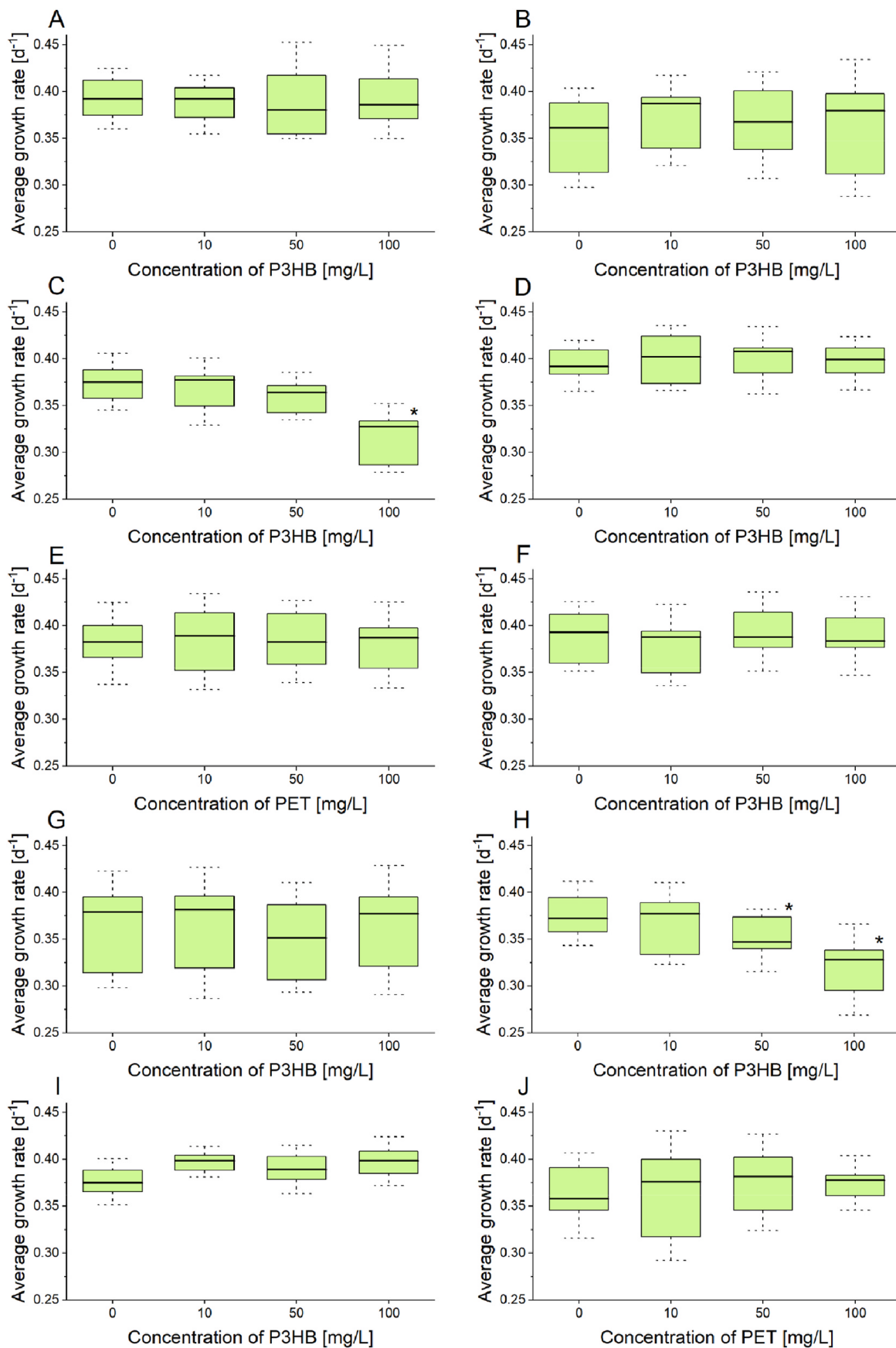
where μ (d^{-1}) is the average specific growth rate, N_j (/) is the number of leaves at the end of the experiment, N_i (/) is the number of leaves at the beginning of the experiment, and t (d) is the exposure time (seven days).

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \cdot 100$$

where $\%I_r$ is the percentage inhibition of the average growth rate, μ_c is the mean growth rate for control, and μ_T is the mean μ for specific sample treatment.

The content of photosynthetic pigments was calculated according to Lichtenthaler [42]. Results are given in mg of chlorophyll per gram of fresh plant mass.

The statistical significance of the differences between control and individual concentrations was determined using Dunnett's test in the R program, with differences considered significant if $p < 0.05$.



(caption on next page)

Fig. 1. Results of specific growth rate: A to E for particles <63 μm (A – suspension (i), B – exchange of suspension (ii), C – leachate (iii), D – direct weighing (iv) of P3HB, and E – suspension of PET) and F to J for particles from 63 to 125 μm (F – suspension (i), G – exchange of suspension (ii), H – leachate (iii), I – direct weighing (iv) of P3HB, and J – suspension of PET). Asterisks denote statistically significant differences compared with the control treatment (p-value <0.05).

3. Results

3.1. Effect of P3HB on the specific growth rate of *Lemna minor*

The results of this study showed that the specific growth rate of *L. minor* was not affected in the case of suspension test (i), exchange suspension during the test (ii), and direct weighing of P3HB microplastics into the test vessel (iv). Similarly, suspension of PET microplastics did not affect the specific growth rate under those exposure scenarios (Fig. 1).

On the other hand, leachate (iii) from both size fractions of P3HB showed a statistically significant difference at the highest concentrations – 100 mg/L for particles <63 μm , 50 and 100 mg/L for particles from 63 to 125 μm . The specific growth rate inhibition was concentration dependent: leachates from 10, 50, and 100 mg/L caused 4.72 %, 4.01 %, and 15.95 % for particles <63 μm , and 2.79 %, 7.61 %, and 17.69 % for particles from 63 to 125 μm , respectively (Fig. 1).

3.2. Effect of P3HB on chlorophyll content

Both fractions of P3HB microplastics in the different treatments ((i) – (iv)) did not have a negative effect on the content of photosynthetic pigments in *L. minor* leaves (chlorophyll *a* and *b*, carotenoids). Similarly, PET did not affect photosynthetic pigment content compared to the control (Figs. 2 and 3).

3.3. Effect on root growth

Both P3HB size fractions had statistically significant effects on *L. minor* root growth in all treatments. The effect was concentration-dependent regardless of the preparation of the suspension ([i], [ii], [iv]); the leachates (iii) of P3HB also caused a statistically significant elongation of the roots of *L. minor*.

Similarly, the length of the roots increased with increasing concentration of PET microplastics, but a statistically significant difference from the control was observed only at the highest concentration (100 mg/L, Fig. 4).

3.4. Sorption experiment

To determine the degree to which the presence of microplastics affects the composition of the medium, a series of sorption experiments were conducted on both PET and P3HB. In the presence of microplastic particles <63 μm , there was up to 30 % reduction of the concentration of N-NO_3^- in the case of P3HB, while there was only 12 % for PET (figure S5). For the second size fraction of microplastics (from 63 to 125 μm), the depletion of N-NO_3^- in both cases was slightly higher. Thus, sorption occurs for both types of plastics, but a statistically significant effect on root growth was observed only for P3HB and the highest concentration of PET (Fig. 4). In addition, biofilm growth on the settled P3HB and PET was observed at the bottom of the beaker, where filamentous microorganisms occurred (Fig. 5). However, only in the treatments with P3HB did visual inspection indicate other microbial cells attached to particles (Fig. 5B).

3.5. Effect of nutrient depletion

Additional experiments with depletion of nutrients in the Steinberg medium (containing 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, and 40 % fewer nutrients than the control under the same conditions as the P3HB and PET tests) confirmed that with decreasing nutrient concentrations in the medium, there was a slight inhibition of growth compared to the control (the highest was 6.5 % in the sample with the least amount of nutrients, i.e., 40 % fewer nutrients than in the control). No changes in photosynthetic pigment content were observed. However, a statistically significant increase in root length was observed at all concentrations and increased with decreasing nutrient concentrations in the medium (Fig. 6).

4. Discussion

Recent research on microplastics has shown that different types of microplastics can affect growth and development of aquatic plants [43,44]. In contrast, natural particles such as wood or cellulose particles showed no effects [40]. Therefore, we aimed to investigate the effect of bio-based and biodegradable P3HB and compare it with that of non-biodegradable PET. PET was selected for its P3HB-like properties mainly density (1.38 g/cm³) and wettability – the contact angle of PET varies between 66° and 81°, that is, it is also poorly wettable compared to P3HB [45]. In fact, both particles belong to the group of polyesters, but P3HB is, unlike, a biodegradable polymer. Although, recent work [46] suggested that PET hydrolysis can also occur under specific conditions, e.g., about 4.5 years is needed for 50 % PET degradation under neutral pH in marine water, it can be concluded that the lifetime of P3HB and PET

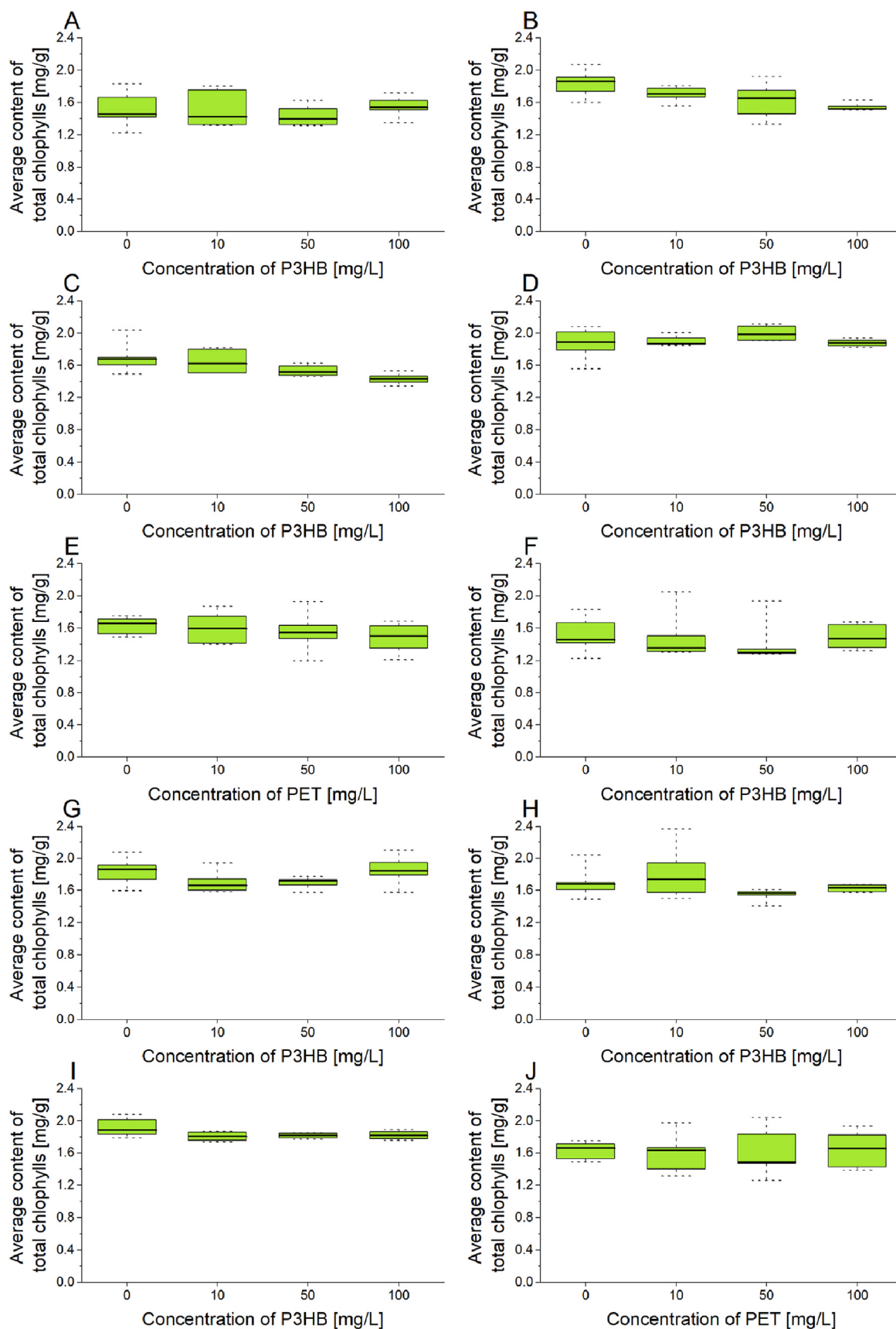


Fig. 2. Results of average content of total chlorophylls: A to E for particles <63 μm (A – suspension (i), B – exchange of suspension (ii), C – leachate (iii), D – direct weighing (iv) of P3HB, and E – suspension of PET) and F to J for particles from 63 to 125 μm (F – suspension (i), G – exchange of suspension (ii), H – leachate (iii), I – direct weighing (iv) of P3HB, and J – suspension of PET).

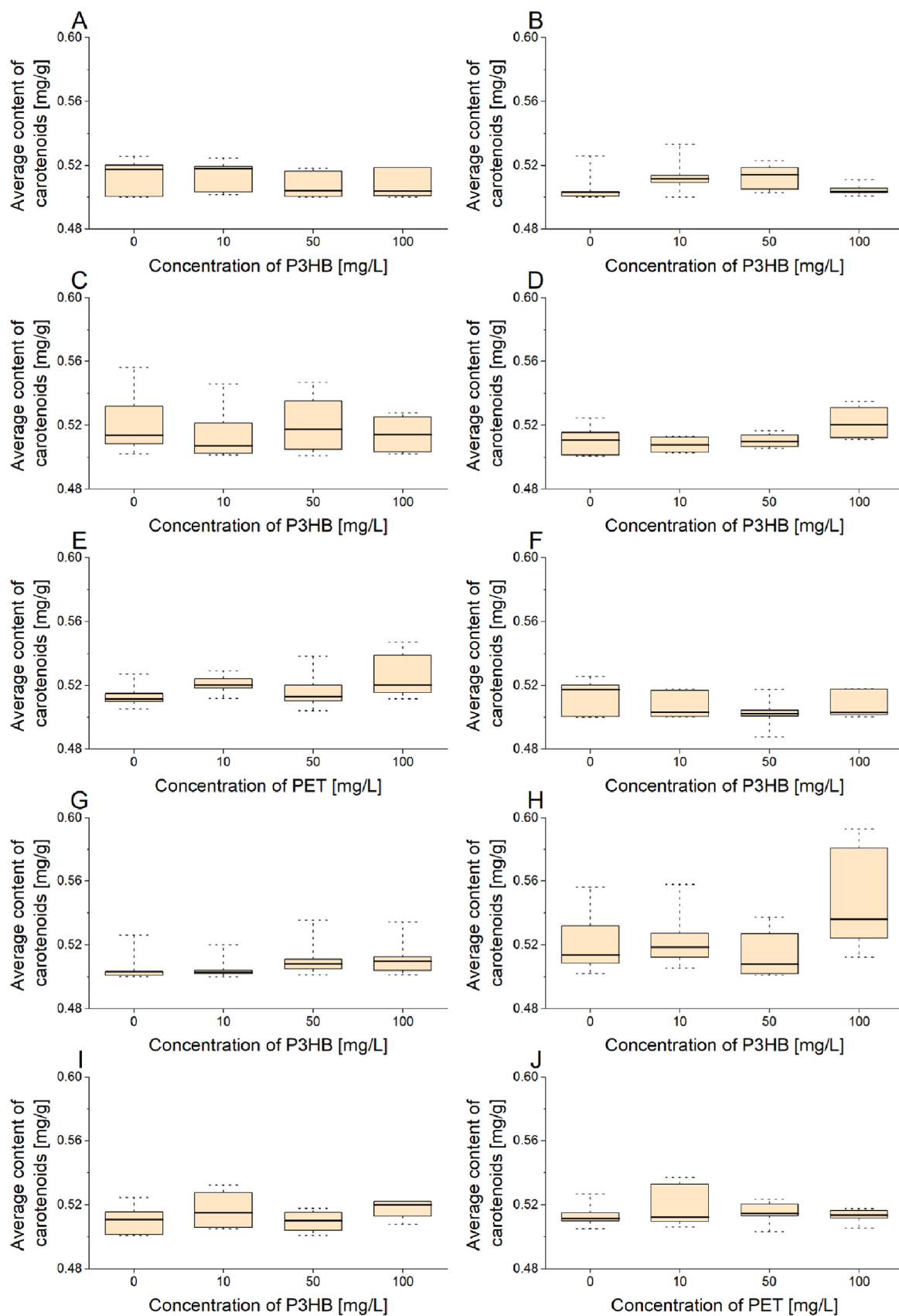
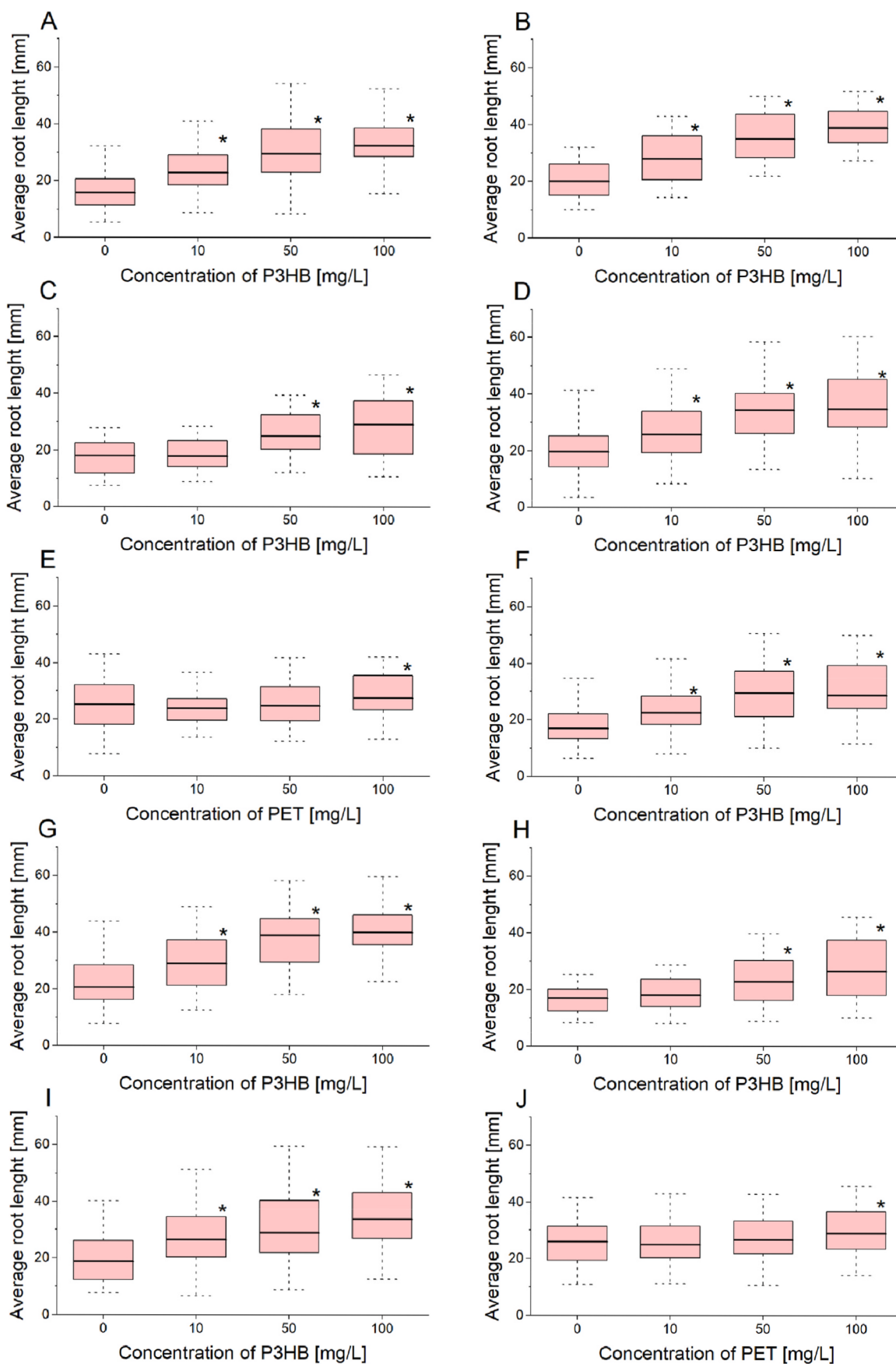


Fig. 3. Results of average content of carotenoids: A to E for particles <63 μm (A – suspension (i), B – exchange of suspension (ii), C – leachate (iii), D – direct weighing (iv) of P3HB, and E – suspension of PET) and F to J for particles from 63 to 125 μm (F – suspension (i), G – exchange of suspension (ii), H – leachate (iii), I – direct weighing (iv) of P3HB, and J – suspension of PET).



