



# 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

## VLIV MIKROBIOPLASTŮ NA VODNÍ ROSTLINY

INFLUENCE OF MICROBIOPLASTICS ON AQUATIC PLANTS

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Sabina Mácová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.

BRNO 2023

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1870/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany  
životního prostředí  
Studentka: **Sabina Mácová**  
Studijní program: Aplikovaná analytická,  
environmentální a forenzní chemie  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **prof. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Vliv mikrobioplastů na vodní rostliny

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracování literární rešerše na téma mikroplasty a mikrobioplasty, tvorba, osud v životním prostředí a vliv na vodní rostliny.
2. Provedení testů ekotoxicity velikostních frakcí mikrobioplastů o různé koncentraci na vybrané vodní rostlině.
3. Analýza dat, vliv na růst rostliny, hmotnost a délku kořene, množství chlorofylu, abiotické faktory.
4. Diskuze a interpretace získaných výsledků.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

-----  
Sabina Mácová  
studentka

prof. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.  
vedoucí práce

vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

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

## **ABSTRAKT**

Znečištění životního prostředí plasty se stává jedním z vážných ekologických problémů, proto se v posledních letech vyvíjí snaha navrhnout alternativy k běžným konvenčním plastům. Jako možná alternativa se jeví biodegradabilní plasty, které mají podobné vlastnosti jako syntetické plasty, a navíc jsou považovány za nezávadné a rozložitelné v životním prostředí. Avšak za reálných podmínek je biodegradace poměrně časově náročný proces a může dojít pouze k bio fragmentaci na malé částice, tzv. mikrobioplasty. O jejich vlivu na životní prostředí se prozatím ví jen velmi málo.

Tato práce se zabývá ekotoxikologickým vlivem mikročástic biodegradabilního poly(3-hydroxybutyrátu) (P3HB) ve dvou velikostních frakcích (částice <63  $\mu\text{m}$  a od 63 do 125  $\mu\text{m}$ ) na vodní rostlinu *Lemna minor*. Byl sledován vliv na rychlost růstu, hmotnost biomasy, obsah fotosyntetických pigmentů a délku kořenů. Pro porovnání s P3HB byly provedeny také testy s polyethylentereftalátem (PET).

V případě rychlosti růstu, hmotnosti biomasy a obsahu fotosyntetických pigmentů v listech nebyl zaznamenán negativní vliv. Jedinou pozorovanou změnou bylo prodlužování délky kořene se zvyšující se koncentrací P3HB. Sorpční experimenty naznačily, že prodlužování délky kořene mohlo být způsobeno úbytkem živin. Příčinou může být buď přítomnost biofilmu, který se na částicích během testu vytvořil, nebo sorpce nutrientů na mikročástice.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Biodegradabilní plasty, mikropasty, *Lemna minor*, ekotoxikologie, polyhydroxybutyrát

## **ABSTRACT**

Plastic pollution is becoming a serious environmental problem, for this reason, in recent years efforts have been made to propose alternatives to conventional plastics. Biodegradable plastics appeared to be a possible alternative due to similar properties to synthetic plastics and because they are considered safe and degradable in the environment. However, under real conditions, biodegradation is a relatively time-consuming process that can lead only to biofragmentation into small particles, co-called microbioplastics. So far, very little is known about their impact on the environment.

This work deals with the ecotoxicological influence of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) microparticles in two size fractions (particles <63  $\mu\text{m}$  and from 63 to 125  $\mu\text{m}$ ) on the aquatic plant *Lemna minor*. The effects on growth rate, biomass weight, photosynthetic pigment content in leaves, and root length were monitored. For the comparison, tests with polyethylene terephthalate (PET) were also performed.

In the case of growth rate, biomass weight, and photosynthetic pigment content in leaves, no negative effects were observed. The only monitored change was an increase in root length with increasing P3HB concentration. The sorption experiments suggested that the root elongation can be caused by nutrient depletion. The depletion may be caused either by the presence of biofilm formed on the microparticles during the test or the sorption of nutrients onto the microparticles.

## **KEYWORDS**

Biodegradable plastics, microplastic, *Lemna minor*, ecotoxicity, polyhydroxybutyrate

MÁCOVÁ, Sabina. *Vliv mikrobioplastů na vodní rostliny*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148903>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Jiří Kučerík.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma *Vliv mikrobioplastů na vodní rostliny* vypracovala samostatně a že jsem všechny použité literární zdroje správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

-----

Podpis studentky

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala mé konzultantce Ing. Petře Procházkové za podporu, cenné rady a trpělivost v laboratoři, ale také mimo ni. Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce prof. Ing. Jirímu Kučeríkovi, Ph.D. za vstřícnost, čas a rady, které mi věnoval při vypracování této práce. Nakonec bych chtěla poděkovat mé rodině, partnerovi a přátelům za obrovskou podporu během celého studia.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Plasty .....	9
2.2	Biopolymery.....	10
2.3	Polyhydroxyalkanoáty (PHA).....	11
2.3.1	Polyhydroxybutyrát.....	14
2.4	Mikroplasty .....	15
2.4.1	Vliv mikroplastů na vodní ekosystém .....	17
2.5	Ekotoxikologie .....	18
2.5.1	Faktory ovlivňující toxicitu látek .....	21
2.5.2	Ekotoxikologické biotesty .....	21
2.5.2.1	<i>Lemna minor</i> .....	23
2.5.3	Ekotoxikologické testy s mikroplasty .....	24
3	CÍL PRÁCE.....	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
4.1	Příprava PHB a PET.....	28
4.2	Příprava kultivačního média.....	28
4.3	Test toxicity na organismu <i>Lemna minor</i> .....	28
4.3.1	Stanovení počtu stélek.....	29
4.3.2	Měření délky kořene.....	29
4.3.3	Stanovení čerstvé a suché biomasy .....	30
4.3.4	Stanovení fotosyntetických pigmentů .....	30
4.4	Sorpční experiment .....	30
4.4.1	Test s menší koncentrací živin .....	30
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	31
5.1	Vliv na rychlost růstu a hmotnost biomasy .....	31
5.2	Vliv na obsah fotosyntetických pigmentů.....	32
5.3	Vliv na růst kořene .....	36
5.4	Test s mikročásticemi PET.....	38
5.5	Sorpční experiment .....	40
5.6	Nutrienty.....	42
6	ZÁVĚR.....	44

7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	45
8	SEZNAM ZKRATEK.....	53

# 1 ÚVOD

Plasty jsou pro svoje unikátní vlastnosti, jako je například specifická hmotnost, odolnost a cenová dostupnost, velmi využívanými materiály po celém světě. Jejich špatná recyklovatelnost a nevhodné zacházení však vede k výraznému ekologickému problému, a to po celém světě a ve všech složkách životního prostředí [1]. Je to způsobeno tím, že jejich používáním vzniká plastový odpad a jeho nezanedbatelná část následně není vhodně zpracována a končí v životním prostředí. Zde setrvává a může mít negativní vliv na biotu. Zároveň dochází vlivem mechanické a chemické degradace k jeho postupné fragmentaci na menší částice, tedy mikroplasty a nanoplasty. Ty mohou následně negativně ovlivňovat životní prostředí [2, 3].