(caption on next page)

Fig. 4. Results of measurement of root length: A to E for particles <math><63 \mu\text{m}</math> (A – suspension (i), B – exchange of suspension (ii), C – leachate (iii), D – direct weighing (iv) of P3HB, and E – suspension of PET) and F to J for particles from 63 to 125 $\mu\text{m}</math> (F – suspension (i), G – exchange of suspension (ii), H – leachate (iii), I – direct weighing (iv) of P3HB, and J – suspension of PET). Asterisks denote statistically significant differences compared with the control treatment (p-value <math><0.05</math>).$

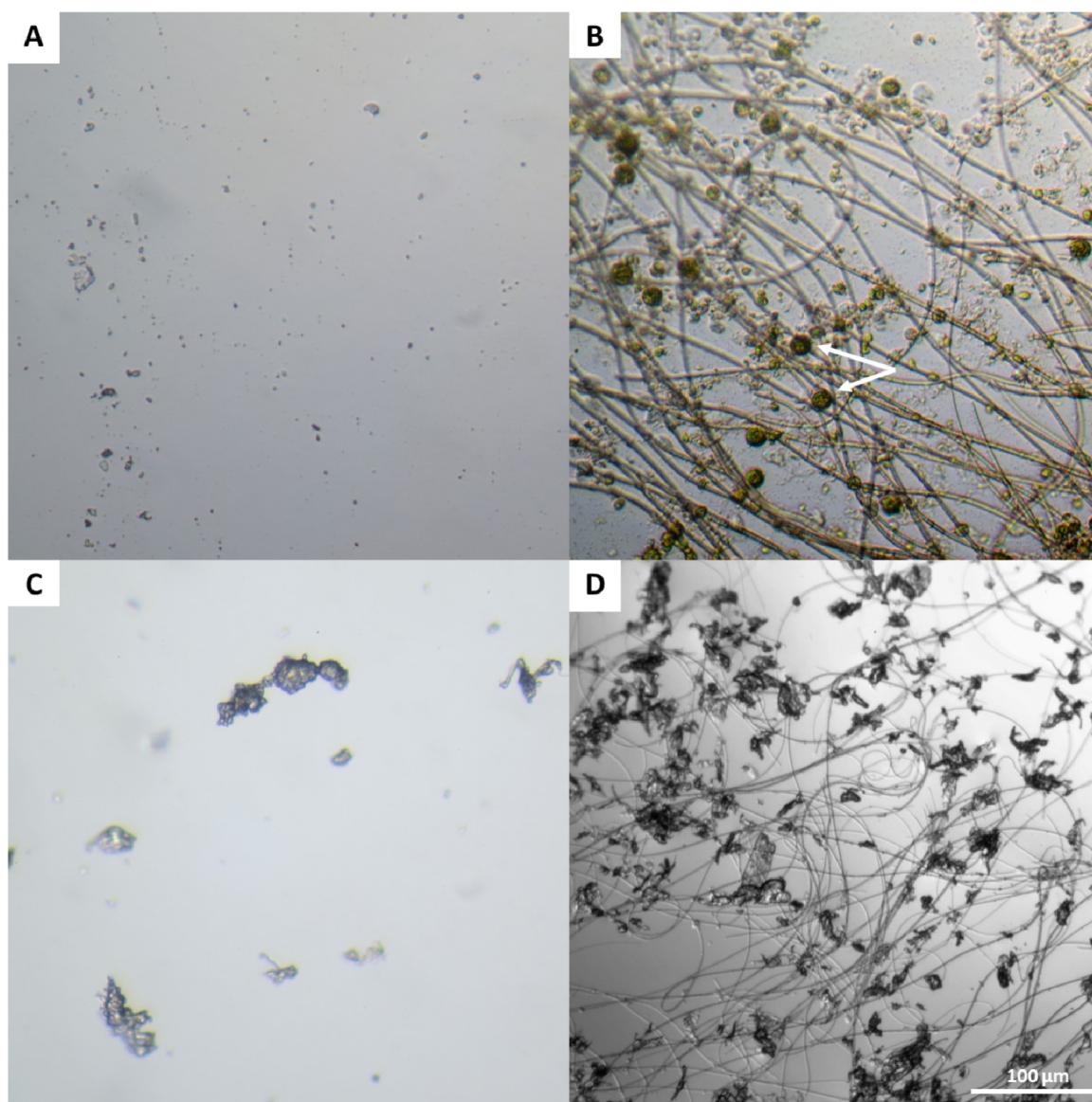


Fig. 5. P3HB particles <math><63 \mu\text{m}</math> before the test (A) and after seven days of exposure (B), PET particles <math><63 \mu\text{m}</math> before the test (C) and after seven days of exposure (D). The arrows in Figure B indicate the different types of organisms in the biofilm formed on P3HB microplastics versus PET.

microparticles in natural systems significantly differ.

In general, there are very few studies on the impact of biodegradable microplastics on aquatic organisms; their effects on aquatic ecosystems were not studied until 2015 when Green et al. [28] found that, in some cases, they can negatively affect organisms in the same way as conventional microplastics. Their work compared the effect of PLA, polyethylene (PE), and polyvinyl chloride microplastics on the health and biological activity of lugworms *A. marina* and the nitrogen cycling and primary productivity of the sediment they inhabit. All three types of microplastics, including biodegradable PLA, significantly reduced the biomass of microalgae in the sediment [28]. Su et al. [47] compared the effect of PLA, polybutylene succinate, PE, and polyamide (PA) microplastics (the sizes of each type of microplastic were 57.4, 53.3, 77.8, and 59.9 $\mu\text{m}</math>) on the marine algae *Chlorella vulgaris*. PLA showed the most substantial inhibitory effect on the growth of *C. vulgaris*. Interestingly, in contrast to our study, the microplastics appeared to stimulate the contents of photosynthetic pigments (e.g., chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and carotenoids), which was attributed to their ability to act as cellular defences against stress induced by microplastics.$

The ecotoxicological research on P3BH is limited, but, for example, tests with secondary P3HB nanoparticles by González-Pleiter et al. [48] demonstrated that with the presence of P3HB nanoparticles (spherical particles with a diameter of around 200 nm, the

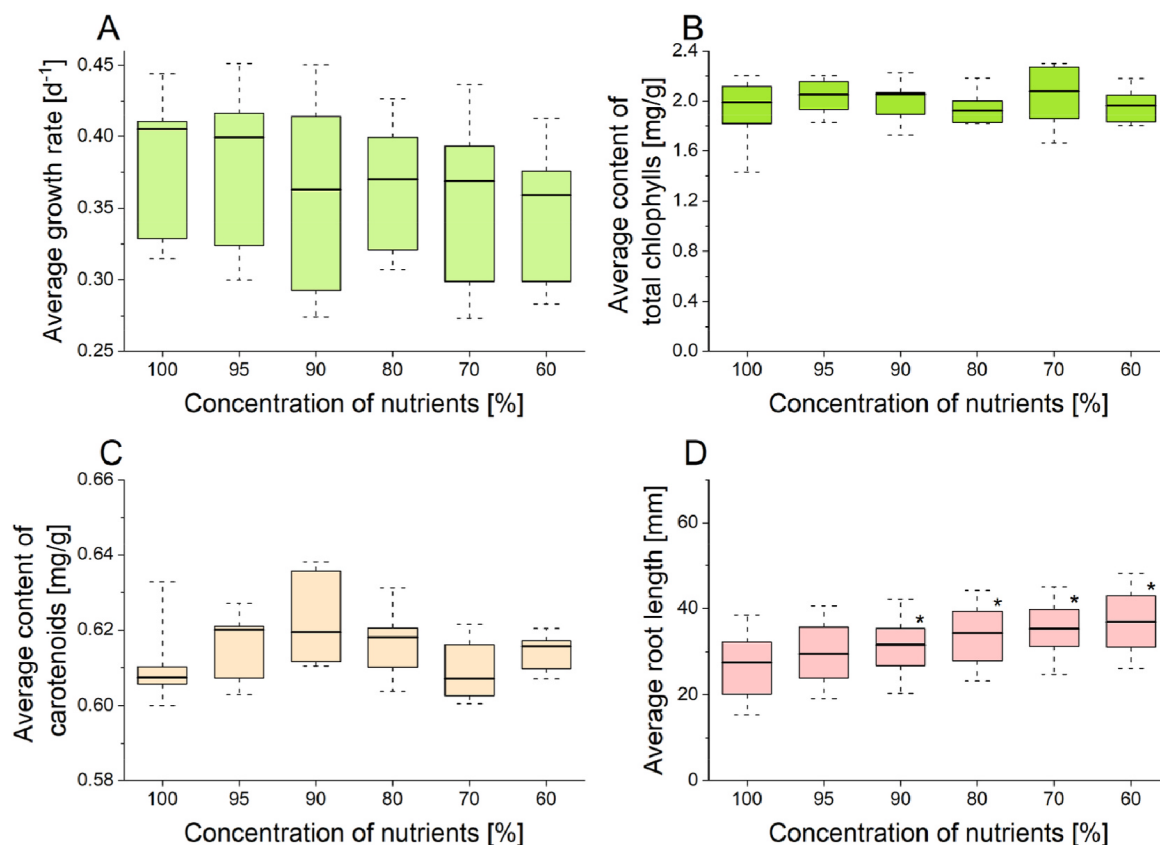


Fig. 6. Results of test with nutrient deficiency: A – average growth rate, B – average content of total chlorophylls, C – average content of carotenoids, D – average root length. Asterisks denote statistically significant differences compared with the control treatment (p -value < 0.05).

highest concentration was 100 mg/L) in the medium, there was a significant reduction in the growth of bacteria *Anabaena* (90 %) and algae *Chlorella reinhardtii* (95 %); there was 85 % immobilization of *Daphnia magna* after 48 h. This contradicts our results, which showed no significant acute effect on *L. minor*. This confirms that chemical composition, concentration, and particle properties (and related sorption properties, e.g., towards micropollutants or nutrients) are important ecotoxicological factors in the ecotoxicity testing of micro/nanoparticles.

The results of this study showed limited effects of P3HB microplastics on various endpoints of growth and development of *L. minor*. The minimal effect of P3HB on the specific growth rate of *L. minor* may be caused by the limited contact of the microplastics with the plant biomass. As mentioned earlier, P3HB microplastic particles settled due to their higher density than water (approximately 1.23 g/cm³) [49], thus leaving enough space on the surface for normal plant growth. Similarly, results of the photosynthetic content analysis suggest a low impact of P3HB microplastics on *L. minor*, as photosynthetic pigments were also not affected by P3HB microplastics. A similar conclusion was reached by Kalčíková et al. [36] when investigating the effect of PE microbeads on *L. minor*. However, P3HB microplastics can be temporarily resuspended in the water column because of turbulence, water flow, or during thunderstorms [50]. The contact angle of P3HB is reported to be between 70° and ~81°, making it slightly hydrophobic [45]. Hydrophobic material naturally tends to separate from water molecules [51]. Accordingly, before the surface of P3HB microparticles is wetted and begins settling, they can float on the water surface and be adsorbed to the leaves and roots of floating plants.

Furthermore, no differences were found between the exposure scenarios (the ways that *L. minor* was exposed to microplastics), so we concluded that using microplastic suspension (i), microplastic suspension exchange (ii), and direct weighing (vi) are appropriate methods for microplastic testing.

Although there was no effect on growth rate and photosynthetic pigment content, P3HB microplastics affected root growth and caused root elongation. A lack of nutrients can cause root length elongation, and consequently, the ability of the root system to nourish increases – the foraging capacity [52]. For example, Cedergreed and Madsen [53] reported that high concentrations of nutrients lead to the shortening or the complete absence of *L. minor* roots, while low levels of nutrients and trace elements lead to elongation, as shown in Fig. 6. As the *L. minor* is a plant with no lateral roots but only one main root, extending the roots is the only way to increase the root area to absorb nutrients from the medium. No other changes (thinning of roots, reduction of root cell viability) were observed during this research. Based on the results of this study, it is plausible that root elongation could be a result of nutrients depletion either 1) due to nutrient sorption on P3HB microplastics as reported by He et al. [54] or 2) the effect of biofilm formed on the surface of the biodegradable polymer.

Both adsorption of nutrients and biofilm development proceeded differently on P3HB and PET microplastics, although they have equal plastic wettability [45] and comparable sizes. P3HB adsorbed more N-NO₃ than PET (figure S5), and a significant effect on roots

(elongation) was observed regardless of the P3HB concentration tested. In contrast, the PET microplastics only caused statistically significant root elongation at the highest concentrations. This difference may be due to the fact that P3HB is biodegradable and thus more suitable for biofilm growth than PET (Fig. 5). This supports the uptake of nutrients on P3HB particles compared to PET (figure S5). This is significant mainly for those particles below 63 μm . As can be seen in figure S5, particles between 63 and 125 μm showed a similar trend. We speculate that this may be caused by a change in the specific surface area caused by more extensive aggregation of P3HB particles. In principle, biofilm formation modifies the surface wettability, thereby promoting the rate and extension of the aggregation. In other words, in the presence of denser biofilm on P3HB (Fig. 5), the aggregation is caused by charge-charge interactions. In contrast, in the case of PET, it is caused mainly by the aforementioned separation from water. As a result, the sorption of nutrients by P3HB decreased. Further, it also seems that the biofilm characteristics on PET and P3HB were different (Fig. 5), which influenced the aggregation behaviour of both plastic particles.

The reason for the development of the biofilm on P3HB can be attributed to their biodegradability, as they represent a carbon source for microorganisms and thus are degraded in the aquatic environment [55]. The formation of biofilm on microplastics can significantly alter their properties and, in some cases, even increase environmental risks and ecotoxicity. Microbial attachment to the surface of plastics and biofilm formation can occur within a few days [56]. It can affect properties such as hydrophobicity, density, functional groups, size, surface area, the roughness of microplastics, and their physical and chemical behaviour [57]. For example, the attached biofilm could reduce the hydrophobicity of PE [58,59] and increase the specific surface area and, thus, the adsorption of other pollutants [57]. In addition, the surface of microplastics can also concentrate nutrients dispersed in the surrounding environment to provide sufficient nutrients for biofilm formation [60]. This aligns with the results of Chen et al. [61], who reported that microplastic biofilms could potentially affect the N and P cycles – the N cycle by enhancing denitrification capacity and the P cycle by sorption and microbially mediated P transformation. N and P can be assimilated into and released to the surrounding waters via biofilms, depending on their developmental stage and environmental conditions.

In addition, the specific growth rate of *L. minor* was statistically significantly affected in the test with leachate for both size fractions. This might be caused by chemicals that may be leached from the microplastics during the incubation period (e.g., chloroform for the extraction of P3HB (lysis of cells during P3HB production) [11]. Still, it is more plausible that the effect was also related to nutrient depletion, as it is credible that nutrients were adsorbed to P3HB and utilized by the biofilm during the preparation of the leachate, so the leachate used for the ecotoxicity test had a much lower concentration of nutrients that affected the root growth and induced root elongation.

A fundamentally similar, though not identical, problem with the availability of nutrients for plants in soil is also mentioned in the work of Brtnický et al. [62]. The authors found that adding P3HB to the soil increased microbial activity due to the preferential use of P3HB as a carbon source. This leads to soil nitrogen depletion around the plant roots, strongly inhibiting plant growth. However, soils are a more microbially active environment than water due to the significantly higher number of microorganisms present. Therefore, abiotic factors such as sorption can be involved in the competition for nutrients between plants and microorganisms in the aquatic system. Even in terrestrial plants, the root: shoot ratio increases due to nitrogen deficiency, and lateral roots shorten, while high concentrations of N-NO_3 in soil solution inhibit root growth [63]. Kul et al. [64] also state that nitrogen deficiency reduces chlorophyll in the plant leaves and reduces flowering, fruiting, protein, and starch content. In our case, changes in the content of photosynthetic pigments in leaves were not observed; in most cases, there were no changes in the growth of *L. minor*. Thus, it seems that the plant adapted to the reduced content of nutrients in the medium by root elongation, and no acute effect was observed. Accordingly, focusing on the long-term effect of P3HB microparticles on *L. minor* is important.

In submerged rooted plants, which can take up nutrients through both roots and shoots, nutrient uptake by roots from sediment depends on nutrient availability in the water. In contrast, floating plants are unique because roots and leaves receive nutrients from the same source [53]. Root length measurements may be more sensitive than other endpoints (growth and biomass), such as exposure to submerged macrophytes to pesticides [65]. Roots are more critical in nutrient uptake when availability is low, and leaves contribute more at high nutrient concentrations [53]. From an ecological perspective, the increase in the length of the *L. minor* root in the presence of P3HB microparticles is not a large problem for the plant in the short term. Importantly, however, this effect indicates a reduction in nutrient concentration in the water. Nutrients are essential for the growth of algae and aquatic plants, which are a food source for many small invertebrates and fish.

5. Conclusion

This research showed that the presence of P3HB microplastics had no adverse effects on growth or the photosynthetic pigment content in leaves. The only effect observed was an increase in root length with increasing concentration of P3HB, which was shown to be related to the depletion of nutrients from water, but this effect may be transient especially during the initial rapid biodegradation. Furthermore, we speculate that in the short term, *L. minor* can compensate for the shortage by root extension. Even so, *L. minor* serves as a food source and habitat for other organisms, and it is difficult to predict how the lack of nutrients would affect it in the long term. Finally, if P3HB or other rapidly biodegradable plastics are used in marine applications, it is also important to understand that rapid biodegradation could negatively affect aquatic ecosystems and lead to nutrient depletion especially if used in high concentration. For those reasons, the ecological implications of biodegradable plastics should be further investigated.

Funding

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic [project FCH-S-23-8297]. GK

acknowledges the financial support of the Slovenian Research Agency [Research program P2-0191].

Data availability statement

Data will be available on request, for more information contact corresponding author.

ORCID iD authorship contribution statement

Petra Procházková: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Sabina Mácová:** Investigation. **Seçil Aydın:** Investigation. **Helena Zlámálová Gargošová:** Writing – original draft, Conceptualization. **Gabriela Kalčíková:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Conceptualization. **Jiří Kučerík:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic [project FCH-S-23-8297]. GK acknowledges the financial support of the Slovenian Research and Innovation Agency [Research program P2-0191]. This article is based upon work from COST Action CA20101 Plastics monitoring detection Remediation recovery - PRIORITY, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology, www.cost.eu).

References

- [1] E. Amasawa, T. Yamanishi, J. Nakatani, M. Hirao, S. Sato, Climate change implications of bio-based and marine-biodegradable plastic: evidence from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), *Environ. Sci. Technol.* 55 (2021) 3380–3388, <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06612>.
- [2] M.A.S. Patwary, S.M. Surid, M.A. Gafur, Properties and applications of biodegradable polymers, *J. Res. Updates Polym. Sci.* 9 (2020) 32–41, <https://doi.org/10.6000/1929-5995.2020.09.03>.
- [3] J.H. Song, R.J. Murphy, R. Narayan, G.B.H. Davies, Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics, *Phil. Trans. Biol. Sci.* 364 (2009) 2127–2139, <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0289>.
- [4] G.E. Luckachan, C.K.S. Pillai, Biodegradable polymers- A review on recent trends and emerging perspectives, *J. Polym. Environ.* 19 (2011) 637–676, <https://doi.org/10.1007/s10924-011-0317-1>.
- [5] X. Zhao, K. Cornish, Y. Vodovotz, Narrowing the gap for bioplastic Use in food packaging: an Update, *Environ. Sci. Technol.* 54 (2020) 4712–4732, <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03755>.
- [6] B. Ghanbarzadeh, H. Almasi, Biodegradable Polymers. Biodegradation - Life of Science, InTech, 2013, pp. 141–185, <https://doi.org/10.5772/56230>.
- [7] I. Vroman, L. Tighzert, Biodegradable polymers, *Materials* 2 (2009) 307–344, <https://doi.org/10.3390/ma2020307>.
- [8] K. Leja, G. Lewandowicz, Polymer biodegradation and biodegradable polymers – a review, *Pol. J. Environ. Stud.* 19 (2010) 255–266.
- [9] S. Obruca, P. Dvořák, P. Sedláček, M. Koller, K. Sedlár, I. Pernicová, et al., Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics, *Biotechnol. Adv.* 58 (2022), 107906, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107906>.
- [10] S. Philip, T. Keshavarz, I. Roy, Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 233–247, <https://doi.org/10.1002/jctb.1667>.
- [11] A. Pospisilova, I. Novackova, R. Prikryl, Isolation of poly(3-hydroxybutyrate) from bacterial biomass using soap made of waste cooking oil, *Bioresour. Technol.* 326 (2021), 124683, <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.124683>.
- [12] L. Yu, K. Dean, L. Li, Polymer blends and composites from renewable resources, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 576–602, <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.03.002>.
- [13] R.W. Lenz, R.H. Marchessault, Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology, *Biomacromolecules* 6 (2005) 1–8, <https://doi.org/10.1021/bm049700c>.
- [14] M. Zinn, B. Witholt, T. Egli, Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53 (2001) 5–21, [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00218-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00218-6).
- [15] L. Savenkova, Z. Gercberga, V. Nikolaeva, A. Dzene, I. Bibers, M. Kalnin, Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films, *Process Biochemistry* 35 (2000) 573–579, [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00107-7).
- [16] R. Turco, G. Santagata, I. Corrado, C. Pezzella, M. di Serio, In vivo and post-synthesis strategies to enhance the properties of PHB-based materials: a review, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2021), 619266, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.619266>.
- [17] J. Fojt, J. David, R. Prikryl, V. Řezáčová, J. Kučerík, A critical review of the overlooked challenge of determining micro-bioplastics in soil, *Sci. Total Environ.* 745 (2020), 140975, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140975>.
- [18] A.R. Bagheri, C. Laforsch, A. Greiner, S. Agarwal, Fate of so-called biodegradable polymers in seawater and freshwater, *Global Challenges* 1 (2017), 1700048, <https://doi.org/10.1002/gch2.201700048>.
- [19] S. Obruca, I. Marova, O. Snajdar, L. Mravcova, Z. Svoboda, Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate, *Biotechnol. Lett.* 32 (2010) 1925–1932, <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0376-8>.
- [20] S. Obruca, S. Petrik, P. Benesova, Z. Svoboda, L. Eremka, I. Marova, Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 5883–5890, <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5653-3>.
- [21] H.Y. Sintim, A.I. Bary, D.G. Hayes, M.E. English, S.M. Schaeffer, C.A. Miles, et al., Release of micro- and nanoparticles from biodegradable plastic during in situ composting, *Sci. Total Environ.* 675 (2019) 686–693, <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.04.179>.
- [22] S. Agarwal, Biodegradable polymers: present opportunities and challenges in providing a microplastic-free environment, *Macromol. Chem. Phys.* 221 (2020), 2000017, <https://doi.org/10.1002/macp.202000017>.
- [23] X.F. Wei, M. Bohlén, C. Lindblad, M. Hedenqvist, A. Hakonen, Microplastics generated from a biodegradable plastic in freshwater and seawater, *Water Res.* 198 (2021), 117123, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117123>.

- [24] P. Fan, H. Yu, B. Xi, W. Tan, A review on the occurrence and influence of biodegradable microplastics in soil ecosystems: are biodegradable plastics substitute or threat? *Environ. Int.* 163 (2022), 107244 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107244>.
- [25] S.M. Emadian, T.T. Onay, B. Demirel, Biodegradation of bioplastics in natural environments, *Waste Management* 59 (2017) 526–536, <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.006>.
- [26] L. Filiciotto, G. Rothenberg, Biodegradable plastics: standards, policies, and impacts, *ChemSusChem* 14 (2021) 56–72, <https://doi.org/10.1002/cssc.202002044>.
- [27] S. Straub, P.E. Hirsch, P. Burkhardt-Holm, Biodegradable and petroleum-based microplastics do not differ in their ingestion and excretion but in their biological effects in a freshwater invertebrate *Gammarus fossarum*, *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 14 (2017) 774, <https://doi.org/10.3390/IJERPH14070774>.
- [28] D.S. Green, B. Boots, J. Sigwart, S. Jiang, C. Rocha, Effects of conventional and biodegradable microplastics on a marine ecosystem engineer (*Arenicola marina*) and sediment nutrient cycling, *Environ. Pollut.* 208 (2016) 426–434, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.010>.
- [29] B. McAdam, M.B. Fournet, P. McDonald, M. Mojicevic, Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics, *Polymers* 12 (2020) 1–20, <https://doi.org/10.3390/POLYM12122908>.
- [30] B. Alvarez Chavez, V. Raghavan, B. Tartakovsky, A comparative analysis of biopolymer production by microbial and bioelectrochemical technologies, *RSC Adv.* 12 (2022), 16105, <https://doi.org/10.1039/D1RA08796G>.
- [31] J. Kepa Izaguirre, L. Barañano, S. Castañón, J.A.L. Santos, M. Teresa Cesário, M.R. Manuela da Fonseca, et al., Economic and environmental assessment of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) production from the organic fraction of municipal solid waste, *Bioresour. Bioprocess* 8 (2021) 39, <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00392-4>.
- [32] D.Z. Bucci, L.B.B. Tavares, I. Sell, PHB packaging for the storage of food products, *Polym. Test.* 24 (2005) 564–571, <https://doi.org/10.1016/J.POLYMERTESTING.2005.02.008>.
- [33] ISO 20079, ISO 20079, Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water on Duckweed (*Lemna Minor*) - Duckweed Growth Inhibition Test, 2005.
- [34] L. Li, M. Sillanpää, M. Tuominen, K. Lounatmaa, E. Schultz, Behavior of titanium dioxide nanoparticles in *Lemna minor* growth test conditions, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 88 (2013) 89–94, <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2012.10.024>.
- [35] U. Rozman, T. Turk, T. Skalar, M. Zupancić, N.C. Korosin, M. Marinšek, et al., An Extensive Characterization of Various Environmentally Relevant Microplastics-Material Properties, Leaching and Ecotoxicity Testing, vol. 773, 2021, 145576, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145576>.
- [36] G. Kalčíková, A. Žgajnar Gotvajn, A. Kladnik, A. Jemec, Impact of polyethylene microbeads on the floating freshwater plant duckweed *Lemna minor*, *Environ. Pollut.* 230 (2017) 1108–1115, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.050>.
- [37] OECD, Test No. 221: *Lemna* Sp. Growth Inhibition Test, 2006, <https://doi.org/10.1787/9789264016194-en>.
- [38] Mateos-Cárdenas A., Scott D.T., Seitmaganbetova G., Frank N.A.M. van P., O'Halloran J., Jansen M.A.K., Polyethylene microplastics adhere to *Lemna minor* (L.), yet have no effects on plant growth or feeding by *Gammarus duebeni* (Lillj.), *Sci. Total Environ.* 689 (2019) 413–421, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.359.
- [39] B. Klun, U. Rozman, M. Ogrizek, G. Kalčíková, The first plastic produced, but the latest studied in microplastics research: the assessment of leaching, ecotoxicity and bioadhesion of Bakelite microplastics, *Environ. Pollut.* 307 (2022), 119454, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119454>.
- [40] U. Rozman, G. Kalčíková, The response of duckweed *Lemna minor* to microplastics and its potential Use as a bioindicator of microplastic pollution, *Plants* 11 (2022) 2953, <https://doi.org/10.3390/plants11212953>.
- [41] S. Radić, B. Pevalak-Kozlina, Effects of osmotic stress on antioxidative system of duckweed (*Lemna minor* L.), *Period. Biol.* 112 (2010) 293–299.
- [42] H.K. Lichtenthaler, Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods Enzymol.* 148 (1987) 350–382.
- [43] S. Ceschin, F. Mariani, D. Di Lernia, I. Venditti, E. Pelella, M.A. Iannelli, Effects of microplastic contamination on the aquatic plant *Lemna minuta* (least duckweed), *Plants* 12 (2023) 207, <https://doi.org/10.3390/plants12010207>.
- [44] R. Cui, J. Il Kwak, Y.-J. An, Multigenerational effects of microplastic fragments derived from polyethylene terephthalate bottles on duckweed *Lemna minor*: size-dependent effects of microplastics on photosynthesis, *Sci. Total Environ.* 872 (2023), 162159, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162159>.
- [45] J. Fojt, P. Denková, M. Brtnický, J. Holátko, V. Rezáčová, V. Pecina, et al., Influence of poly-3-hydroxybutyrate micro-bioplastics and polyethylene terephthalate microplastics on the soil organic matter structure and soil water properties, *Environ. Sci. Technol.* 56 (2022) 10732–10742, https://doi.org/10.1021/ACS.EST.2C01970/ASSET/IMAGES/LARGE/ES2C01970_0006.JPEG.
- [46] D. Stanica-Ezeanu, D. Matei, Natural depolymerization of waste poly(ethylene terephthalate) by neutral hydrolysis in marine water, *Sci. Rep.* 11 (2021) 4431, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83659-2>.
- [47] Y. Su, Z. Cheng, Y. Hou, S. Lin, L. Gao, Z. Wang, et al., Biodegradable and conventional microplastics posed similar toxicity to marine algae *Chlorella vulgaris*, *Aquat. Toxicol.* 244 (2022), 106097, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106097>.
- [48] M. González-Pleiter, M. Tamayo-Belda, G. Pulido-Reyes, G. Amarié, F. Leganés, R. Rosal, et al., Secondary nanoplastics released from a biodegradable microplastic severely impact freshwater environments, *Environ. Sci.: Nano* 6 (2019) 1382–1392, <https://doi.org/10.1039/C8EN01427B>.
- [49] V.C. Shrutti, G. Kutralam-Muniasamy, Bioplastics: missing link in the era of microplastics, *Sci. Total Environ.* 697 (2019), 134149, <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.134139>.
- [50] J.C. Anderson, B.J. Park, V.P. Palace, Microplastics in aquatic environments: implications for Canadian ecosystems, *Environ. Pollut.* 218 (2016) 269–280, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.074>.
- [51] A. al Harraq, B. Bharti, Microplastics through the lens of colloid science, *ACS Environmental Au* 2 (2022) 3–10, <https://doi.org/10.1021/acsenvironau.1c00016>.
- [52] C. Hermans, J.P. Hammond, P.J. White, N. Verbruggen, How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci.* 11 (2006) 610–617, <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2006.10.007>.
- [53] N. Cedergreen, T.V. Madsen, Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*, *New Phytol.* 155 (2002) 285–292, <https://doi.org/10.1046/J.1469-8137.2002.00463.X>.
- [54] B. He, G.O. Duodu, L. Rintoul, G.A. Ayoko, A. Goonetilleke, Influence of microplastics on nutrients and metal concentrations in river sediments, *Environ. Pollut.* 263 (2020), 114490, <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.114490>.
- [55] M. Swiontek Brzezinka, A. Richert, A. Kalwasińska, J. Świąteczak, E. Deja-Sikora, M. Walczak, et al., Microbial degradation of polyhydroxybutyrate with embedded polyhexamethylene guanidine derivatives, *Int. J. Biol. Macromol.* 187 (2021) 309–318, <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.07.135>.
- [56] P. Sooriyakumar, N. Bolan, M. Kumar, L. Singh, Y. Yu, Y. Li, et al., Biofilm formation and its implications on the properties and fate of microplastics in aquatic environments: a review, *Journal of Hazardous Materials Advances* 6 (2022), 100077, <https://doi.org/10.1016/J.HAZADV.2022.100077>.
- [57] J. Wang, X. Guo, J. Xue, Biofilm-developed microplastics as vectors of pollutants in aquatic environments, *Environ. Sci. Technol.* 55 (2021) 12780–12790, https://doi.org/10.1021/ACS.EST.1C04466/ASSET/IMAGES/LARGE/ES1C04466_0008.JPEG.
- [58] D. Lobelle, M. Cunliffe, Early microbial biofilm formation on marine plastic debris, *Mar. Pollut. Bull.* 62 (2011) 197–200, <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2010.10.013>.
- [59] C. Tu, T. Chen, Q. Zhou, Y. Liu, J. Wei, J.J. Wanek, et al., Biofilm formation and its influences on the properties of microplastics as affected by exposure time and depth in the seawater, *Sci. Total Environ.* 734 (2020), 139237, <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.139237>.
- [60] S. He, M. Jia, Y. Xiang, B. Song, W. Xiong, J. Cao, et al., Biofilm on microplastics in aqueous environment: physicochemical properties and environmental implications, *J. Hazard Mater.* 424 (2022), 127286, <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.127286>.
- [61] X. Chen, X. Chen, Y. Zhao, H. Zhou, X. Xiong, C. Wu, Effects of microplastic biofilms on nutrient cycling in simulated freshwater systems, *Sci. Total Environ.* 719 (2020), 137276, <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.137276>.
- [62] M. Brtnický, V. Pecina, J. Holátko, T. Hammerschmiedt, A. Mustafa, A. Kintl, et al., Effect of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate amendment on the soil biochemical properties and fertility under varying sand loads, *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 9 (2022) 1–13, <https://doi.org/10.1186/S40538-022-00345-9>.

- [63] H. Zhang, A. Jennings, P.W. Barlow, B.G. Forde, Dual pathways for regulation of root branching by nitrate, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 6529–6534, <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.11.6529/ASSET/7FD992D1-B96A-4FEA-A511-C76AC6A4C6CF/ASSETS/GRAPHIC/PQ1194606005.JPEG>.
- [64] R. Kul, M. Ekinici, M. Turan, S. Ors, E. Yildirim, R. Kul, et al., How Abiotic Stress Conditions Affects Plant Roots, *Plant Roots*. IntechOpen, 2021, <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.95286> [Internet].
- [65] G.H.P. Arts, J.D.M. Belgers, C.H. Hoekzema, J.T.N.M. Thissen, Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, *Environ. Pollut.* 153 (2008) 199–206, <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2007.07.019>.

SUPPORTING INFORMATION

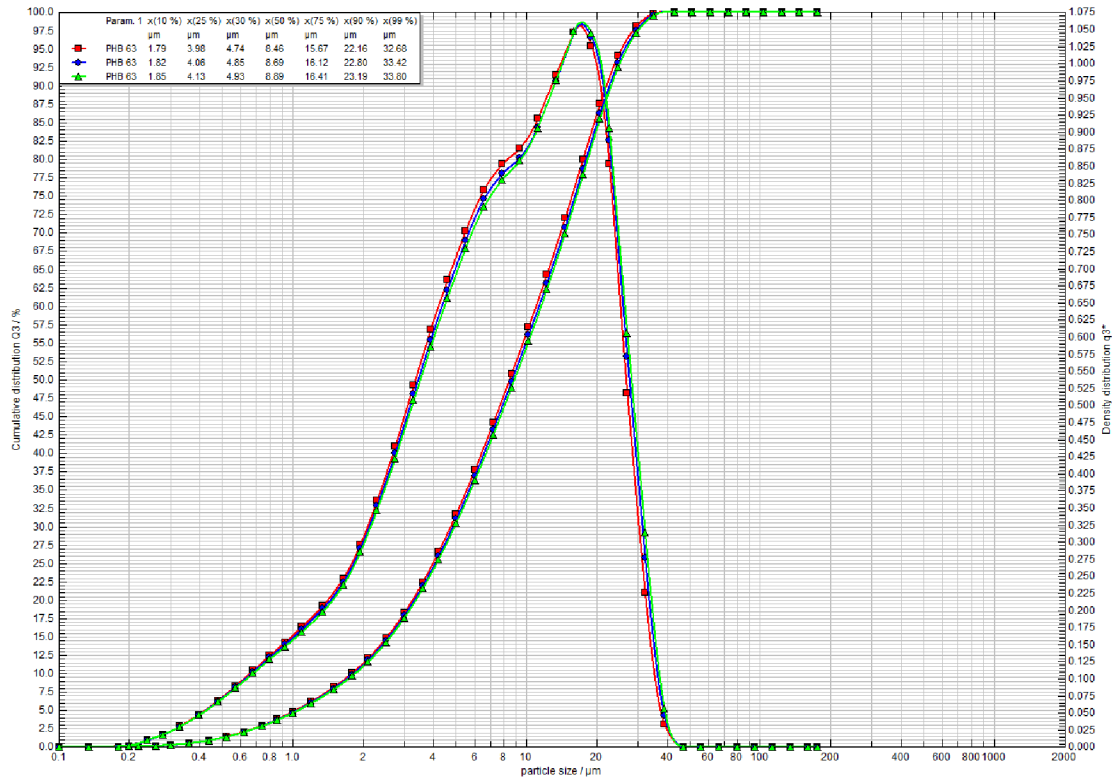


Fig. S1 The repeated measurements of size distribution of P3HB particles <63 μm suspended in deionized water after sonification. The suspension was measured with the dynamic light scattering system HELOS Particle Size Analysis System from Sympatec GmbH

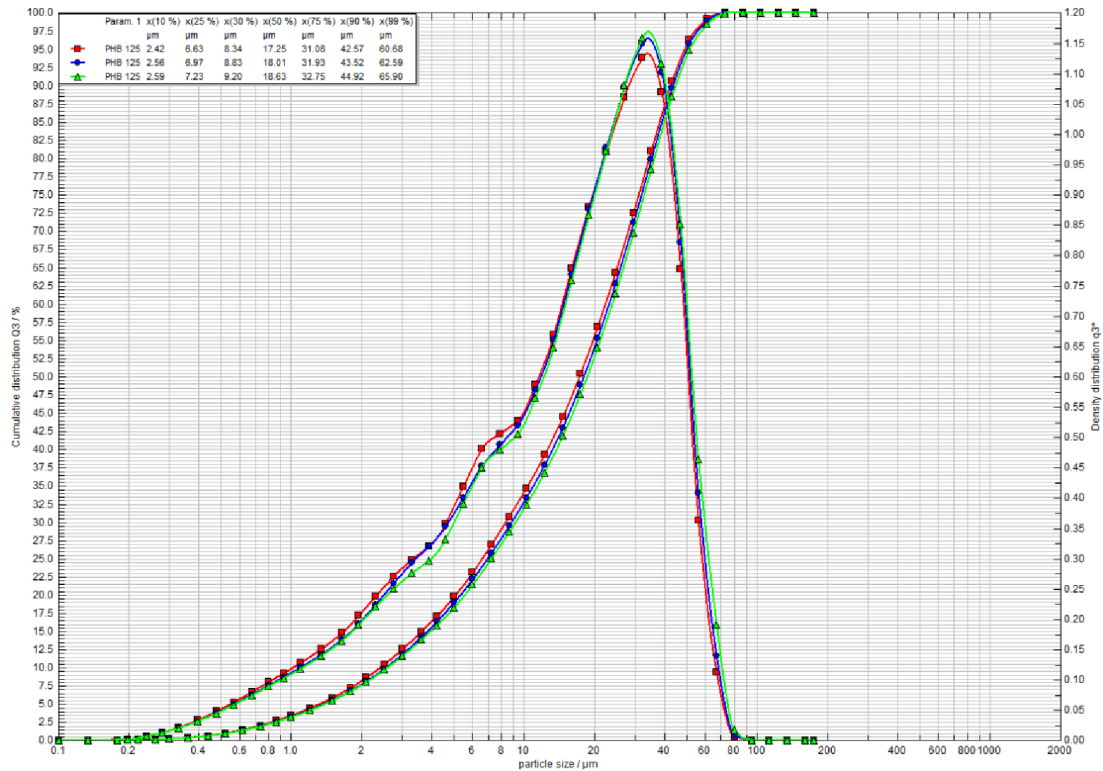


Fig S2 The repeated measurements of size distribution of P3HB particles 63 to 125 μm suspended in deionized water after sonification. The suspension was measured with the dynamic light scattering system HELOS Particle Size Analysis System from Sympatec GmbH

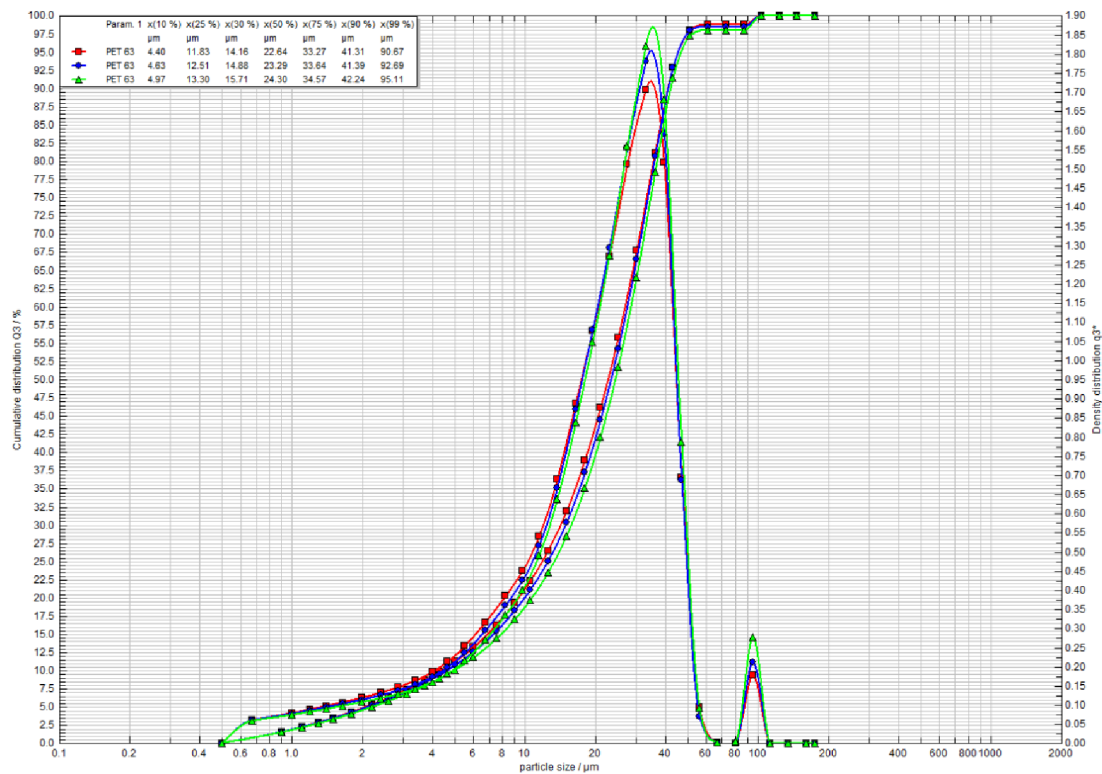


Fig. S3 The repeated measurements of size distribution of PET particles <63 μm suspended in deionized water after sonification. The suspension was measured with the dynamic light scattering system HELOS Particle Size Analysis System from Sympatec GmbH.

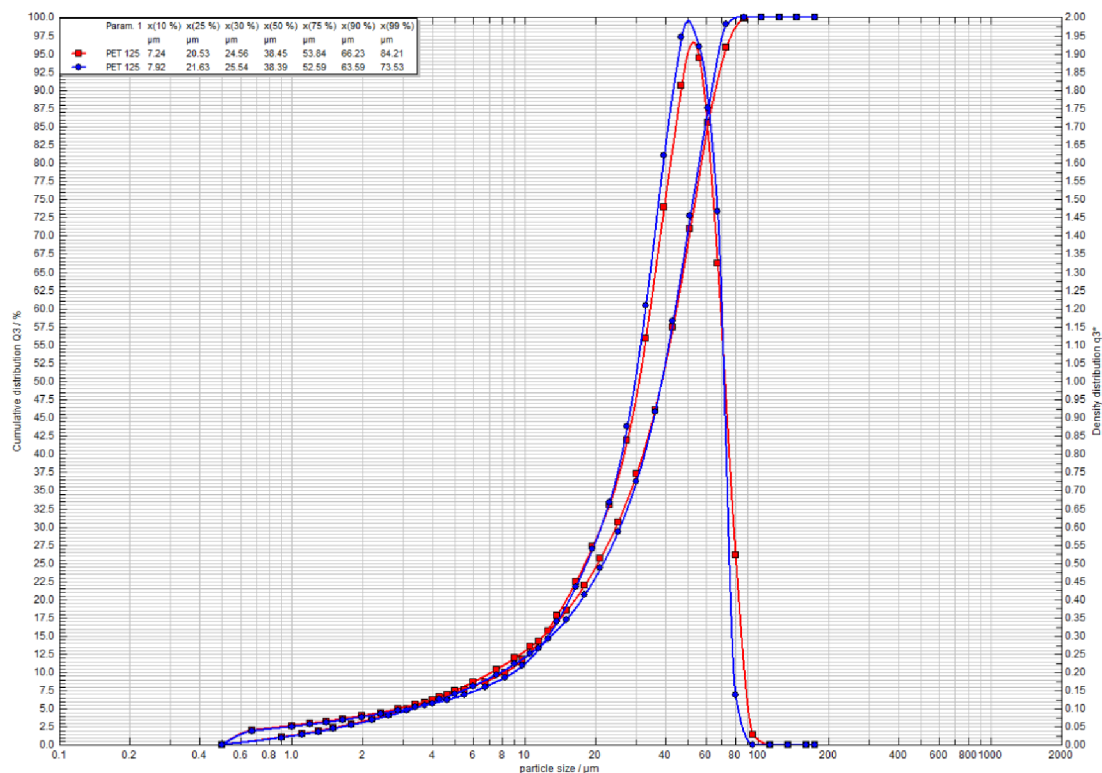


Fig. S4 The repeated measurements of size distribution of PET particles 63 to 125 μm suspended in deionized water after sonification. The suspension was measured with the dynamic light scattering system HELOS Particle Size Analysis System from Sympatec GmbH.