To vše v současné době vede k vývoji šetrnější a ekologičtější náhrady. Je snaha vyvinout nový a snadněji rozložitelný materiál. Tím by mohly být biodegradabilní polymery, které mají vysoký potenciál díky předpokladu nezávadnosti vůči životnímu prostředí, biokompatibilitě a rychlé biologické odbouratelnosti, což by vedlo k postupnému snižování plastů a mikroplastů v životním prostředí. Tento předpoklad ale nemusí být pravdivý. Proces biodegradace může v reálných podmínkách probíhat výrazně pomalu, anebo také vůbec. Celý průběh je závislý na okolním prostředí a jeho podmínkách (teplota, vlhkost, přítomnost mikroorganismů, pH). To znamená, že i biodegradabilní plasty s sebou nesou riziko poměrně dlouhého setrvávání v životním prostředí s rychlejší možností degradace a vznikem mikrobioplastů. Ty pak mohou vykazovat negativní účinky na přítomnou biotu [4, 5].

Prozatím neexistuje mnoho studií, které by se zabývaly osudem a vlivem biodegradabilních mikroplastů v různých ekosystémech. Proto je tato bakalářská práce zaměřena na potenciální ekotoxikologický vliv biodegradabilních mikroplastů poly(3-hydroxybutyrátu) (P3HB), patřícího do skupiny polyhydroxyalkanoátů (PHA), na volně plovoucí vodní rostlinu *L. minor*, čeledě okřehkovitých (*Lemnaceae*). P3HB byl zvolen ve dvou velikostních frakcích (částice <63  $\mu\text{m}$  a od 63 do 125  $\mu\text{m}$ ) a v koncentracích 10, 50 a 100 mg/l. Sledované endpointy byly specifická rychlost růstu, hmotnost biomasy, obsah fotosyntetických pigmentů a délka kořenů.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Plasty

Plasty jsou směsi organických polymerů a přidaných aditiv. Podle jejich tvaru je můžeme dělit například na vlákna, pelety, fólie, pěny a mikroplasty [6]. Polymery jsou makromolekulární organické látky, složené z mnoha opakujících se konstitučních jednotek, jejichž struktura je vystavěna převážně z uhlíku a vodíku a dalších prvků, jako jsou kyslík, chlor, fluor, dusík, křemík, fosfor a síra [7, 8].

Plasty se dále podle termických vlastností dělí na termoplasty a reaktoplasty. Termoplasty mají amorfní či částečně krystalický charakter s lineárními makromolekulami a většinou i nízkým obsahem rozvětvených struktur. K jejich zpracování dochází tepelným působením nad jejich teplotou tání, kdy polymer přechází ze stavu tuhého do stavu plastického [8, 9]. Jsou opakovaně tvarovatelné [8]. Mezi termoplasty patří polyolefiny, vinylové polymery, styrenové polymery, polyestery a polyamidy. Typickými zástupci jsou polyethylen (PE), polypropylen (PP), polyvinylchlorid (PVC), polystyren (PS), polymethyl-methakrylát (PMMA) a polyoxymethylen (POM) [9, 10].

Reaktoplasty jsou polymery, které obsahují lineární nebo větvené makromolekuly a na rozdíl od termoplastů jsou tvarovatelné pouze jednou. Během jejich zpracování dochází dodáním tepla k síťování, které vede k vytvrzování plastů [8, 9]. Tento proces je nevratný. Produkty z těchto materiálů mají vysokou chemickou a tepelnou odolnost, tvrdost a tuhost. Produkt v nevytvrzeném stavu se nazývá pryskyřice (fenol-formaldehydová pryskyřice, epoxidová pryskyřice, polyesterová pryskyřice) [10]. Uplatnění nachází při výrobě lisovacích hmot, lepidel, nátěrových hmot nebo prostředků pro úpravu různých materiálů jako je kůže nebo papír [9]. Polymery můžeme dále dělit na přírodní, které se přirozeně vyskytují v životním prostředí, a na syntetické, mezi které se řadí konvenční plasty [10].