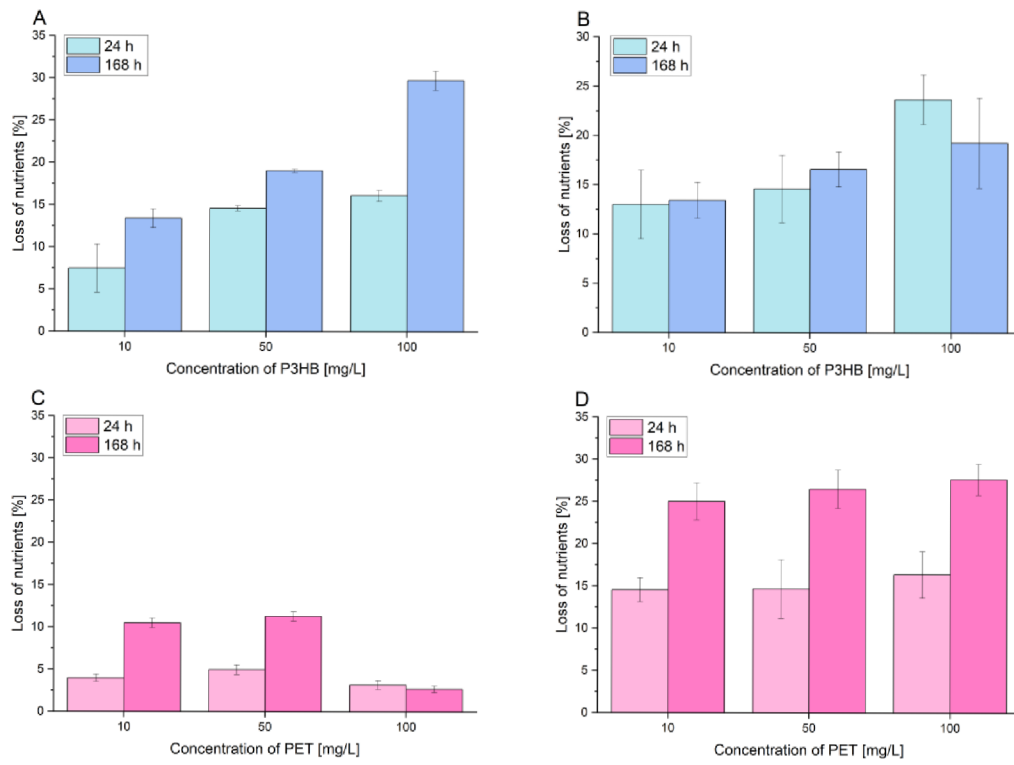


Fig. S5 Results of sorption experiments. A – sorption of nutrients to microparticles of P3HB <63 μm, B – sorption of nutrients to microparticles of P3HB 63 to 125 μm, C – sorption of nutrients to microparticles of PET <63 μm, D – sorption of nutrients to microparticles of PET 63 to 125 μm

PŘÍLOHA B

Manuskript nahrán do časopisu *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*

1 **Innovative approach for quantitative determination of ingested microplastics**
2 **by *Daphnia magna*: Use of Differential Scanning Calorimetry and**
3 **Thermogravimetry**

4 *Petra Procházková¹, Gabriela Kalčíková², Eliška Maršálková¹, Helena Zlámalová Gargošová¹, Jiří Kučerík^{1*}*

5 ¹ *Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, Brno University of*
6 *Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic*

7 ² *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, 113 Večna pot, SI-1000, Ljubljana,*
8 *Slovenia*

9 ** Corresponding author. E-mail address: kucerik@fch.vut.cz.*

10

11 **Abstract**

12 Due to the serious environmental impacts associated with plastic pollution, some
13 conventional plastics have been replaced by biodegradable ones. However, these
14 biodegradable alternatives can also fragment and form microplastics and can be then ingested
15 and affect biota. The common methods for quantifying ingested microplastics involve digestion
16 of gut or whole organism by acidic, alkaline, or oxidative methods. However, biodegradable
17 microplastics may be more likely destroyed by these aggressive methods, leading to erroneous
18 results. Therefore, in this study, we employ thermal analysis methods, specifically differential
19 scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TG), to quantify the ingestion of
20 biodegradable microplastics of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) by freshwater crustacean
21 *Daphnia magna*. Organisms exposed to P3HB of sizes <125 and <63 μm and concentrations
22 ranging from 1.56-25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ during chronic experiment were analyzed. DSC identified an
23 endothermic peak associated with the melting of semicrystalline P3HB, and its enthalpies were
24 utilized to compute the number/mass of P3HB ingested by *D. magna*. Notably, shifts in melting
25 points suggested that higher concentrations induced particles agglomeration and the
26 agglomerates could not penetrate deep into the organism. The TG approach was based on
27 the subtraction of mass loss between 200-400°C in *D. magna* specimens exposed to P3HB

28 suspensions and controls without P3HB. Both methods provided comparable data and
29 revealed that depending on particle size, individual *D. magna* ingested up to 10 % of their body
30 weight. Our findings indicate that both methods are effective for detecting P3HB (and
31 potentially other plastic fragments), with DSC demonstrating superior sensitivity. The
32 introduced methods broaden the scope for detecting ingested microplastics, especially in
33 zooplankton.

34

35 **Keywords**

36 Microplastics, *Daphnia magna*, P3HB, biodegradable plastics, ingestion.

37

38 **Introduction**

39 At present, plastic pollution is among the most frequently discussed environmental issues.
40 It is estimated that 10% of the plastics currently produced enter the oceans [1], with an
41 exponential increase in the coming years [2]. Large plastic particles, macroplastics, are easily
42 visible and adversely affect wildlife organisms through entanglement, ingestion, and
43 lacerations [3]. Microplastics (MPs), plastic particles between 1 and 1 000 μm [4], due to their
44 size, can be taken up by a number of organisms. Their ingestion and negative effects have
45 been demonstrated in freshwater and marine organisms across food chain [1,2,5–7].

46 As the issue of plastic waste and environmental pollution from traditional plastics intensifies,
47 there is a rising demand for eco-friendly and degradable materials. Biodegradable polymers
48 (BDPs) are increasingly in the spotlight due to their ability to biodegrade, offering a solution to
49 the challenge of enduring plastics. Under aerobic conditions, BDPs break down into carbon
50 dioxide, water, and biomass, while methane is produced under anaerobic conditions. They are
51 used across various sectors – including medicine, textiles, personal care manufacturing,
52 agriculture, and packaging – as alternatives to traditional plastics [8–10]. However, similar to
53 their conventional counterparts, BDPs can break down into small particles in natural settings,
54 leading to the accumulation of significant quantities of so called microbioplastics (i.e.,
55 biodegradable microplastics [9,11]; a note: in this work, we use for both biodegradable and
56 non-biodegradable plastic particles a term microplastics). Even with their biodegradable
57 nature, these microplastics can persist for extended periods of time. This is because
58 biodegradation is a lengthy process, influenced by both biotic and abiotic environmental factors
59 such as temperature, humidity, pH, active biological substances, and enzymes. Depending on
60 the specific polymer, BDPs might remain in the natural environment for several years or even
61 decades [12,13].

62 As a consequence, microplastics from both biodegradable and non-biodegradable plastics
63 can be ingested by various organisms as previously documented. For example, Cole et al. [1]
64 found that thirteen zooplankton taxa could ingest polystyrene (PS) beads ranging from 1.7 to

65 30.6 μm in size. The rate of uptake varied based on the taxon, life stage, bead size, and the
66 appendages of the exposed zooplankton. Scherer et al. [14] further confirmed the ingestion of
67 microplastics by freshwater invertebrates, using species like *Daphnia magna*, *Chironomus*
68 *riparius*, *Physella acuta*, *Gammarus pulex*, and *Lumbriculus variegatus*. All these species
69 ingested PS microspheres of 1 and 10 μm . But the probability ingestion is influenced by several
70 factors: the type of microplastics, their concentration, and the frequency with which these
71 particles fall within the size range of naturally consumable items for the organism [15]. The
72 methods used for quantification of microplastics includes fluorescence labeling of microplastics
73 combined with spectrophotometric techniques [1,16,17], stereo/microscopic examinations
74 [15,18–27], and determining particle volume concentration through particle size analyzers [28],
75 gravimetric methods [27], gut content inspection [22,29] or pyrolysis-gas chromatography-
76 mass spectrometry (Py-GC-MS, [30]). However, many of these methods can have important
77 limitations as for example Schür et al. [24] caution that fluorescent labeling might result in dye
78 leaching within the organisms, potentially leading to false positives in microplastic detection.
79 During the visual inspection, some particles can be overlooked and when employing digestion
80 methods to recover microplastics from gut or the whole organisms the digestion can lead to a
81 potential loss of certain microplastics. For example, a digestion of fragile Bakelite microplastics
82 led to 20% loss of the mass of particles [31]. This can be also true for biodegradable
83 microplastics that are supposedly less persistent.

84 In this context, we aimed to develop approach for direct quantification of microplastics in
85 small aquatic organisms. For this purpose, the water flea *D. magna* was selected as model
86 filter-feeding zooplankton. This organism non-selectively consumes particles ranging in size
87 from less than 1 μm to about 70 μm [15] and is a widely used model organism in microplastic
88 research [32,33]. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) was chosen as model microplastic particles
89 because of recent interest in the use of P3HB in various applications [34,35] and thus the
90 possibility that they will enter the aquatic environment in high extent. We focused on using of
91 two fundamental thermoanalytical methods such as Differential Scanning Calorimetry (DSC)

92 and Thermogravimetry (TG). Both methods are robust and sensitive and commonly used for
93 qualitative and quantitative analysis of samples which can be used with any special sample
94 pretreatment.

95 The objectives of this study are:

96 i) to develop an approach for both qualitative and quantitative analysis of P3HB particles
97 ingested by *D. magna*,

98 ii) to investigate the influence of particle size on the quantity of P3HB ingested by *D. magna*

99 iii) to compare the reliability of the employed methods.

100

101 **Materials and Methods**

102 *Microplastics*

103 The P3HB (ENMAT Y3000) microplastics with a spherical shape were used (from TianAn
104 Biologic Materials Co., Ltd., Ningbo City, China). A suspension of P3HB microplastics in MilliQ
105 water was sieved on 63 and 125 μm mesh stainless-steel sieves, and both size fractions (<63
106 μm – referred as “63” and from 63 to 125 μm – referred as “125”) were subsequently dried in
107 glass beakers at room temperature in a fume hood. Importantly, as follows from the distribution
108 enclosed in Supporting information ([Figure S1 and S2](#)), the size of the particles does not
109 correspond exactly to those size, because the particles were not ultrasonicated, as described
110 further on. However, for easier orientation in the text, we use the size of the mesh used for
111 particles preparation.

112 *Exposure of D. magna to microplastics*

113 The test organism *D. magna* from laboratory culture at the Institute of Chemistry and
114 Technology of Environmental Protection (Faculty of Chemistry, Brno University of Technology,
115 Czech Republic) was cultured in ASTM reconstituted hard water [36] amended with selenium,

116 vitamins (biotin, thiamine, cyanocobalamine, according to the OECD guideline 202 [37]) and
117 20 µL/L seaweed extract (Marinure, Glenside, Scotland) according to [38]. The medium was
118 changed three times a week and the organisms were fed with green algae *Desmodesmus*
119 *subspicatus* equivalent to 200 µg carbon per organism daily. The culture was kept at
120 temperature $20 \pm 1^\circ\text{C}$ and a light:dark regime of 16:8 (800-1000 lux).

121 According to the preliminary experiment, the concentration range of P3HB particles in
122 suspensions was selected to 0, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5 and 25 mg·L⁻¹. The suspensions of
123 particles were prepared by weighing the desired amount of P3HB and transferring it to a
124 volumetric flask; then, the volumetric flask was filled to the mark with ASTM reconstituted hard
125 water enriched with vitamins and seaweed extract (see above). The suspension thus prepared
126 was ultrasonicated for 10 min to disperse the particles. The experiments were conducted in
127 150 mL glass beakers, and each was filled with 100 mL of test suspension. Each experiment
128 (63 and 125 µm) involved ten replicates of the same exposure concentrations and was
129 repeated three times. Into each test vessel, one juvenile of *D. magna* younger than 24 h was
130 placed. The experiment conditions were identical to culture conditions. At the end of the test,
131 alive organisms *D. magna* were carefully rinsed with deionized water to assure that P3HB
132 particles did not remain on their surface. Subsequently, they were air-dried.

133 *Analysis of P3HB content in D. magna*

134 Differential scanning calorimetry (DSC) TA Instruments Q250 (Delaware, New Castle, USA)
135 was used to analyze the melting enthalpy of P3HB in *D. magna*. Either 6 or 7 specimens of
136 *D. magna* were placed into the aluminium Tzero pan, non-hermetically sealed to ensure that
137 the *D. magna* is in the contact with the bottom of the pan. Following temperature program was
138 used. 1) Heating from 30 to 105 °C by heating rate 10 °C·min⁻¹, 2) an isotherm for 1 minute, 3)
139 heating to 200 °C by heating rate 10 °C·min⁻¹. The same method was used for the
140 measurement of P3HB. Samples were measured in triplicate with some exceptions. P3HB
141 melts around 170 °C, therefore, for the analysis of P3HB content in *D. magna* was used the
142 third run. Here, an endothermal peak corresponding to P3HB melting appeared in *D. magna*

143 exposed to P3HB suspension. The peak was analyzed for its area (melting enthalpy) and onset
144 temperature.

145 Samples analyzed by using DSC were then collected, removed from the pan, and measured
146 using thermogravimetry (TG) TA Instruments Q550 (Delaware, New Castle, USA). Heating
147 from laboratory temperature (25 °C) to 700 °C by 10 °C·min⁻¹ was used to analyse moisture
148 content (up to 200 °C) and mass loss between 200-400 °C. Also, in this case were analyzed
149 both *D. magna* exposed to P3HB suspension and control without P3HB. As followed from
150 obtained TG records of pure P3HB and samples, P3HB degrades in the temperature interval
151 200-400 °C. For that reason, the determination of P3HB content in *D. magna* were subtracted
152 mass loss of *D. magna* with and without P3HB in this temperature interval.

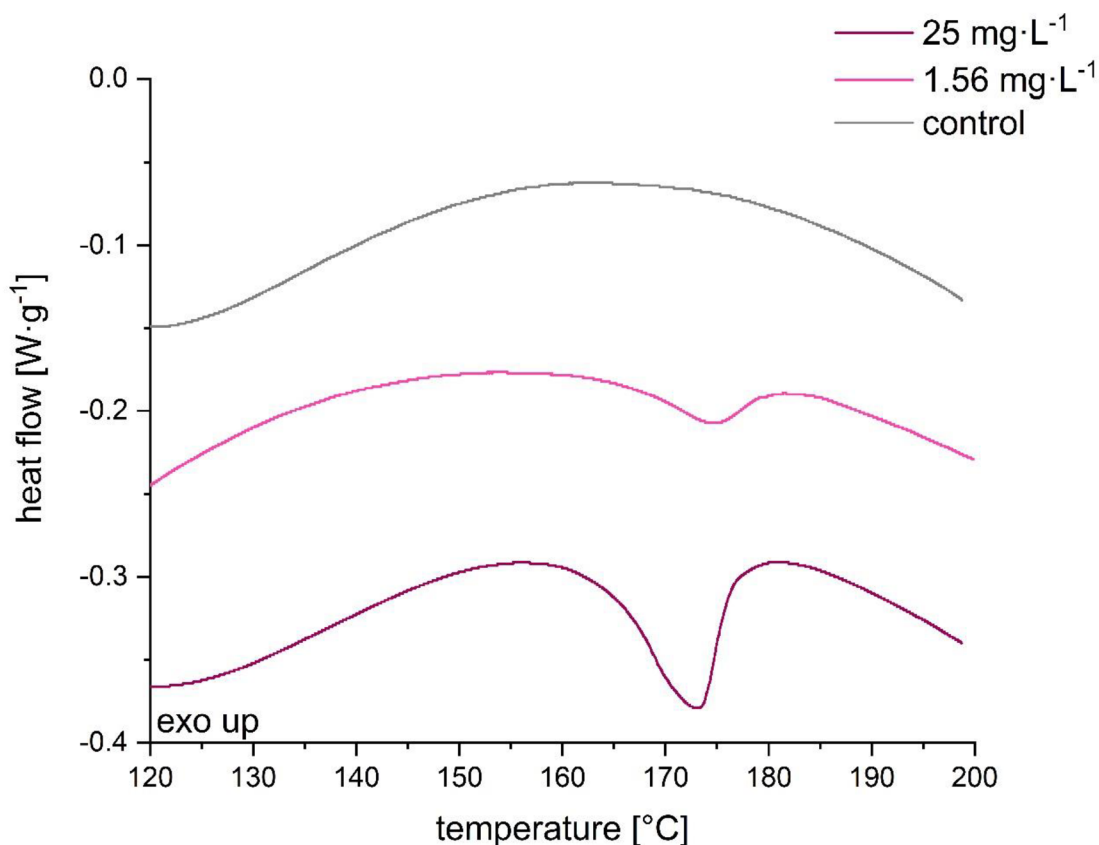
153 The determination of the P3HB content using DSC was analyzed as follows: 1g of purely
154 crystalline P3HB would give the enthalpy 146 J [39,40], therefore, the measured enthalpy
155 divided by 146 and multiplied by 1 g would give the content of crystalline part digested by
156 *D. magna*. An exemplary measurement of 6 pieces of *D. magna* treated with 125 µg P3HB at
157 25 mg·L⁻¹ provided a melting peak with 0.0138 J. Calculation of $(0.0138/146) \times 1 = 9.5 \times 10^{-5}$ g or
158 9.5×10^{-2} mg of P3HB with 100% crystallinity. However, the crystallinity of P3HB used in this
159 work is not 100%, instead for pure P3HB DSC experiments showed a single peak with onset
160 temperature 164.5 ± 0.2 °C and melting enthalpy 71.2 ± 0.6 J·g⁻¹. Accordingly, the crystallinity
161 of P3HB used in this work is approximately 49%, i.e. $(71.2/146) \times 100 = 48.7\%$. Therefore, taking
162 into account also the amorphous part of P3HB, the recalculation gives 0.19 mg of P3HB in
163 measured sample of *D. magna*. This content is then used for determination of the content of
164 P3HB in *D. magna*.

165

166 **Results**

167 *DSC analysis*

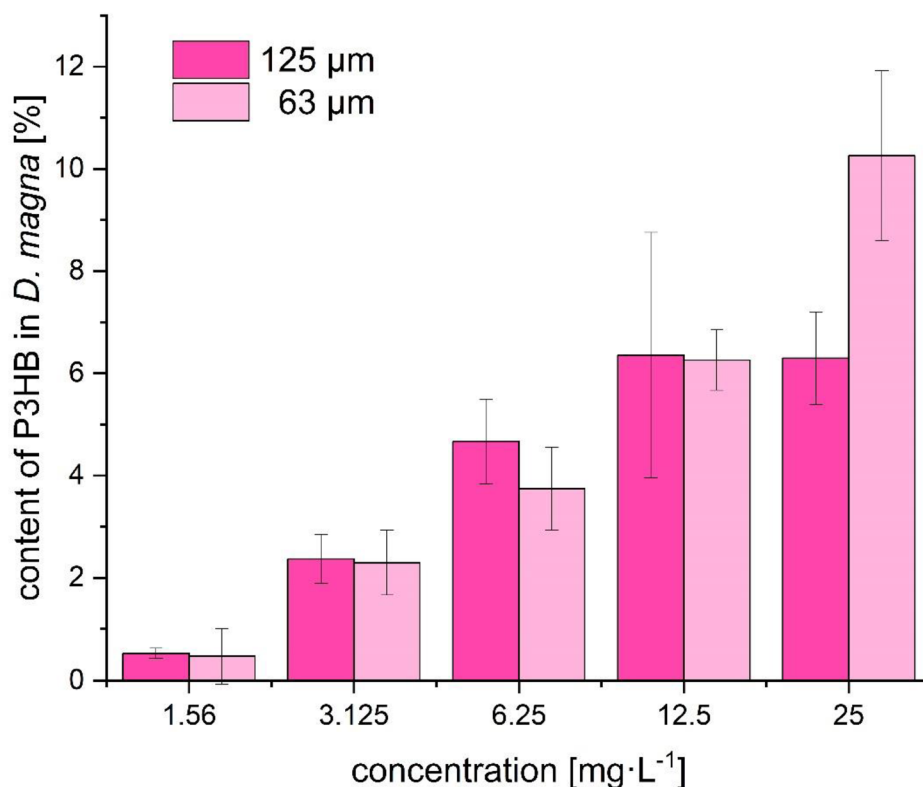
168 As aforementioned in Experimental part, melting enthalpy of P3HB is proportional to its
169 content in the sample of *D. magna* exposed to P3HB suspension. Figure 1 shows exemplary
170 records of *D. magna* exposed to 1.56 and 25 mg·L⁻¹ P3HB suspension, fraction 125 and control
171 treatment with no P3HB. Melting event appeared at temperatures around 170 °C and was very
172 noticeable even in individuals exposed to the lowest concentrations of P3HB. In addition, the
173 peak area corresponding to the content of P3HB increased with increasing initial concentration
174 of P3HB in suspension. On the contrary, *D. magna* from control treatment with no P3HB gave
175 no melting event.



176
177 Figure 1. Exemplary DCS records between 120-200 °C of *D. magna* exposed to suspensions 25 and
178 1.56 mg·L⁻¹ P3HB and *D. magna* from control treatment with no P3HB. In the record are exothermal
179 process oriented up.

180 The amounts of P3HB in *D. magna* exposed to various concentrations are reported in Figure
181 2. The results confirm the preliminary observation (Figure 1) that with increasing initial

182 concentration of P3HB in suspension increases also the content of P3HB in *D. magna*. Notably,
183 in *D. magna* exposed to 125 μm P3HB, the amount detected by DSC ranged from 0.5-6.3 wt%,
184 in *D. magna* exposed to 63 μm it ranged from 0.5 to 10.3 wt%.



185

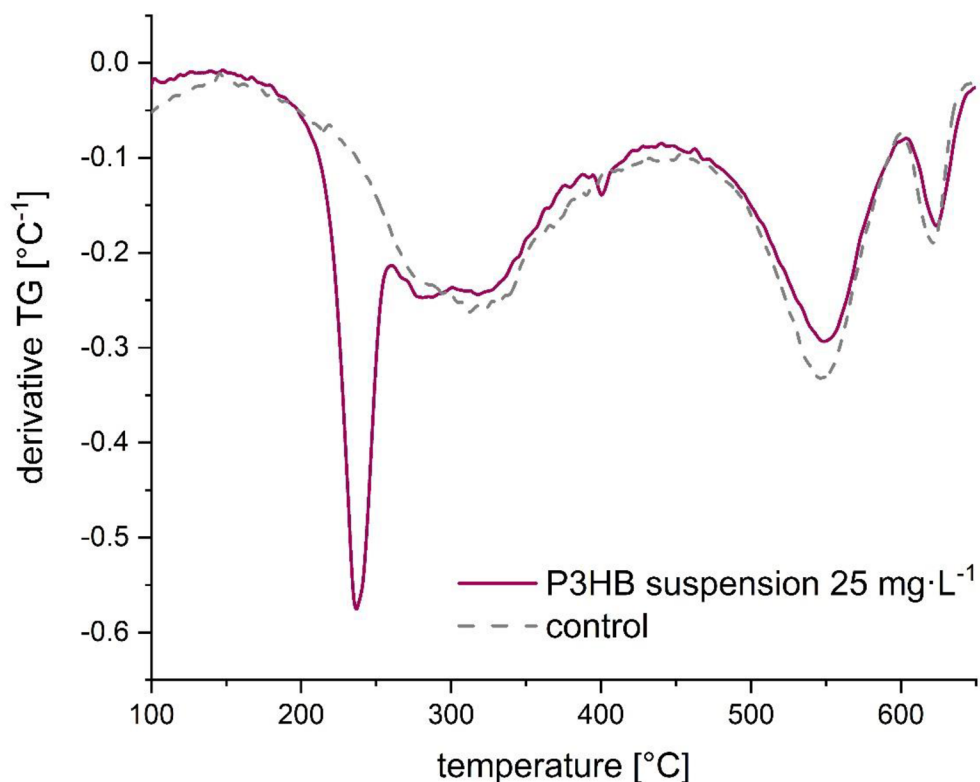
186 *Figure 2. Content of P3HB in D. magna analyzed using DSC in dependency on initial concentration of*
187 *the P3HB suspension for both size fractions.*

188

189 *TG analysis*

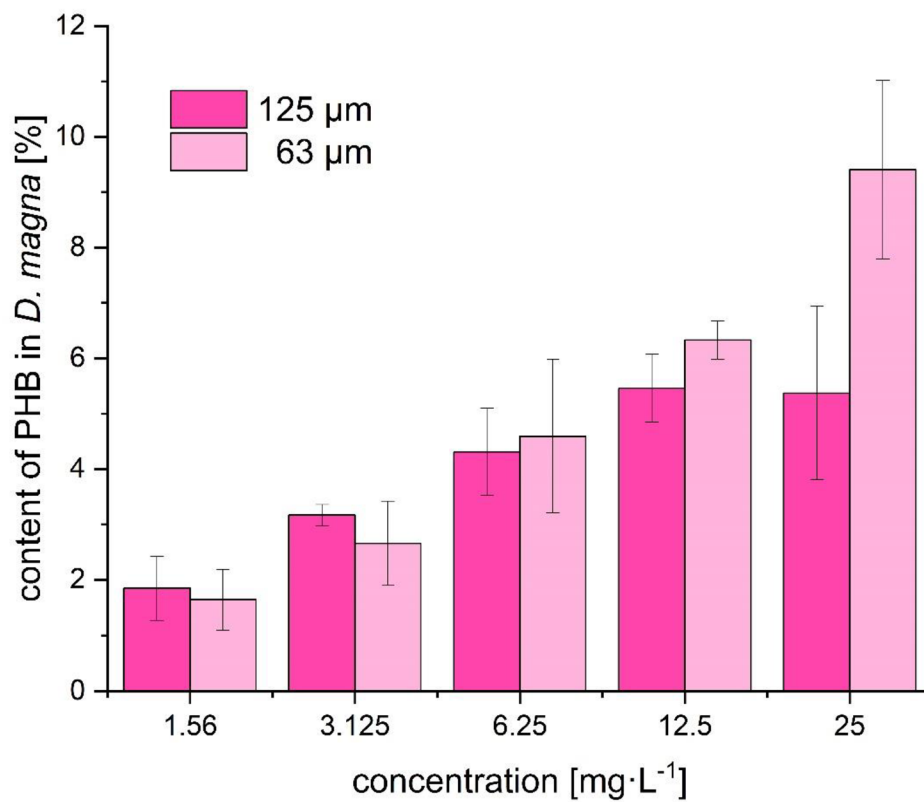
190 The TG experiments were based on a comparison of the TG record (i.e., mass losses) of
191 *D. magna* exposed to P3HB microplastics and those from control treatment. In [Figure 3](#) are
192 reported the derivative TG records. In fact, up to approximately 200 °C takes place mainly the
193 evaporation of water, above 200 °C starts the degradation which proceeds to approximately
194 650 °C. The comparison of the DTG record of *D. magna* with and without P3HB indicates that

195 the differences on DTG curves are noticeable in the range from 200 to approximately 400 °C.
196 Differences in mass losses in the range of 200-400 °C were therefore used to determine the
197 P3HB content in *D. magna*.



198
199 *Figure 3. Exemplary TG records between 100-650 °C of D. magna exposed to P3HB suspensions*
200 *25 mg·L⁻¹, fraction 125 μm and from control treatment with no P3HB.*

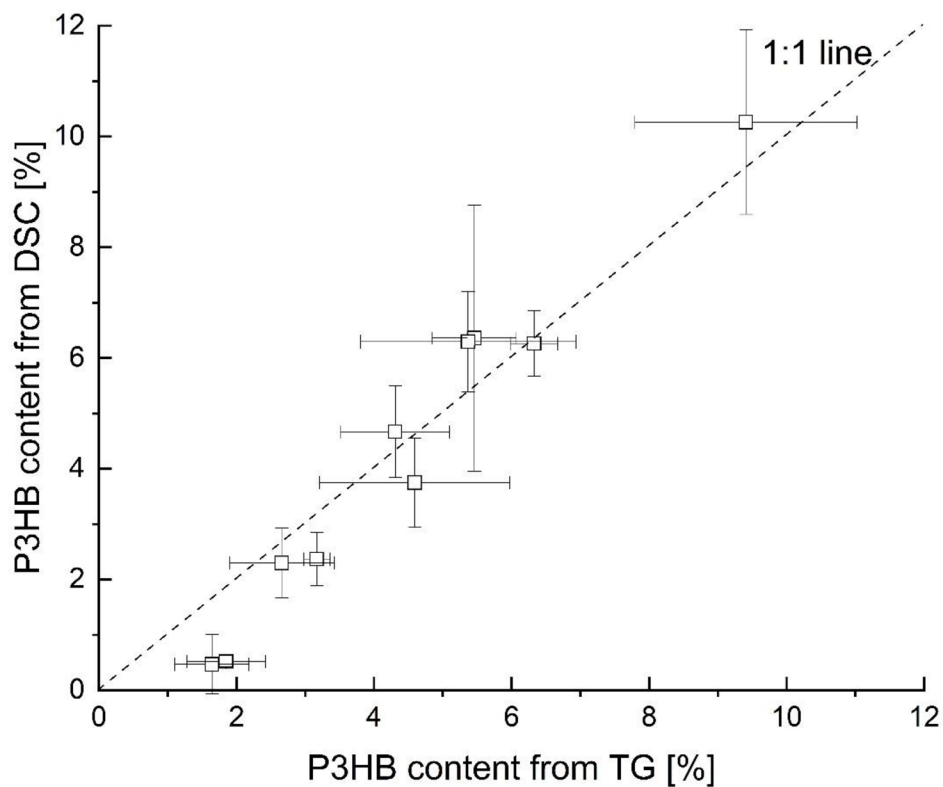
201 TG results (Figure 4) showed the same trend as DSC (Figure 2), i.e., an increased content
202 of P3HB in *D. magna* exposed to higher concentrations of P3HB in suspension. As it can be
203 seen in Figure 5, which compares the results of both DSC and TG, the results were comparable
204 in the concentration range from 3.125-25 mg·L⁻¹, whereas at 1.56 mg·L⁻¹ the results differed
205 substantially.



206

207 *Figure 4. Content of P3HB in D. magna analyzed by using TG in dependency on initial concentration*

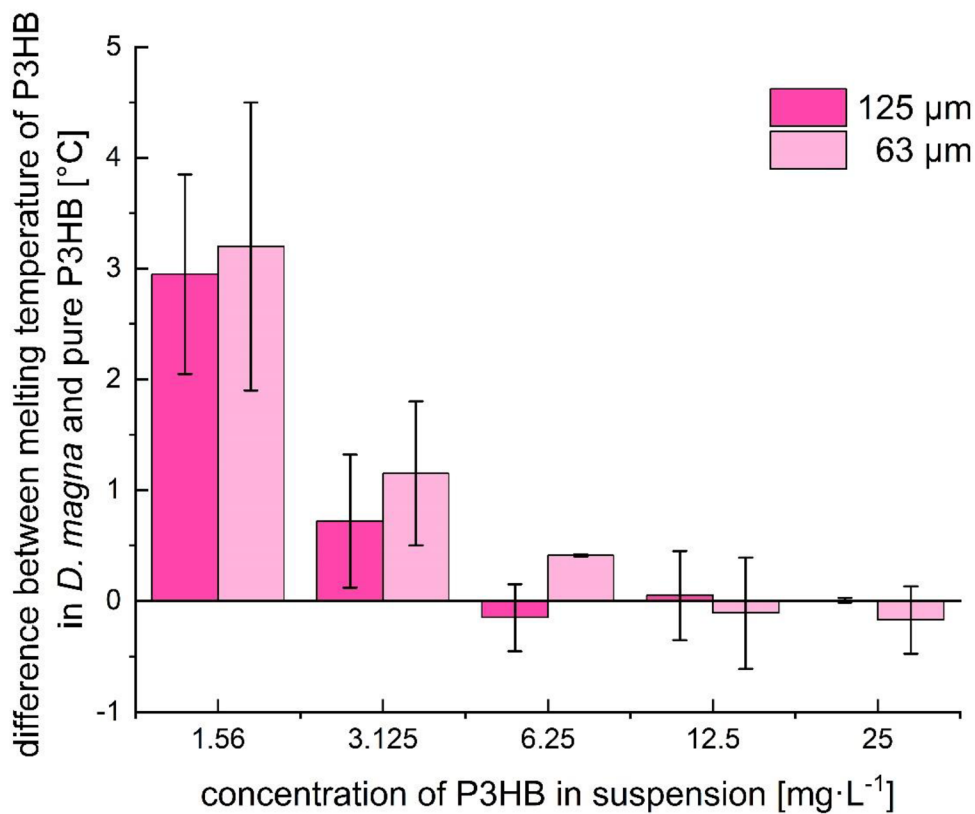
208 *of the P3HB suspension for both size fractions.*



209

210 *Figure 5. Comparison of P3HB content in D. magna obtained by TG and DSC for both size fractions*
 211 *together.*

212 Last parameter, which was determined from DSC data was the onset temperature of melting
 213 P3HB in *D. magna*. The results were compared with results of pure P3HB. The results are
 214 summarized in [Figure 6](#) and show that the largest differences were observed in *D. magna*
 215 exposed to lower concentrated suspensions (1.56 and $3.125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), whereas the higher
 216 concentrations showed no difference when compared to pure P3HB.



217

218 *Figure 6. Differences of melting temperatures of P3HB in D. magna and pure P3HB for both size*
 219 *fractions.*

220

221 Discussion

222 Quantitative and qualitative analysis of microplastics ingested by zooplankton is challenging
 223 due to the small size of the organisms studied and the associated low concentrations of
 224 ingested microplastics. Many of the methods used to date have numerous limitations, are time
 225 consuming, and loss of particles during analysis is common problem. To overcome these
 226 problems, we tested DSC and TG methods for rapid qualitative and quantitative analysis of
 227 microplastics. We demonstrated that the use of DSC and TG methods is feasible, and they
 228 can reliably detect microplastics P3HB in the water flea *D. magna*.

229 DSC has been used for the determination of microplastics in various environmental
230 matrices, mainly in water (after sample preconcentration and drying, [41–47]). Nevertheless,
231 the used approaches were never designed to analyze the ingested MPs directly in zooplankton
232 and with no pretreatment. In this study we evaluated the mass of ingested P3HB (from [Figure](#)
233 [2](#)) and results showed that about 4-22 and 3-34 μg of P3HB for 125 and 63 μm fractions,
234 respectively were ingested by one *D. magna*. An average air-dried *D. magna* weight was
235 around 426 μg including about 10% moisture.

236 The approach reported here did not allow to calculate neither level of determination (LOD)
237 nor level of quantification (LOQ) for both methods. To test the method sensitivity, an additional
238 DSC experiment with only one piece of *D. magna* exposed to the lowest concentration
239 ($1.56 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) of P3HB gave 3 μg of P3HB per one *D. magna* for 63 μm fraction and 4 μg for
240 125 μm . This showed that DSC is sensitive enough to determine the presence of P3HB in one
241 *D. magna* specimen. Quantitatively, the result obtained for one *D. magna* at both particle sizes
242 corresponds to the data obtained for measurements with a larger amount of *D. magna*
243 (explained above) confirming that DSC can be reliably used for different masses of
244 investigated organisms.

245 Furthermore, higher concentrations of P3HB showed minimal differences in melting
246 temperatures compared to pure P3HB, whereas at lower concentrations were the
247 temperatures about 3 $^{\circ}\text{C}$ higher. We speculate that this may be due to the distribution of
248 particles in the guts of *D. magna*. When the concentration is lower, the particles are separated
249 deeper inside the daphnia which thermally insulates the particle, causing a "delay" i.e., a higher
250 melting point. On the contrary, higher concentration induces aggregation, larger aggregates
251 are less isolated by the body of *D. magna* and are not located so deep in the body of *D. magna*.
252 As a result, there is no difference compared to pure P3HB, or it is smaller. In both size fractions,
253 we observed the aggregation from a concentration of $6.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of P3HB in suspension.
254 Since there was a difference in the amount of P3HB in *D. magna* between the individual

255 fractions, it can be assumed that aggregation occurred in the *D. magna* itself after it was
256 ingested.

257 Nevertheless, the DSC method has also some limitations and one of the most important is
258 the melting point of microplastics. P3HB has a relatively low melting point while the
259 temperatures above 200 °C would lead to temperature degradation of *D. magna* (see TG
260 record [Figure 3](#)). It is a matter of experience that the degradation products may cause problems
261 in the DSC cell. In other words, the DSC method is applicable to the analysis of microplastics
262 such as high density polyethylene (HDPE, melting temperature 125 °C [48], low density
263 polyethylene (LDPE, 106-112 °C [49]), polylactic acid (PLA, 150-160 °C [50]), polypropylene
264 (PP, 130-171 °C [51,52]), and it is less suitable for polyvinylchloride (PVC, 115-245 °C [53])
265 and unsuitable for polyethylenterephthalat (PET, 245-265 °C [54]), polystyrene (PS, 207-297 °C
266 [55]), etc.

267 Thermal analysis methods are used for the determination of microplastics in various
268 environmental compartments mostly as pyrolysis techniques associated with gas analysis
269 [56,57]. However, there are also works that use gravimetric determination. For example, in the
270 paper (see above [27]), the authors exposed 100 pieces of *D. magna* of similar size to PS
271 microplastics and compared their total weight with 100 pieces of *D. magna*, which were not
272 exposed to microplastics. However, this approach is problematic regarding the variable weight
273 of *D. magna* individuals. For example, in this work their weight ranged from 160-660 µg, which
274 can strongly compromise the above-mentioned approach. The use of TG eliminates this
275 problem by using only parts of the weight loss of *D. magna*, i.e., it considers the % loss in
276 individuals and not their total weight.

277 Both DSC ([Figure 2](#)) and TG ([Figure 4](#)) showed that the increase of P3HB in *D. magna* was
278 nonlinear, reaching a maximum between 12.5 and 25 mg·L⁻¹ in the 125 µm series, while in
279 63 µm was still sharply increasing. As already mentioned, the *D. magna* can ingest a particle
280 smaller than 70 µm [15]. According to particle size distribution ([Figure S1 and S2](#)), almost all
281 of the particles could be ingested by *D. magna* so the reason why in the treatment with highest

282 concentration of 125 μm P3HB particles were not ingested in the same extent as of 63 μm is
283 most likely due to the above-mentioned agglomeration of the particles.

284 Furthermore, the results of both methods were comparable (Figure 5) and results showed
285 that they differ only in low concentration. The position of 1:1 line suggests the TG data
286 deviation. This may be because in this case we subtracted two TG curves from each other,
287 which can introduce an error to the P3HB quantitative determination. However, it should be
288 noted that in the case of unknown microplastics, even the use of DSC could be problematic,
289 given that the crystallinity of P3HB is not always known. In our work, we obtained 49%
290 crystallinity. However, the literature data also reports values between 50-80% [58–60], which
291 would slightly lower the P3HB content. However, different crystallinity is not a problem if we
292 are carrying out ecotoxicological or mesocosm experiments/studies where the
293 material/microplastics properties can be determined/controlled and analyzed.

294

295 **Conclusion**

296 In this work we introduced fast thermoanalytical approaches providing proxy data for
297 determination of microplastics ingested by zooplankton. Both methods are fast and robust and
298 do not require sample visualization or any chemical (e.g., digestion) or physical sample
299 pretreat (e.g., grinding). The provided data give the information in the mass of the microplastics
300 per mass of an animal/organism, therefore, they cannot provide the data on particle count as
301 for example microscopy. Nevertheless, DSC method appeared to be able to analyze
302 microplastics at low concentrations in single *D. magna*. Although we analyzed only one type
303 of microplastics, it can be assumed that mainly DSC could be used for more polymer types
304 providing that their melting temperatures are far enough to analyze individual peaks. In
305 addition, to reach more precise data, use of DSC would be more beneficial to analyzed
306 zooplankton obtained from experiments carried out under controlled conditions, with known
307 crystallinity of microplastics.

308 **Acknowledgement**

309 This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic
310 [project FCH-S-23-8297]. GK acknowledge Slovenian Research and Innovation Agency
311 [Research program P2-0191] for financial support. This article is based upon work from COST
312 Action CA20101 Plastics monitoring detection Remediation recovery - PRIORITY,
313 supported by COST (European Cooperation in Science and Technology, www.cost.eu).