Plasty jsou považovány za všestranný a levný materiál, který se využívá ve většině odvětví průmyslu a výroby po celém světě. Je tomu tak díky jejich unikátním vlastnostem, jako jsou lehkost, různý stupeň pevnosti, odolnost vůči chemikáliím, nízká výrobní cena a celková všestrannost ve výrobě široké škály zboží (obalové materiály, oděvy, stavební materiály nebo různé druhy pomůcek do domácnosti, které zvyšují pohodlí a kvalitu našeho života), také se řadí mezi tepelné a elektrické izolátory [2, 3, 7]. K jejich největším výhodám patří chemicky inertní chování, nízká hustota, vysoká odolnost a dobré mechanické vlastnosti [2, 4]. K vylepšení vlastností, lepší zpracovatelnosti nebo k ochraně vůči degradaci se mohou přidávat různé specifické přísady, tzv. aditiva [7]. Mohou to být tepelné nebo světelné stabilizátory, barviva, maziva, změkčovadla a retardéry hoření [10].

Především jejich cena, dostupnost a variabilita zapříčinily exponenciální růst produkce plastů po celém světě, staly se tak nepostradatelným materiálem pro celou společnost [1]. Celosvětová produkce plastů byla v roce 2021 okolo 390,7 milionů tun. Oproti roku 2016, kdy bylo produkováno „jen“ 335 milionů tun, tak došlo k nárůstu o 16,6 %, a to za pouhých pět let [11]. V současné době se neočekává, že by spotřeba plastového materiálu měla klesat, naopak,

předpokládá se, že do roku 2050 dojde k překročení hranice světové produkce plastů 1 000 milionů tun ročně [2].

I přes početné výhody, které plastové materiály mají, způsobují v životním prostředí závažné environmentální problémy. Je to dáno jejich nadměrným jednorázovým využíváním, nevhodným zpracováním a převážně špatným nakládáním se vzniklým plastovým odpadem, jako je například littering (volně pohozený odpad na nevhodném místě). Takový odpad pak vzhledem ke své nerozložitelnosti setrvává v životním prostředí [1, 3, 4, 12]. Více než 50 % plastů se již necelý rok od výroby stává odpadem, který většinou není vícekrát využit, nebo recyklován [13]. Podle odhadů dochází k recyklaci pouze u 9–10 % plastových materiálů, 12 % plastů je spalováno ve spalovnách odpadů. Zbýlých 79 % končí na skládkách nebo v životním prostředí [4]. Značná část plastů, která setrvá v životním prostředí, se může snadno dostat do akvatického prostředí [13]. Odhaduje se, že do moří a oceánů se ročně dostane přes 11 milionů tun plastů [3, 13].

Kumulace plastového odpadu a vznik mikroplastů v životním prostředí je celosvětovým problémem a jeho závažnost stále narůstá [14]. Tato situace vyvolala obavy z jejich možných negativních dopadů na lidské zdraví, volně žijící organismy a ekonomiku, což jsou silné podněty k inovaci a výzkumu biodegradabilních plastů a ke zlepšení udržitelného používání plastů [15]. V současné době je snaha o nahrazení jednorázových konvenčních plastů ekologickými a biologicky rozložitelnými plasty, a to kvůli zamezení vzniku mikroplastů, zvyšující se poptávce po ropě, vyčerpávání neobnovitelných zdrojů a následným emisím skleníkových plynů [1, 4, 16]. Vývoj biopolymerů (a z nich pak vývoj bioplastů), jako jsou např. polyhydroxyalkanoáty, se již jeví jako nezbytnost pro vyřešení globálních environmentálních problémů a obnovu ekosystémů [16].

## 2.2 Biopolymery

Všeobecně můžeme biopolymery definovat podle dvou podmínek – buď byly vyrobeny z biologických zdrojů (biomasy), jsou biologicky rozložitelné, anebo splňují obě dvě podmínky [17]. Pokud byl biopolymer vyroben z biologických zdrojů, tak to znamená, že použitý materiál byl z udržitelných organických surovin nebo z biomasy, jako je například kukuřice, celulóza nebo cukrová třtina [1, 18]. Právě využití obnovitelných surovin je velkou výhodou těchto materiálů oproti konvenčním plastům vyráběných z fosilních zdrojů [18]. Tato strategie výroby vede k udržitelnému rozvoji a snížení spotřeby neobnovitelných zdrojů [18, 19]. Mezi nevýhody patří vysoké výrobní náklady oproti výrobě konvenčních plastů a fakt, že tyto materiály nemusí být vždy biodegradabilní [19].

Mezi biologicky odbouratelné, tzv. biodegradabilní, plasty můžeme řadit jen ty, u kterých probíhá přirozená degradace působením mikroorganismů (bakterie, řasy a houby). Takové plasty mohou být vyrobeny i z neobnovitelných surovin. Biodegradace může probíhat různými způsoby, aerobní nebo anaerobní cestou. Při biodegradaci se může biodegradabilní plast degradovat na biomasu anebo nastane mineralizace rozložených produktů během katabolismu, tedy přeměna na  $\text{CO}_2$  nebo  $\text{CH}_4$  a vodu [19, 20]. Samotný biologický rozklad je z velké části závislý i na chemické struktuře materiálu, teplotě, pH, množství vody a redoxním potenciálu

což ovlivňuje to, jestli biodegradace proběhne či nikoliv [18]. Další důležitý faktor je přítomnost různých biodegradaci usnadňujících mikroorganismů [1].

Biodegradace plastu probíhá ve 4 fázích. První fází je proces biodeteriorace, kdy mikroorganismy vytvoří na povrchu materiálu biofilm. Ten následně způsobuje fragmentaci biodegradabilního polymeru na menší částice. Ve druhé fázi nastává depolymerizace částic pomocí extracelulárních enzymů z mikroorganismů v biofilmu. Ve třetí fázi dojde k bioasimilaci, což je proces, při kterém dochází k transportu vzniklých molekul do buněk mikroorganismů. Biodegradace je zakončena mineralizací, při které vzniká voda a oxid uhličitý, pokud se jedná o aerobní biodegradaci, anebo methan, který vzniká při anaerobní biodegradaci [4]. Fáze biodegradace jsou výrazně ovlivněny endogenními a exogenními faktory. Mezi endogenní faktory se řadí molekulová hmotnost, stupeň krystalinity a flexibilita dané molekuly a do exogenních faktorů pak teplota, pH, dostupnost kyslíku, vlhkost prostředí a enzymatická aktivita [19].

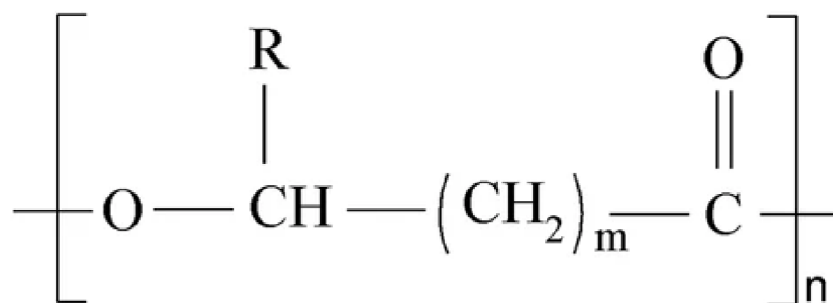
Samotná biodegradace i u biodegradabilních polymerů může trvat za nepříznivých podmínek i několik desítek let nebo k ní v otevřeném environmentálním prostředí nedojde vůbec. Problém spočívá v tom, že tyto materiály vyžadují k úplnému rozložení specifické podmínky (viz výše), ke kterým v reálném prostředí dochází jen velmi zřídka. Naopak může tento proces vést k poměrně rychlé tvorbě mikročástic z biodegradabilních materiálů, tzv. mikro-bioplastům [4].