314

315 **References**

- 316 1. Cole M, Lindeque P, Fileman E, Halsband C, Goodhead R, Moger J, et al. Microplastic ingestion by
317 zooplankton. *Environ Sci Technol*. 2013;47:6646–55. <https://doi.org/10.1021/es400663f>
- 318 2. Samadi A, Kim Y, Lee SA, Kim YJ, Esterhuizen M. Review on the ecotoxicological impacts of plastic
319 pollution on the freshwater invertebrate *Daphnia*. *Environ Toxicol*. 2022;37:2615–38.
320 <https://doi.org/10.1002/tox.23623>
- 321 3. Kühn S, Bravo Rebolledo EL, van Franeker JA. Deleterious Effects of Litter on Marine Life. *Marine*
322 *Anthropogenic Litter*. Springer International Publishing; 2015; 1:75–116.
323 <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3>
- 324 4. Hartmann NB, Hüffer T, Thompson RC, Hassellöv M, Verschoor A, Daugaard AE, et al. Are We
325 Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for
326 Plastic Debris. *Environ Sci Technol*. 2019;53:1039–47. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05297>
- 327 5. Lusher AL, Welden NA, Sobral P, Cole M. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested
328 by fish and invertebrates. *Analytical Methods*. 2017;9:1346–60.
329 <https://doi.org/10.1039/C6AY02415G>
- 330 6. Rakib MRJ, Sarker A, Ram K, Uddin MG, Walker TR, Chowdhury T, et al. Microplastic Toxicity in
331 Aquatic Organisms and Aquatic Ecosystems: a Review. *Water, Air, & Soil Pollution* 2023;234:52.
332 <https://doi.org/10.1007/s11270-023-06062-9>
- 333 7. de Sá LC, Oliveira M, Ribeiro F, Rocha TL, Futter MN. Studies of the effects of microplastics on
334 aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Science*
335 *of The Total Environment*. 2018;645:1029–39. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.207>
- 336 8. Luckachan GE, Pillai CKS. Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging
337 Perspectives. *J Polym Environ*. 2011;19:637–76. <https://doi.org/10.1007/s10924-011-0317-1>
- 338 9. Song JH, Murphy RJ, Narayan R, Davies GBH. Biodegradable and compostable alternatives to
339 conventional plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*.
340 2009;364:2127–39. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0289>
- 341 10. Zhao X, Cornish K, Vodovotz Y. Narrowing the Gap for Bioplastic Use in Food Packaging: An
342 Update. *Environ Sci Technol*. 2020; 54:4712–32. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03755>
- 343 11. Fojt J, David J, Přikryl R, Řezáčová V, Kučerík J. A critical review of the overlooked challenge of
344 determining micro-bioplastics in soil. *Science of the Total Environment*. 2020;745:140975
345 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140975>
- 346 12. Agarwal S. Biodegradable Polymers: Present Opportunities and Challenges in Providing a
347 Microplastic-Free Environment. *Macromol Chem Phys*. 2020;221:2000017.
348 <https://doi.org/10.1002/macp.202000017>
- 349 13. Wei XF, Bohlén M, Lindblad C, Hedenqvist M, Hakonen A. Microplastics generated from a
350 biodegradable plastic in freshwater and seawater. *Water Res*. 2021;198:117123.
351 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117123>
- 352 14. Scherer C, Brennholt N, Reifferscheid G, Wagner M. Feeding type and development drive the
353 ingestion of microplastics by freshwater invertebrates. *Sci Rep*. 2017;7:17006.
354 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17191-7>

- 355 15. Frydkjær CK, Iversen N, Roslev P. Ingestion and Egestion of Microplastics by the Cladoceran
356 *Daphnia magna*: Effects of Regular and Irregular Shaped Plastic and Sorbed Phenanthrene. *Bull*
357 *Environ Contam Toxicol*. 2017;99:655–61. doi: 10.1007/s00128-017-2186-3
- 358 16. Rist S, Baun A, Hartmann NB. Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* –
359 Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environmental*
360 *Pollution*. 2017;228:398–407. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.048>
- 361 17. Sadler DE, Brunner FS, Plaistow SJ. Temperature and clone-dependent effects of microplastics on
362 immunity and life history in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*. 2019;255:113178.
363 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113178>
- 364 18. Kokalj AJ, Kunej U, Skalar T. Screening study of four environmentally relevant microplastic
365 pollutants: Uptake and effects on *Daphnia magna* and *Artemia franciscana*. *Chemosphere*.
366 2018;208:522–9. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.172>
- 367 19. Canniff PM, Hoang TC. Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal
368 growth. *Science of the Total Environment*. 2018;633:500–7.
369 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.176>
- 370 20. De Felice B, Sabatini V, Antenucci S, Gattoni G, Santo N, Bacchetta R, et al. Polystyrene
371 microplastics ingestion induced behavioral effects to the cladoceran *Daphnia magna*. *Chemosphere*.
372 2019;231:423–31. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.115>
- 373 21. Kim D, Kim H, An YJ. Effects of synthetic and natural microfibers on *Daphnia magna*—Are they
374 dependent on microfiber type? *Aquatic Toxicology*. 2021;240:105968.
375 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105968>
- 376 22. Jemec A, Horvat P, Kunej U, Bele M, Kržan A. Uptake and effects of microplastic textile fibers on
377 freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*. 2016;219:201–9.
378 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.037>
- 379 23. Elizalde-Velázquez A, Carcano AM, Crago J, Green MJ, Shah SA, Cañas-Carrell JE. Translocation,
380 trophic transfer, accumulation and depuration of polystyrene microplastics in *Daphnia magna* and
381 *Pimephales promelas*. *Environmental Pollution*. 2020;259:113937.
382 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113937>
- 383 24. Schür C, Rist S, Baun A, Mayer P, Hartmann NB, Wagner M. When Fluorescence Is not a Particle:
384 The Tissue Translocation of Microplastics in *Daphnia magna* Seems an Artifact. *Environ Toxicol Chem*.
385 2019;38:1495–503. doi: 10.1002/etc.4436
- 386 25. Hoffschröer N, Grassl N, Steinmetz A, Sziegoleit L, Koch M, Zeis B. Microplastic burden in *Daphnia*
387 is aggravated by elevated temperatures. *Zoology*. 2021;144:125881.
388 <https://doi.org/10.1016/j.zool.2020.125881>
- 389 26. Castro GB, Bernegossi AC, Felipe MC, Corbi JJ. Is the development of *Daphnia magna* neonates
390 affected by short-term exposure to polyethylene microplastics? *J Environ Sci Health A Tox Hazard*
391 *Subst Environ Eng*. 2020;55:935–46. doi: 10.1080/10934529.2020.1756656.
- 392 27. Lin H, Yuan Y, Jiang X, Zou JP, Xia X, Luo S. Bioavailability quantification and uptake mechanisms
393 of pyrene associated with different-sized microplastics to *Daphnia magna*. *Science of the Total*
394 *Environment*. 2021;797:149201. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149201>

- 395 28. Colomer J, Müller MF, Barcelona A, Serra T. Mediated food and hydrodynamics on the ingestion
396 of microplastics by *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*. 2019;251:434–41.
397 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.034>
- 398 29. Wang M, Wang WX. Selective ingestion and response by *Daphnia magna* to environmental
399 challenges of microplastics. *J Hazard Mater*. 2023;458:131864.
400 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131864>
- 401 30. Nakano R, Gürses RK, Tanaka Y, Ishida Y, Kimoto T, Kitagawa S, et al. Pyrolysis-GC–MS analysis of
402 ingested polystyrene microsphere content in individual *Daphnia magna*. *Science of the Total*
403 *Environment*. 2022;817:152981. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.152981>
- 404 31. Klun B, Rozman U, Ogrizek M, Kalčíková G. The first plastic produced, but the latest studied in
405 microplastics research: The assessment of leaching, ecotoxicity and bioadhesion of Bakelite
406 microplastics. *Environmental Pollution*. 2022;307:119454.
407 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119454>
- 408 32. Pikuda O, Dumont ER, Chen Q, Macairan J-R, Robinson SA, Berk D, et al. Toxicity of microplastics
409 and nanoplastics to *Daphnia magna*: Current status, knowledge gaps and future directions. *Trends in*
410 *Analytical Chemistry*. 2023;167:117208. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117208>
- 411 33. Reilly K, Ellis LJA, Davoudi HH, Supian S, Maia MT, Silva GH, et al. *Daphnia* as a model organism to
412 probe biological responses to nanomaterials—from individual to population effects via adverse
413 outcome pathways. *Frontiers in Toxicology*. 2023;5:1178482.
414 <https://doi.org/10.3389/ftox.2023.1178482>
- 415 34. Volova T, Prudnikova S, Boyandin A, Zhila N, Kiselev E, Shumilova A, et al. Constructing Slow-
416 Release Fungicide Formulations Based on Poly(3-hydroxybutyrate) and Natural Materials as a
417 Degradable Matrix. 2019;67:9220-31. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01634>
- 418 35. Volova TG, Prudnikova S V, Boyandin AN. Biodegradable poly-3-hydroxybutyrate as a fertiliser
419 carrier. 2016; 96:4183-93. doi: 10.1002/jsfa.7621
- 420 36. ASTM. E729-96 Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes,
421 Macroinvertebrates, And Amphibians. 2007.
- 422 37. OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test -
423 202. 2004.
- 424 38. Rosenfeldt RR, Seitz F, Schulz R, Bundschuh M. Heavy metal uptake and toxicity in the presence of
425 titanium dioxide nanoparticles: A factorial approach using *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol*.
426 2014;48:6965–72. <https://doi.org/10.1021/es405396a>
- 427 39. Luo R, Xu K, Chen GQ. Study of miscibility, crystallization, mechanical properties, and thermal
428 stability of blends of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4- hydroxybutyrate). *J*
429 *Appl Polym Sci*. 2007;105:3402–8. <https://doi.org/10.1002/app.26369>
- 430 40. Erceg M, Kova Cic´, Cic´, T, Klaric´ department I. Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate)
431 plasticized with acetyl tributyl citrate. 2005;90:313-18.
432 <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2005.04.048>
- 433 41. Shabaka SH, Ghobashy M, Marey RS. Identification of marine microplastics in Eastern Harbor,
434 Mediterranean Coast of Egypt, using differential scanning calorimetry. *Mar Pollut Bull*.
435 2019;142:494–503. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.062>

436 42. Kühn S, van Oyen A, Booth AM, Meijboom A, van Franeker JA. Marine microplastic: Preparation of
437 relevant test materials for laboratory assessment of ecosystem impacts. *Chemosphere*.
438 2018;213:103–13. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.032>

439 43. Rodríguez Chialanza M, Sierra I, Pérez Parada A, Fornaro L. Identification and quantitation of
440 semi-crystalline microplastics using image analysis and differential scanning calorimetry.
441 *Environmental Science and Pollution Research*. 2018;25:16767-75. [https://doi.org/10.1007/s11356-](https://doi.org/10.1007/s11356-018-1846-0)
442 [018-1846-0](https://doi.org/10.1007/s11356-018-1846-0)

443 44. Bitter H, Lackner S. First quantification of semi-crystalline microplastics in industrial wastewaters.
444 *Chemosphere*. 2020;258:127388. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127388>

445 45. Majewsky M, Bitter H, Eiche E, Horn H. Determination of microplastic polyethylene (PE) and
446 polypropylene (PP) in environmental samples using thermal analysis (TGA-DSC). *Science of The Total*
447 *Environment*. 2016;568:507–11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.017>

448 46. Ivleva NP. Chemical Analysis of Microplastics and Nanoplastics: Challenges, Advanced Methods,
449 and Perspectives. *Chem Rev*. 2021;121:11886–936. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00178>

450 47. Bitter H, Lackner S. Fast and easy quantification of semi-crystalline microplastics in exemplary
451 environmental matrices by differential scanning calorimetry (DSC). *Chemical Engineering Journal*.
452 2021;423:129941. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129941>

453 48. Wei H, Thompson RB, Park CB, Chen P. Surface tension of high density polyethylene (HDPE) in
454 supercritical nitrogen: Effect of polymer crystallization. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*.
455 2010;354:347–52. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.06.005>

456 49. Prasad A. A quantitative analysis of low density polyethylene and linear low density polyethylene
457 blends by differential scanning calorimetry and fourier transform infrared spectroscopy methods.
458 *Polym Eng Sci*. 1998;38:1716–28. <https://doi.org/10.1002/pen.10342>

459 50. Sreekumar K, Bindhu B, Veluraja K. Perspectives of polylactic acid from structure to applications.
460 *Polymers from Renewable Resources*. 2021;12:60–74. <https://doi.org/10.1177/20412479211008773>

461 51. Liu L, Ilyushechkin A, Liang D, Cousins A, Tian W, Chen C, et al. Metal Hydride Composite
462 Structures for Improved Heat Transfer and Stability for Hydrogen Storage and Compression
463 Applications. *Inorganics*. 2023;11:181. <https://doi.org/10.3390/inorganics11050181>

464 52. Zarbali A, Pinke B, Menyhárd A. Robustness study of a tensile modulus prediction model for
465 semicrystalline polymers. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*. 2023;67:232–41.
466 <https://doi.org/10.3311/PPch.20991>

467 53. Summers JW. The melting temperature (or not melting) of poly(vinyl chloride). *Journal of Vinyl*
468 *and Additive Technology*. 2008;14:105–9. <https://doi.org/10.1002/vnl.20151>

469 54. Selke SE, Hernandez RJ. Packaging: Polymers for Containers. *Encyclopedia of Materials: Science*
470 *and Technology*. 2001;6646–52. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043152-6/01175-X>

471 55. Wang N, Tu R, Ma X, Xie Q, Jiang X. Melting behavior of typical thermoplastic materials-An
472 experimental and chemical kinetics study. *J Hazard Mater*. 2013;262:9–15.
473 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.024>

- 474 56. Bouzid N, Anquetil C, Dris R, Gasperi J, Tassin B, Derenne S. Quantification of Microplastics by
475 Pyrolysis Coupled with Gas Chromatography and Mass Spectrometry in Sediments: Challenges and
476 Implications. *Microplastics*. 2022;1:229–39. <https://doi.org/10.3390/microplastics1020016>
- 477 57. Woo H, Seo K, Choi Y, Kim J, Tanaka M, Lee KH, et al. Methods of analyzing micro-sized plastics in
478 the environment. *Applied Sciences*. 2021;11:10640. <https://doi.org/10.3390/app112210640>
- 479 58. Melčová V, Svoradová K, Menčík P, Kontárová S, Rampichová M, Hedvičáková V, et al. FDM 3D
480 Printed Composites for Bone Tissue Engineering Based on Plasticized Poly(3-
481 hydroxybutyrate)/poly(d,l-lactide) Blends. *Polymers* 2020;12:2806.
482 <https://doi.org/10.3390/polym12122806>
- 483 59. Pospisilova A, Vodicka J, Trudicova M, Juglova Z, Smilek J, Mencik P, et al. Effects of Differing
484 Monomer Compositions on Properties of P(3HB-co-4HB) Synthesized by *Aneurinibacillus* sp. H1 for
485 Various Applications. *Polymers* 2022;14:2007. <https://doi.org/10.3390/polym14102007>
- 486 60. dos Santos AJ, Oliveira Dalla Valentina LV, Hidalgo Schulz AA, Tomaz Duarte MA. From Obtaining
487 to Degradation of PHB: Material Properties. Part I. *Ing Cienc*. 2017;13:269–98.
488 DOI: [10.17230/ingciencia.13.26.10](https://doi.org/10.17230/ingciencia.13.26.10)
- 489

PŘÍLOHA C

Manuskript nahrán do časopisu *Heliyon*

1 **Assessing the Ecological Consequences of Biodegradable Plastics: Acute,**
2 **Chronic and Multigenerational Impacts of Poly-3-hydroxybutyrate Microplastics**
3 **on Freshwater Invertebrate *Daphnia magna***

4 *Petra Procházková^{1*}, Gabriela Kalčíková^{2,3}, Eliška Maršálová¹, Martin Brtnický⁴, Helena Zlámalová Gargošová¹,*
5 *Jiří Kučerík¹*

6 ¹ *Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, Brno University of*
7 *Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic*

8 ² *Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, 113 Večna pot, SI-1000, Ljubljana,*
9 *Slovenia*

10 ³*Faculty of Mechanical Engineering, Brno University of Technology, Technická 2896/2, 616 69 Brno, Czech*
11 *Republic*

12 ⁴*Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Mendel University in Brno, 613 00,*
13 *Brno, Czech Republic*

14 ** Corresponding author. E-mail address: Petra.Prochazkova1@vutbr.cz, Full postal address: Institute of Chemistry*
15 *and Technology of Environmental Protection, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118,*
16 *612 00 Brno, Czech Republic*

17

18 **Abstract**

19 Microplastics, pervasive contaminants in freshwater ecosystems, have raised ecological
20 concerns. Efforts are underway to replace conventional plastics with biodegradable
21 alternatives that should be more easily decomposed in the environment. However, the
22 biodegradation of these alternatives is contingent on specific conditions such as temperature,
23 humidity, pH, and microorganisms, which are not always met. Consequently, these
24 biodegradable alternatives can also fragment and generate microplastics, which can be
25 ingested and affect biota. In this study, we investigated the acute, chronic, and
26 multigenerational effects of two fractions (particles <63 µm and particles <125 µm)
27 of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) at varying concentrations on the inhibition,

28 mortality, reproduction activity, and growth of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. No
29 acute effects were observed for either size fraction. However, during chronic and
30 multigenerational experiments, an increase in the concentration of P3HB microplastics
31 corresponded with increased mortality, reduced reproductive activity, and slower growth
32 among the mother organisms. Given the important role of *D. magna* in the food chain, these
33 findings suggest that biodegradable microplastics may indeed negatively affect freshwater
34 ecosystems.

35

36 **Keywords**

37 P3HB, biodegradable microplastics, biofilm, *D. magna*, reproduction, growth.

38

39 **1 Introduction**

40 Microplastics (MPs), defined as small plastic particles ranging from 1 to 1 000 μm in size [1],
41 have become ubiquitous, found in diverse locations worldwide, spanning from urban centers
42 to remote regions, both on land and in the ocean [2]. Currently, there is a growing scientific
43 and societal concern about their impact on freshwater and marine organisms [3]. Nevertheless,
44 research on microplastic contamination in freshwater ecosystems remains comparatively
45 limited when compared to the marine realm [4]. This discrepancy may be attributed to the
46 conventional perception of freshwater environment solely serving as conduits for transporting
47 microplastics into the oceans. However, the widespread presence of microplastics in
48 freshwater environments around the world has prompted a swift evolution in studies exploring
49 their potential impacts [5].

50 The risks associated with microplastics are related to their physical and chemical
51 characteristics, encompassing factors such as composition, shape, and even color [6]. Their
52 size renders them accessible as a potential food source for a wide range of organisms [7].

53 Subsequently, this can result in the obstruction of feed appendages, leading to reduced food
54 intake, aggregation causing blockages in the digestive tract of organisms, or potential
55 translocation into the circulatory system [8,9]. Furthermore, MPs have the capacity to introduce
56 toxic substances into organisms. This occurs through two mechanisms: firstly, the gradual
57 leaching of additives added during production to enhance plastic properties, and secondly,
58 their large surface area and hydrophobic properties enable microplastics to accumulate
59 hydrophobic organic pollutants from the environment, which may subsequently be released
60 within the bodies of organisms after ingestion [10,11].

61 With the growing effort to replace conventional plastics with eco-friendly alternatives,
62 degradable materials are coming to the fore [12,13]. Biodegradable polymers (BDPs),
63 emerging as viable substitutes for conventional plastics across various industrial sectors, are
64 polymeric materials capable of undergoing decomposition by microorganisms into carbon
65 dioxide, water, and biomass under aerobic conditions, or into methane and carbon dioxide
66 under anaerobic conditions [14–16]. Similar, to conventional plastics, BDPs can also break
67 down naturally into small particles, generating a substantial quantity of microplastics [17,18].
68 However, despite their biodegradability, these MPS can persist for extended periods due to the
69 influence of various biotic and abiotic environmental factors such as temperature, humidity,
70 pH, biologically active substances, and the presence and activity of microorganisms [19,20].
71 These conditions are rarely met in aquatic environments.

72 Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) is a notable representative of biodegradable polymers. It is
73 a polymer that belongs to the group of biodegradable linear polyesters known as
74 polyhydroxyalkanoates (PHAs), which are synthesized by various gram-negative, and gram-
75 positive bacteria as an intracellular reserve for carbon and energy sources, thriving under
76 aerobic and anaerobic conditions [21–23]. P3HB is a relatively hydrophobic material with an
77 approximate crystallinity of 50%, a high melting point of 180 °C, and low elasticity. Its density
78 of 1.23 g/cm³ suggests a propensity to settle down in aquatic environments, although factors

79 such as turbulence, water flow, and thunderstorms can lead to its resuspension within the water
80 column [24–26].

81 The commonly used model organism for studying the influence of MPs on freshwater biota
82 is the aquatic invertebrate *Daphnia magna*. This filter-feeding species is capable to ingest non-
83 selectively particles ranging from <1 µm to approximately 70 µm in size [27,28]. According to
84 Scherer et al. [29], the probability of MPs ingestion by freshwater invertebrates depends on
85 factors such as the properties of MPs and their concentration. Daphnids are also preferred for
86 these studies because of their global abundance in aquatic environments and their significant
87 role in bridging primary producers and higher trophic level consumers [30].

88 The majority of research in this domain has focused on the impact of conventional plastics
89 on zooplankton including polystyrene (PS), polyethylene (PE), polypropylene (PP), polyvinyl
90 chloride (PVC), polyethylene terephthalate (PET), and others [31]. While PE, PET, and PS
91 MPs did not induce negative responses such as immobilization and mortality of *D. magna*
92 during the standard acute exposure period (48 h), adverse effects became evident with longer
93 exposures (96 to 120 h) [30,32–36]. In chronic tests, PE and PET MPs exhibited detrimental
94 effects on the growth and reproductive activity of *D. magna* [37,38], while PS MPs were found
95 to increase mortality and affect growth and reproduction, depending on the initial age of the
96 test organisms [30,39]. Bosker et al. [40] also observed a negative effect of MPs on the
97 population size and biomass of these organisms highlighting potential repercussions for the
98 freshwater ecosystem due to the importance of *D. magna* in the food chain.

99 Several studies have ventured into investigating the effects of biodegradable microplastics.
100 Savva et al. [41] compared the sublethal effects and food intake of *D. magna* in the presence
101 of polyhydroxybutyrate (PHB, not specified), PLA MPs, and conventional ones revealing that
102 biodegradable MPs had a more pronounced toxic impact. The chronic effect of PLA, PVC, and
103 polyurethane (PUR) was investigated by Zimmermann et al. [42] who observed that all 3 types
104 of MPs negatively affected the test organisms, with PVC showing the most significant impact
105 on reproduction and PLA causing the highest mortality. While the authors did not draw specific

106 conclusions regarding the potential toxicity of biodegradable MPs, recent research suggests
107 that their presence might lead to nutrient depletion in the medium due to biofilm formation and
108 biosorption [43].