Mezi nejvýznamnější biodegradabilní biopolymery se řadí ty, které jsou na bázi esterů celulózy, derivátů škrobu (TPS), kyseliny polymléčné (PLA), polykaprolaktonu (PCL) a polyhydroxybutyrátu. Jejich uplatnění můžeme nalézt například ve farmaceutické a biomedicínské oblasti (protézy, šití, médium pro řízené uvolňování léčiv), v obalovém průmyslu anebo v zemědělství [19].

### **2.3 Polyhydroxyalkanoáty (PHA)**

Polyhydroxyalkanoáty patří do skupiny nejvýznamnějších intracelulárních biodegradabilních polymerů, které jsou biologicky syntetizovány bakteriální fermentací cukrů a lipidů [21, 22]. Jsou to biopolyestery 3-hydroxykyselin se širokou škálou vlastností, které mohou být ovlivněny výběrem bakterií, substrátu a fermentačních podmínek za vzniku křehkých termoplastů až gumovitých elastomerů [22, 23]. Mezi jejich vlastnosti kromě biodegradability patří nerozpustnost ve vodě, vysoce biokompatibilní termoplasticitu, relativní odolnost vůči hydrolytické degradaci, biokompatibilita a vhodnost pro lékařské aplikace [22]. Jedním z nejznámějších zástupců strukturně jednoduchých PHA je poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB), který byl i jako první objeven [23, 24]. Materiály z těchto biopolymerů jsou přírodní, netoxické, obnovitelné a mají některé mechanické vlastnosti jako je například pružnost připomínající polypropylen [1, 21].

PHA jsou přirozeně biosyntetizovány z 600 až 35 000 totožných monomerů prokaryotickými mikroorganismy ve formě intracelulárních granul kulatého tvaru o průměru 0,1–0,2  $\mu\text{m}$  v cytoplasmě (Obrázek 1). Tyto granule slouží jako zásobárna energie a uhlíku, který je využíván jako stavební jednotka [21, 24].



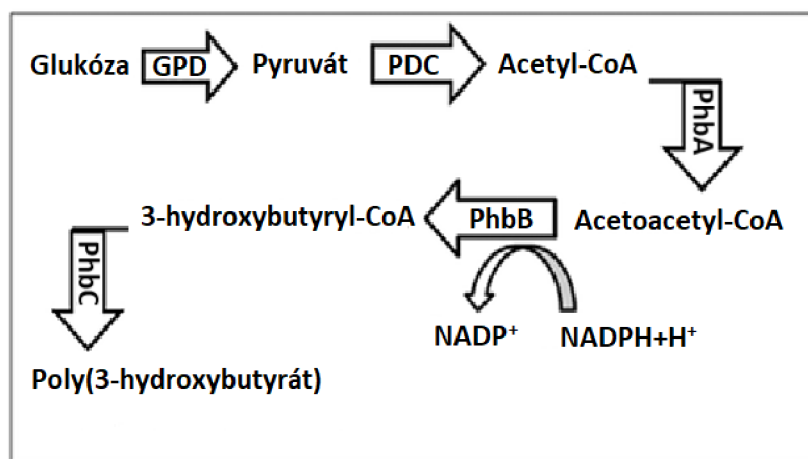
Obrázek 1: Chemická struktura polyhydroxyalkanoátů [21].

Monomery polyhydroxyalkanoátů se mohou rozlišovat do dvou skupin podle počtu atomů uhlíku, a to na polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem (scl-PHA) z 3-5 atomů uhlíku a polyhydroxyalkanoáty se střední délkou řetězce (mcl-PHA) z 6-14 atomů uhlíku. Počet atomů uhlíku v polymeru má významný vliv na výsledné vlastnosti polymeru, scl-PHA, kam patří i P3HB, dosahují podobných termoplastických vlastností jako má polypropylen a oproti mcl-PHA mají vyšší výtěžnosti a čistoty. Mcl-PHA vykazují díky délce řetězce zvýšenou pružnost a sníženou krystalinitu připomínající elastomery, mají nižší molekulovou hmotnost a nižší teplotu skelného přechodu, než scl-PHA [16].