109 Hence, it is evident that the anticipated rise in the usage of biodegradable plastics will lead
110 to a corresponding surge in environmental contamination by MPs. While conventional MPs
111 pose various risks to aquatic organisms, it remains uncertain whether biodegradable MPs have
112 similar adverse effects. Therefore, the aim of this study was to assess the impact of P3HB
113 microplastics on the freshwater organism *D. magna*. We examined both the short-term and
114 long-term consequences, including the effects on mortality and reproductive activity of these
115 organisms, with a focus on multigenerational outcomes.

116

117 **2 Material and Methods**

118 2.1 Preparation of microparticles

119 Spherical P3HB (ENMAT Y3000) microplastics from TianAn Biologic Materials Co., Ltd.,
120 Ningbo City, China were used. To prepare size fractions, a suspension of P3HB microplastics
121 in MilliQ water was sieved through stainless-steel mesh sieves with openings of 63 and
122 125 μm . Subsequently, both size fractions ($<63 \mu\text{m}$ and $<125 \mu\text{m}$) were dried in glass beakers
123 at room temperature in a fume hood. The particle sizes do not precisely match both size
124 fractions (for details see Procházková et al. [43]) because ultrasonication was not applied
125 during the process. However, for clarity in the text, we refer to the mesh size used for particle
126 preparation i.e. $<63 \mu\text{m}$ and $<125 \mu\text{m}$.

127

128 2.2 *Daphnia magna* culture

129 The *D. magna* test organism obtained from laboratory culture at the Institute of Chemistry and
130 Technology of Environmental Protection (Faculty of Chemistry, Brno University of Technology,

131 Czech Republic) was cultured in ASTM reconstituted hard water [44]. This water was enriched
132 with selenium, vitamins (biotin, thiamine, cyanocobalamin, according to the OECD guideline
133 No. 202 [45]), and 20 µl/L seaweed extract (Marinure, Glenside, Scotland) according to
134 Rosenfeldt et al. [46]. The medium was regularly replaced three times a week and the
135 organisms were nourished with green algae *Desmodesmus subspicatus* providing an
136 equivalent to 200 µg carbon per organism daily. The culture was maintained under controlled
137 conditions with a temperature of 20 ± 1 °C and a light-dark cycle of 16:8 (800 – 1 000 lux).

138 Twenty-four hours prior to initiating the experiments, all offsprings were removed from a set
139 of mother cultures. After an additional 24-hour period, all newborn neonates were collected with
140 a plastic pipette and quantified. These age-synchronized test organisms were randomly
141 distributed among various treatment and control groups.

142

143 2.3 Acute experiments

144 In the acute experiments, both size fractions of P3HB microplastics (<63 and <125 µm) were
145 examined using two exposure methods: testing in P3HB suspension and testing of P3HB
146 leachate. The suspension was prepared by weighing the desired amount of P3HB and then
147 transferred to a volumetric flask, which was subsequently filled with culture medium (as
148 described in **Section 2.2**). This suspension underwent a 10 min ultrasonification to disperse
149 the particles. For the leachate, a suspension of P3HB in a culture medium was prepared and
150 then incubated for 96 h under the same conditions as the acute test with *D. magna*. Following
151 incubation, the medium was filtered through a 0.8 µm pore size filter.

152 The acute experiments were conducted in 150 mL glass beakers, with each beaker
153 containing 50 mL of either test suspension, leachate, or medium. The concentration of P3HB
154 microparticles was 0, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 mg/L, which corresponded to $3.20 \cdot 10^{13}$
155 particles in 1 g for the fraction <63 µm and $2.39 \cdot 10^{13}$ particles in 1 g for the fraction <125 µm
156 [43]. This concentration range was selected based on previous studies on the toxicity of MPs

157 to *D. magna* [32,33,35] as well as the concentration limit stipulated for acute toxicity testing of
158 chemicals according to OECD guideline No. 202 [45].

159 For each treatment, two acute experiments were conducted: 1) newborn neonates of
160 *D. magna* <24 h old, and 2) 7-day-old *D. magna* individuals (age-synchronized neonates were
161 fed with green algae for 7 days) were exposed to prepared suspensions, leachates, or media.
162 The observation period was prolonged from 48 h to 96 h, during which immobilization of
163 individual *D. magna* was visually assessed at 24, 48, 72, and 96 h. According to OECD
164 guideline No. 202 [45] the animals were not provided with food, and the medium, suspension,
165 or leachate was not changed throughout the experiments. Each experiment consisted of four
166 replicates of the same treatment and the experiment was repeated three times.

167

168 2.4 Chronic experiments

169 Chronic experiments were conducted for both size fractions of P3HB microplastics (<63 and
170 <125 µm). We investigated the effects of chronic exposure on fundamental life-history
171 parameters in *D. magna*, specifically focusing on survival, growth, age at first reproduction,
172 and total offspring number after exposure to various concentrations of P3HB microplastics.
173 The experiments were designed according to the standard OECD No. 211: 21-d Daphnia
174 reproduction test [47]. The organisms were exposed as neonates (<24 h old).

175 Initially, we utilized the same concentrations of P3HB microplastics as in the acute test
176 (6.25, 12.5, 25, 50, and 100 mg/L) along with a control group. However, due to the high
177 mortality observed in the test organisms at high concentrations, we subsequently reduced the
178 P3HB microplastics concentrations to 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, and 25 mg/L.

179 The neonates were individually incubated in 150 mL glass beakers filled with 100 mL of test
180 suspension or control medium. These vessels were maintained at 21 °C under a 16:8 light:dark
181 cycle, and the organisms were provided with a daily diet of green algae *D. subspicatus*
182 equivalent to 200 µg carbon per organism daily. Test suspensions and control medium were

183 changed three times per week. Each test vessel held one neonate, and there were ten
184 replicates within each concentration. Each experiment was repeated three times and lasted
185 21 days.

186

187 2.5 Multigenerational experiments

188 For multigenerational experiments, we subjected four consecutive generations (F0 – F3) of
189 *D. magna* to exposure to P3HB microplastics. The exposure of each generation followed the
190 OECD guideline No. 211 [47] and the setup and conditions were consistent with those
191 employed in the previous chronic experiments (see **Section 2.4**). The exposure concentration
192 was set at 1.56 mg/L and both size fractions of P3HB microplastics were evaluated. In addition,
193 for each experiment, a control group (consisting of only the medium) was included. The
194 suspensions were changed three times per week and Daphnias were provided with a daily diet
195 of green algae *D. subcapitatus* (equivalent to 200 µg of carbon per organism).

196 To initiate the next generation, the offsprings originating from the third brood, sourced from
197 at least three different parental animals, were pooled and exposed as previously described.
198 Each generation was exposed for a period of 21 d, during which parameters including survival,
199 growth, age at first reproduction, and total offspring number were determined.

200

201 2.6 Determination of the growth rate of *D. magna*

202 All *D. magna* organisms, both before and after the chronic and multigenerational experiment
203 (survivors) were positioned on laminated graph paper and captured using a Nikon D3100
204 digital camera equipped with an AF-S Micro NIKKOR 40 mm 1:2.8 G lens (Nikon, Japan). The
205 body lengths were subsequently measured utilizing the ImageJ software, extending from the
206 apex of the helmet to the base of the apical spine [48].

207

208 2.7 Data analysis

209 The average growth rate after 21 days of exposure was calculated as follows:

$$210 \quad \mu = \frac{L_e - L_b}{t}$$

211 where μ (d^{-1}) is the average growth rate, L_e (μ) is the body length at the end of the experiment,
212 L_b is the body length at the beginning of the experiment, and t (d) is the exposure time (21
213 days).

214 The statistical significance of the differences between the control and individual
215 concentrations was assessed using Dunnett's test in the R program, with differences being
216 deemed significant when $p < 0.05$.

217

218 3 Results

219 3.1 Acute experiments

220 In this experiment involving P3HB MPs (whether suspension or leachate and whether with
221 neonates or 7-day-old organisms), no instance resulted in an increase in daphnid mortality,
222 even after 96 hours of exposure.

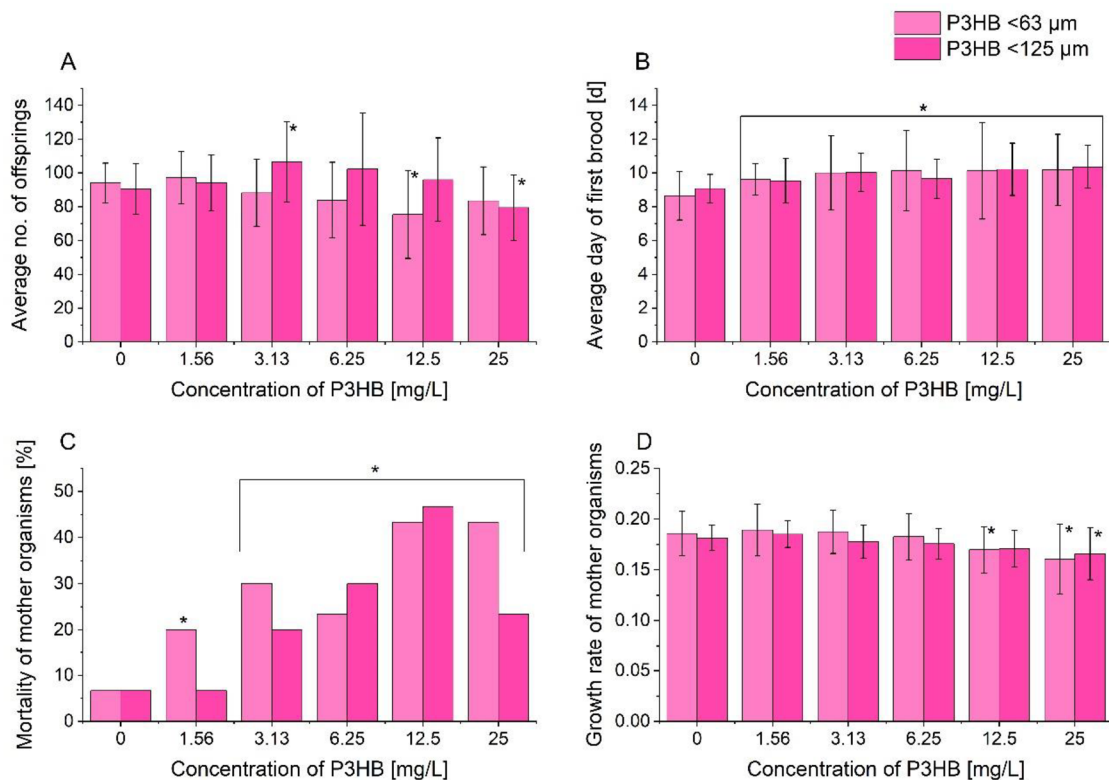
223

224 3.2 Chronic experiments

225 The preliminary experiments involving higher concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, and 100 mg/L)
226 of both size fractions of P3HB microplastics in suspension revealed a diminishing reproductive
227 activity of maternal organisms with increasing concentration (**Figure S1A**). Notably, for the
228 larger size fraction ($<125 \mu\text{m}$), a marginal stimulation of reproductive activity, compared to the
229 control group, was initially observed up to a concentration of 25 mg/L. In addition, for P3HB
230 microplastics $<63 \mu\text{m}$, there was a delay in the onset of the first brood at high concentrations
231 (50 and 100 mg/L), while for P3HB microplastics $<125 \mu\text{m}$, this phenomenon was only

232 observed at the highest concentration, i.e. 100 mg/L (**Figure S1B**). A substantial mortality rate
233 among maternal organisms was recorded for both size fractions, specifically reaching 53.3%
234 for P3HB microplastics <63 μm and 46.7% for microplastics <125 μm at a concentration of
235 100 mg/L (**Figure S1C**). Due to this high mortality, we subsequently reduced the concentration
236 of P3HB particles in suspension to 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, and 25 mg/L.

237 In the subsequent experiment involving a lower concentration of P3HB microplastics,
238 a minor stimulation of reproductive activity was noted for the smaller size fraction (<63 μm)
239 when compared to the control group. However, the reproductive activity exhibited a decline
240 with increasing microplastic concentration (**Figure 1A**). Conversely, for the larger size fraction
241 (<125 μm), an inhibition of reproductive activity was observed only at a concentration of
242 25 mg/L of P3HB microplastics in suspension (**Figure 1A**). Additionally, a slight delay in the
243 average day of the first brood of juveniles was observed for both size fractions at all
244 concentrations of P3HB microplastics in suspension (**Figure 1B**). Moreover, an increase in the
245 concentration of P3HB microplastics in suspension led to elevated mortality rates among
246 mother organisms for both size fractions (**Figure 1C**). The last parameter monitored was the
247 growth rate of the mother organisms. For both size fractions of P3HB microplastics, following
248 a minor growth stimulation at the lowest microplastic concentrations in suspension, there was
249 a subsequent slight inhibition of growth (**Figure 1D**).



250

251 *Figure 1: Results of chronic experiments involving both size fractions of P3HB microplastics (<63 μm*
 252 *and <125 μm; n = 30): A – average number of offsprings per mother organism, B – average day of first*
 253 *brood, C – mortality of mother organisms, D – specific growth rate of mother organisms from the*
 254 *beginning to the end of the 21-day experiment. Asterisks indicate statistically significant deviations from*
 255 *the control (p < 0.05).*

256

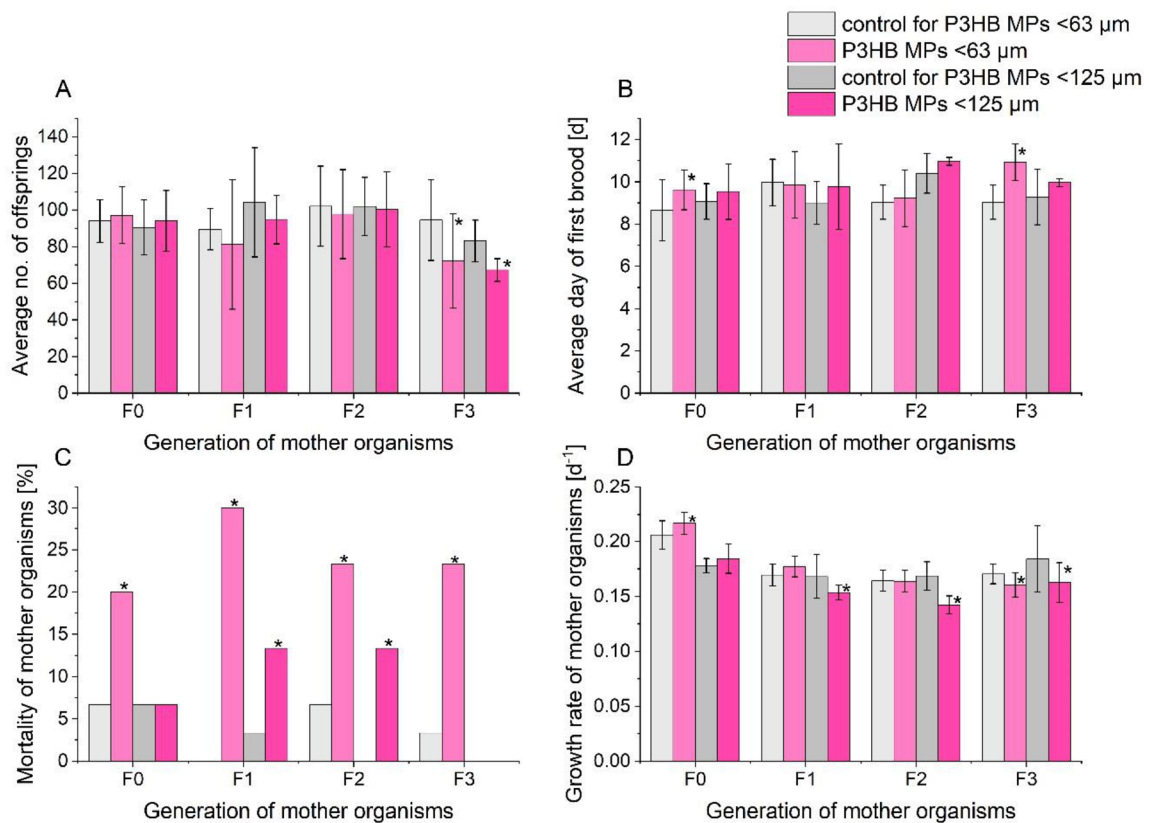
257 3.3 Multigenerational experiments

258 The same effects as in the chronic experiment were also observed in the multigenerational
 259 experiment. The impact of the lowest concentration (1.56 mg/L) of both size fractions of P3HB
 260 microplastics on the organism *D. magna* was assessed, specifically focusing on reproductive
 261 activity, the day of the first brood, mortality of mother organisms, and growth rate.

262 In the first generation (F0) of maternal organisms, a stimulation of reproductive activity was
 263 documented for both size fractions of P3HB microplastics. However, in the subsequent
 264 generations (F1-F3), a slight inhibition of reproductive activity was observed in all instances
 265 (**Figure 2A**). Furthermore, a delay in the first day of reproduction was observed in all cases

266 (Figure 2B) along with a slight increase in the mortality of mother organisms, consistent with
 267 the results of the chronic experiment (Figure 2C).

268 For the smaller size fraction (<63 µm), a decline in the growth rate of the mother organisms
 269 compared to the control was observed in the F2 and F3 generations. Conversely, for the larger
 270 size fraction (<125 µm), this decrease in growth rate was evident as early as the F1 generation
 271 (Figure 2D).



272

273 *Figure 2: Results of multigenerational experiments involving both size fractions of P3HB microplastics*
 274 *(<63 µm and <125 µm, concentration 1.56 mg/L; n = 30): A – average number of offsprings per mother*
 275 *organism, B – average day of first brood, C – mortality of mother organisms, D – specific growth rate of*
 276 *mother organisms from the beginning to the end of the 21- day experiment. Asterisks indicate the*
 277 *statistically significant deviations from the control (p < 0.05).*

278

279 4 Discussion

280 The extensive utilization of plastics resulted in a pressing environmental concern such as the
 281 pollution caused by MPs. Numerous studies have highlighted the impact of conventional MPs
 282 on aquatic organisms, particularly *D. magna*, a keystone species in freshwater ecosystems.

283 This study introduces P3HB, a possible alternative to conventional plastics, and seeks to shed
284 light on its potential ecological implications.

285 Recent studies [30,32–36] showed that while conventional MPs such as PE, PET, or PS do
286 not induce an increased immobilization and mortality of *D. magna* in acute tests (48 h),
287 an extended exposure period (96 to 120 hours) gradually escalates their negative effect.
288 Interestingly, the results of this study diverge from this pattern, as we did not observe an
289 elevation in *D. magna* immobilization even after 96 hours in any of the tested scenarios
290 (suspension/leachate, juveniles/7-day-old organisms). However, during chronic experiments,
291 an increase in mortality alongside increasing concentration of both size fractions of P3HB in
292 suspension was observed. Additionally, there was a progressive reduction in the growth of
293 daphnia and an inhibition of their reproductive activity. In contrast, PE and PET MPs did not
294 exert a negative influence on growth and reproductive activity, even during chronic experiments
295 [37,38]. On the contrary, PS particles have been found to elevate mortality levels and disrupt
296 the growth and reproduction of organisms [30,39]. In addition, Savva et al. [41] have suggested
297 that the sublethal effects and their impact on food intake in *D. magna* may be more pronounced
298 in the presence of biodegradable MPs such as PHB and PLA compared to conventional MPs.

299 In the multigenerational experiment, a slight inhibition of reproductive activity and
300 a deceleration in the growth of organisms were observed in the subsequent generations F1 to
301 F3. Schür et al. [27] reported that PS MPs induced a multigenerational effect in *D. magna*.
302 Over the course of four generations, exposure to MPs resulted in increased mortality in
303 *D. magna*, as well as reduced reproduction and growth. To make a comparison with the effects
304 of natural particles, they used kaolin, which did not yield such an effect.

305 The observed adverse effects on growth, reproduction, and mortality during chronic
306 experiments highlight the pressing need to address MPs pollution. These effects can be
307 attributed to multifaceted mechanisms, which may involve mechanical damage to organisms
308 through adsorption to their appendices and body surface [49], nutrient depletion in test medium
309 [43], and the ingestion of microplastic particles [7]. Savva et al. [41] reported that biodegradable

310 microplastics (PHB and PLA) showed a greater post-exposure inhibition effect on the feeding
311 activity of *D. magna* than high-density polyethylene (HDPE). As recently reported in our work
312 [50], the ingestion of P3HB microplastics depended on both their size and concentration in the
313 surrounding environment. For example, at a concentration of 25 mg/L, *D. magna* ingested
314 P3HB microplastics up to 10.3 wt% of particles <63 µm and 6.3 wt% of particles <125 µm,
315 respectively. Furthermore, as the concentration of P3HB MPs in suspension increased, so did
316 the content of P3HB found in *D. magna*. Therefore, the escalating mortality and growth
317 inhibition of *D. magna* with increasing P3HB MPs concentration in suspension (as depicted in
318 **Figure 1C and Figure 1D**) is probably related to a higher ingestion of P3HB MPs from the
319 suspension. The fact, that a more pronounced effect was observed with smaller particles
320 (<63 µm) confirms our assumption that the impact of P3HB microplastics on *D. magna* is
321 particle size-dependent. This observation aligns with the research conducted by [51], who
322 reported that secondary P3HB nanoplastics induced up to 85 % immobilization of *D. magna*
323 after 48 h of exposure.

324 The potential effects of biodegradable plastics on biota are poorly understood, but even
325 less is known about whether these effects are influenced by their biodegradability.
326 Biodegradation is associated with the development of a biofilm on the surface of the plastics
327 [52], which applies also to P3HB MPs [43]. The formation of biofilm on MPs can alter their
328 ingestion by organisms, for example, some MPs coated with biofilms can release into the water
329 noxious signals, known as infochemicals, prompting nearby organisms to ingest them [53].
330 The development of biofilm on the surface of P3HB MPs could possibly be influenced by the
331 time lag in the mortality of *D. magna* when compared to conventional ones. When plastic
332 particles or products are released into the aquatic environment, a coating layer of inorganic
333 and organic pollutants rapidly forms on their surface. Subsequently, biofilm formation on the
334 plastic surface, lasting minutes to hours, is mostly likely the initial interaction with the
335 surrounding biota [52]. During the acute test (96 h) the organisms might ingest not only P3HB
336 MPs but also the biofilm presents on their surface, using it as a source of nutrients. However,

337 after a longer period (during chronic experiments), mechanical blockage of the digestive tract
338 due to accumulated P3HB microplastics probably led to increased mortality.

339 In the presented experiment with *D. magna*, the test conditions were checked and adjusted
340 to be optimal for the organisms. However, in the natural environment, biodegradable plastics
341 may pose some additional, secondary problems. They are expected to degrade well in the
342 natural environment, even if their complete degradation is not always achieved due to
343 unfavorable conditions (e.g. low temperature, unsuitable pH, microorganisms), they generally
344 degrade faster than conventional plastics [54]. Therefore, their biodegradation can lead to
345 oxygen depletion and affect nutrient levels, as shown in our previous study [43]. This in turn
346 can affect organisms that are sensitive to lower oxygen level or plants that require certain
347 nutrients for their growth. Another issue associated with biofilm formation on microplastics is
348 its potential to transport pathogens [55]. Therefore, further research is essential to elucidate
349 the precise mechanisms responsible for the observed differences and to assess the broader
350 ecological consequences of adopting P3HB particles as a more environmentally friendly
351 alternative.

352

353 **5 Conclusion**

354 This research has demonstrated that the presence of P3HB MPs did not induce acute effects
355 on *D. magna*. However, in chronic and multigenerational experiments, we observed an
356 increase in mortality, a decrease in reproductive activity, and a slower growth rate of mother
357 organisms, all of which were dependent on the concentration of P3HB MPs in suspension.
358 Furthermore, smaller MPs appeared to elicit more pronounced effects. Both of these
359 phenomena can be attributed to the ingestion of MPs, which increases with higher
360 concentrations of MPs in suspension and smaller particle sizes. The formation of a biofilm on
361 the MP surface also facilitates their ingestion. Subsequently, the blockage of the digestive
362 tract in *D. magna* leads to adverse consequences. It is evident that biodegradable MPs can

363 be comparable or even more hazardous to *D. magna* than conventional MPs, which requires
364 careful consideration of their use and management to mitigate their potential environmental
365 impacts. Balancing the benefits of biodegradability with the risks of increased toxicity is
366 therefore a crucial challenge for policymakers, researchers, and industries.

367

368 **Acknowledgements**

369 This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic
370 [project FCH–S-23-8297]. GK acknowledges the financial support of the Slovenian Research
371 and Innovation Agency [Research program P2-0191]. This article is based upon work from
372 COST Action CA20101 Plastics monitoring detection Remediation recovery - PRIORITY,
373 supported by COST (European Cooperation in Science and Technology, www.cost.eu).

374

375 **References**

- 376 1. Hartmann NB, Hüffer T, Thompson RC, Hassellöv M, Verschoor A, Daugaard AE, et al. Are We
377 Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for
378 Plastic Debris. *Environ Sci Technol*. 2019;53:1039–47.
- 379 2. Du S, Zhu R, Cai Y, Xu N, Yap P-S, Zhang Y, et al. Environmental fate and impacts of microplastics in
380 aquatic ecosystems: a review. *RSC Adv* [Internet]. 2021;11:15762–84. Available from:
381 <http://xlink.rsc.org/?DOI=D1RA00880C>
- 382 3. de Sá LC, Oliveira M, Ribeiro F, Rocha TL, Futter MN. Studies of the effects of microplastics on
383 aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Science of
384 The Total Environment* [Internet]. 2018;645:1029–39. Available from:
385 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718326998>
- 386 4. Pradinaud C, Northey S, Amor B, Bare J, Benini L, Berger M, et al. Defining freshwater as a natural
387 resource: a framework linking water use to the area of protection natural resources. *Int J Life Cycle
388 Assess* [Internet]. 2019 [cited 2023 Dec 4];24:960–74. Available from:
389 <http://link.springer.com/10.1007/s11367-018-1543-8>
- 390 5. Horton AA, Walton A, Spurgeon DJ, Lahive E, Svendsen C. Microplastics in freshwater and
391 terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and
392 future research priorities. *Science of The Total Environment* [Internet]. 2017;586:127–41. Available
393 from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969717302073>

- 394 6. Yin J, Long Y, Xiao W, Liu D, Tian Q, Li Y, et al. Ecotoxicology of microplastics in Daphnia: A review
395 focusing on microplastic properties and multiscale attributes of Daphnia. *Ecotoxicol Environ Saf*
396 [Internet]. 2023 [cited 2023 Dec 4];249:114433. Available from:
397 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114433>
- 398 7. Cole M, Lindeque P, Fileman E, Halsband C, Goodhead R, Moger J, et al. Microplastic ingestion by
399 zooplankton. *Environ Sci Technol*. 2013;47:6646–55.
- 400 8. Murray F, Cowie PR. Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus*
401 (Linnaeus, 1758). *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2011 [cited 2023 Dec 4];62:1207–17. Available from:
402 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21497854/>
- 403 9. Browne MA, Dissanayake A, Galloway TS, Lowe DM, Thompson RC. Ingested Microscopic Plastic
404 Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environ Sci Technol*
405 [Internet]. 2008;42:5026–31. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es800249a>
- 406 10. Anbumani S, Kakkar P. Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. *Environmental*
407 *Science and Pollution Research* [Internet]. 2018;25:14373–96. Available from:
408 <http://link.springer.com/10.1007/s11356-018-1999-x>
- 409 11. Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Kloas W, Jagnytsch O, Lutz I, Kusk KO, et al. A critical analysis of
410 the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B:*
411 *Biological Sciences* [Internet]. 2009;364:2047–62. Available from:
412 <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2008.0242>
- 413 12. Amasawa E, Yamanishi T, Nakatani J, Hirao M, Sato S. Climate change implications of bio-based
414 and marine-biodegradable plastic: Evidence from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate).
415 *Environ Sci Technol*. 2021;55:3380–8.
- 416 13. Patwary MAS, Surid SM, Gafur MA. Properties and Applications of Biodegradable Polymers.
417 *Journal of Research Updates in Polymer Science* [Internet]. 2020;9:32–41. Available from:
418 <https://lifescienceglobal.com/pms/index.php/jrup/article/view/7780>
- 419 14. Song JH, Murphy RJ, Narayan R, Davies GBH. Biodegradable and compostable alternatives to
420 conventional plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [Internet].
421 2009;364:2127–39. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2008.0289>
- 422 15. Luckachan GE, Pillai CKS. Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging
423 Perspectives. *J Polym Environ*. 2011;19:637–76.
- 424 16. Zhao X, Cornish K, Vodovotz Y. Narrowing the Gap for Bioplastic Use in Food Packaging: An
425 Update. *Environ Sci Technol* [Internet]. 2020;54:4712–32. Available from:
426 <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.9b03755>
- 427 17. Fojt J, David J, Přikryl R, Řezáčová V, Kučerík J. A critical review of the overlooked challenge of
428 determining micro-bioplastics in soil. *Science of The Total Environment* [Internet]. 2020;745:140975.
429 Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969720345046>
- 430 18. Sintim HY, Bary AI, Hayes DG, English ME, Schaeffer SM, Miles CA, et al. Release of micro- and
431 nanoparticles from biodegradable plastic during in situ composting. *Science of The Total*
432 *Environment*. 2019;675:686–93.

- 433 19. Agarwal S. Biodegradable Polymers: Present Opportunities and Challenges in Providing a
434 Microplastic-Free Environment. *Macromol Chem Phys* [Internet]. 2020;221:2000017. Available from:
435 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/macp.202000017>
- 436 20. Wei X-F, Bohlén M, Lindblad C, Hedenqvist M, Hakonen A. Microplastics generated from a
437 biodegradable plastic in freshwater and seawater. *Water Res* [Internet]. 2021;198:117123. Available
438 from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135421003213>
- 439 21. Leja K, Lewandowicz G. Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers – a Review. *Pol J*
440 *Environ Stud*. 2010;19:255–66.
- 441 22. Philip S, Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of
442 applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [Internet]. 2007;82:233–47. Available
443 from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.1667>
- 444 23. Pospisilova A, Novackova I, Prikryl R. Isolation of poly(3-hydroxybutyrate) from bacterial biomass
445 using soap made of waste cooking oil. *Bioresour Technol* [Internet]. 2021;326:124683. Available from:
446 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852421000213>
- 447 24. Savenkova L, Gercberga Z, Nikolaeva V, Dzene A, Bibers I, Kalnin M. Mechanical properties and
448 biodegradation characteristics of PHB-based films. *Process Biochemistry* [Internet]. 2000;35:573–9.
449 Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959299001077>
- 450 25. Turco R, Santagata G, Corrado I, Pezzella C, Di Serio M. In vivo and Post-synthesis Strategies to
451 Enhance the Properties of PHB-Based Materials: A Review. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet].
452 2021;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.619266/full>
- 453 26. Anderson JC, Park BJ, Palace VP. Microplastics in aquatic environments: Implications for Canadian
454 ecosystems. *Environmental Pollution*. 2016;218:269–80.
- 455 27. Schür C, Zipp S, Thalau T, Wagner M. Microplastics but not natural particles induce
456 multigenerational effects in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* [Internet]. 2020 [cited 2021 Apr
457 20];260:113904. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749119353709>
- 458 28. Frydkjær CK, Iversen N, Roslev P. Ingestion and Egestion of Microplastics by the Cladoceran
459 *Daphnia magna*: Effects of Regular and Irregular Shaped Plastic and Sorbed Phenanthrene. *Bull*
460 *Environ Contam Toxicol* [Internet]. 2017;99:655–61. Available from:
461 <http://link.springer.com/10.1007/s00128-017-2186-3>
- 462 29. Scherer C, Brennholt N, Reifferscheid G, Wagner M. Feeding type and development drive the
463 ingestion of microplastics by freshwater invertebrates. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7:17006. Available
464 from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-17191-7>
- 465 30. Eltemsah YS, Bøhn T. Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult
466 *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* [Internet]. 2019;254:112919. Available from:
467 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749119319712>
- 468 31. Pikuda O, Roubreau Dumont E, Chen Q, Macairan J-R, Robinson SA, Berk D, et al. Toxicity of
469 microplastics and nanoplastics to *Daphnia magna*: Current status, knowledge gaps and future
470 directions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [Internet]. 2023;167:117208. Available from:
471 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993623002959>

- 472 32. Kokalj AJ, Kunej U, Skalar T. Screening study of four environmentally relevant microplastic
473 pollutants: Uptake and effects on *Daphnia magna* and *Artemia franciscana*. *Chemosphere* [Internet].
474 2018;208:522–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653518310294>
- 475 33. Jemec A, Horvat P, Kunej U, Bele M, Kržan A. Uptake and effects of microplastic textile fibers on
476 freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* [Internet]. 2016;219:201–9. Available
477 from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749116310533>
- 478 34. Rehse S, Kloas W, Zarfl C. Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic
479 particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere* [Internet]. 2016;153:91–9.
480 Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004565351630306X>
- 481 35. Canniff PM, Hoang TC. Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal
482 growth. *Science of The Total Environment* [Internet]. 2018;633:500–7. Available from:
483 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718309355>
- 484 36. Jaikumar G, Baas J, Brun NR, Vijver MG, Bosker T. Acute sensitivity of three Cladoceran species to
485 different types of microplastics in combination with thermal stress. *Environmental Pollution*
486 [Internet]. 2018;239:733–40. Available from:
487 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749118303415>
- 488 37. Castro DG de, Destro ALF, Coimbra ECL, Silva ALL da, Munteer AH. Effects of PET microplastics on
489 the freshwater crustacean *Daphnia similis* Claus, 1976. *Acta Limnologica Brasiliensia* [Internet].
490 2023;35. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2179-
491 975X2023000100706&tIng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2179-975X2023000100706&tIng=en)
- 492 38. Jaikumar G, Brun NR, Vijver MG, Bosker T. Reproductive toxicity of primary and secondary
493 microplastics to three cladocerans during chronic exposure. *Environmental Pollution* [Internet].
494 2019;249:638–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026974911834781X>
- 495 39. De Felice B, Sabatini V, Antenucci S, Gattoni G, Santo N, Bacchetta R, et al. Polystyrene
496 microplastics ingestion induced behavioral effects to the cladoceran *Daphnia magna*. *Chemosphere*
497 [Internet]. 2019;231:423–31. Available from:
498 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653519310215>
- 499 40. Bosker T, Olthof G, Vijver MG, Baas J, Barmantlo SH. Significant decline of *Daphnia magna*
500 population biomass due to microplastic exposure. *Environmental Pollution* [Internet]. 2019 [cited
501 2021 Apr 20];250:669–75. Available from:
502 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749119304191>
- 503 41. Savva K, Farré M, Barata C. Sublethal effects of bio-plastic microparticles and their components on
504 the behaviour of *Daphnia magna*. *Environ Res* [Internet]. 2023;236:116775. Available from:
505 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935123015797>
- 506 42. Zimmermann L, Göttlich S, Oehlmann J, Wagner M, Völker C. What are the drivers of microplastic
507 toxicity? Comparing the toxicity of plastic chemicals and particles to *Daphnia magna*. *Environmental*
508 *Pollution* [Internet]. 2020 [cited 2021 Apr 20];267:115392. Available from:
509 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749120360802>
- 510 43. Procházková P, Mácová S, Aydın S, Zlámalová Gargošová H, Kalčíková G, Kučerík J. Effects of
511 biodegradable P3HB on the specific growth rate, root length and chlorophyll content of duckweed,
512 *Lemna minor*. *Heliyon* [Internet]. 2023;9:e23128. Available from:
513 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844023103367>

- 514 44. ASTM. E729-96 Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes,
515 Macroinvertebrates, And Amphibians. 2007.
- 516 45. OECD. Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test [Internet]. 2004. Available from:
517 [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test_9789264069947-en)
518 [test_9789264069947-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test_9789264069947-en)
- 519 46. Rosenfeldt RR, Seitz F, Schulz R, Bundschuh M. Heavy metal uptake and toxicity in the presence of
520 titanium dioxide nanoparticles: A factorial approach using Daphnia magna. *Environ Sci Technol*.
521 2014;48:6965–72.
- 522 47. OECD. Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test [Internet]. 2012. Available from:
523 [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-211-daphnia-magna-reproduction-](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-211-daphnia-magna-reproduction-test_9789264185203-en)
524 [test_9789264185203-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-211-daphnia-magna-reproduction-test_9789264185203-en)
- 525 48. Karatzas P, Melagraki G, Ellis LA, Lynch I, Varsou D, Afantitis A, et al. Development of Deep
526 Learning Models for Predicting the Effects of Exposure to Engineered Nanomaterials on Daphnia
527 magna. *Small* [Internet]. 2020 [cited 2024 Jan 2];16. Available from:
528 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/sml.202001080>
- 529 49. Guilhermino L, Martins A, Cunha S, Fernandes JO. Long-term adverse effects of microplastics on
530 Daphnia magna reproduction and population growth rate at increased water temperature and light
531 intensity: Combined effects of stressors and interactions. *Science of The Total Environment* [Internet].
532 2021 [cited 2023 Dec 26];784:147082. Available from:
533 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969721021525>
- 534 50. Procházková P, Kalčíková G, Maršálková E, Zlámalová Gargošová H, Kučerík J. Innovative approach
535 for quantitative determination of ingested microplastics by Daphnia magna: Use of Differential
536 Scanning Calorimetry and Thermogravimetry. *J Therm Anal Calorim*. submitted.
- 537 51. González-Pleiter M, Tamayo-Belda M, Pulido-Reyes G, Amariei G, Leganés F, Rosal R, et al.
538 Secondary nanoplastics released from a biodegradable microplastic severely impact freshwater
539 environments. *Environ Sci Nano* [Internet]. 2019;6:1382–92. Available from:
540 <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8EN01427B>
- 541 52. Okeke ES, Ezeorba TPC, Chen Y, Mao G, Feng W, Wu X. Ecotoxicological and health implications of
542 microplastic-associated biofilms: a recent review and prospect for turning the hazards into benefits.
543 *Environmental Science and Pollution Research* [Internet]. 2022;29:70611–34. Available from:
544 <https://link.springer.com/10.1007/s11356-022-22612-w>
- 545 53. Botterell ZLR, Beaumont N, Cole M, Hopkins FE, Steinke M, Thompson RC, et al. Bioavailability of
546 Microplastics to Marine Zooplankton: Effect of Shape and Infochemicals. *Environ Sci Technol*
547 [Internet]. 2020;54:12024–33. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.0c02715>
- 548 54. Fan P, Yu H, Xi B, Tan W. A review on the occurrence and influence of biodegradable microplastics
549 in soil ecosystems: Are biodegradable plastics substitute or threat? *Environ Int* [Internet]. 2022 [cited
550 2023 Sep 26];163:107244. Available from:
551 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412022001702>
- 552 55. Rummel CD, Jahnke A, Gorokhova E, Kühnel D, Schmitt-Jansen M. Impacts of Biofilm Formation on
553 the Fate and Potential Effects of Microplastic in the Aquatic Environment. *Environ Sci Technol Lett*
554 [Internet]. 2017;4:258–67. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.estlett.7b00164>

SUPPORTING INFORMATIONS

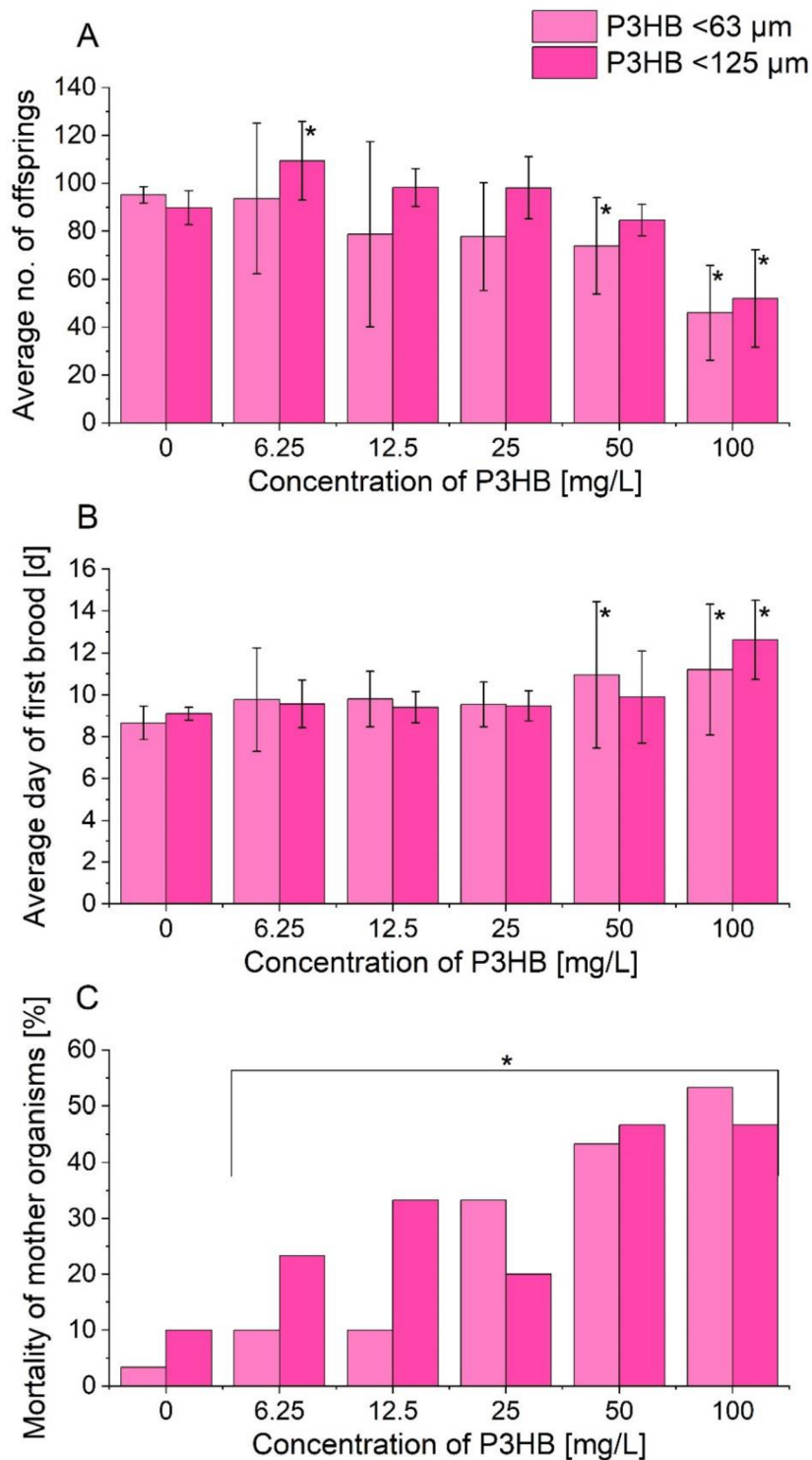


Figure S1: Results of chronic experiments involving both size fractions of P3HB microplastics (<63 μm and <125 μm ; $n = 30$) in higher concentration range (0 – 100 mg/L): A – average number of offsprings per mother organism, B – average day of first brood, C – mortality of mother organisms. Asterisks indicate statistically significant deviations from the control ($p < 0.05$).