PHA mají do budoucna vysoký potenciál jako náhrada za konvenční těžko rozložitelné plasty na bázi ropy, jako je polyethylen či polypropylen [24]. Je tomu tak díky jejich podobným vlastnostem (snadné zpracování, UV stabilita, odolnost vůči vodě, tuhost, vysoký stupeň polymerace, netoxičnost, termoplastičita a jiné další univerzální materiálové vlastnosti), ale především biodegradabilitou a tím, že je lze vyrábět z obnovitelných zdrojů [22, 25]. PHA v posledních letech nachází uplatnění v průmyslu a hospodářství – při výrobě chemikálií, jako je například kyselina krotonová, n-butanol, akryláty, anhydrid kyseliny maleinové nebo propylen. V zemědělství se využívají jako přísada do krmiva pro hospodářská zvířata, kde navyšují odolnost proti některým patogenům, nebo k zapouzdření některých hnojiv a léčiv, což je využito pro postupné a pomalé uvolňování potřebných látek [21]. Některé polyhydroxyalkanoáty jsou využívány v lékařství k výrobě biodegradabilních implantátů a také nachází uplatnění v tkáňovém inženýrství (biosenzory, tkáňové náplasti) a při enkapsulaci léčiv [21, 22]. V těchto případech ale musí vykazovat biologickou kompatibilitu a nesmí být odmítnuty či způsobovat zánětlivou reakci. Při využití na regeneraci příslušných tkání musí být biopolymery stoprocentně biologicky odbouratelné [21]. Velký potenciál mají PHA pro použití v potravinářském průmyslu jako folie a potravinářské obaly [22].

Biosyntéza a akumulace polyhydroxyalkanoátů v mikrobiálních buňkách probíhá v cytoplasmě a syntetizovaný polymer úzce souvisí s použitým substrátem živin [21]. PHA vznikají jako produkty sekundárního metabolismu některých bakterií (*Bacillus magaterium*, *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas oleovorans*), cyanobakterií, řas a určitých kvasinek aerobním procesem za stanovených fermentačních podmínek [23, 26]. Následně jsou akumulovány jako zásobní látky, jako odezva na omezení životně důležitých prvků (dusík, kyslík, fosfor a stopové prvky). Množství získaného produktu ze substrátu se odvíjí od dostupnosti zdroje uhlíku. Při nadbytku zdroje, jako je například sacharóza, glukóza, rostlinné oleje či glycerin, může docházet k mikroorganické akumulaci až 60–80 % hmotnosti živin

v polyhydroxyalkanoátech s funkcí zásobního zdroje energie [26]. Složení výsledného produktu i jeho výtěžek se odvíjí od přirozené variability syntetizujících organismů. Pomocí prekurzorů a manipulací genomu buňky organismu může dojít k inhibici, eliminaci nebo k pozměnění probíhajících bioproců a tím docílit požadované délky polymerního řetězce [23].



Obrázek 2: Biosyntéza P3HB v bakteriální buňce. Převzato z [27].

Jednou ze základních biosyntéz PHA je třístupňová biosyntéza P3HB katalyzovaná enzymy (Obrázek 2). V první fázi dochází ke katalytické kondenzaci dvou molekul acetyl-CoA pomocí  $\beta$ -ketothiolázy (phbA) za vzniku acetoacetyl-CoA. V dalším kroku biosyntézy P3HB následuje katalytická redukce acetoacetyl-CoA enzymem acetoacetyl-CoA reduktázou (phbB). Výsledkem této následné reakce je 3-hydroxybutyryl-CoA. Konečný proces polymerace probíhá přes enzym P3HB syntázu (phbC) za vzniku vysokomolekulárního P3HB se zachovalou konfigurací na asymetrickém uhlíku [21, 23].

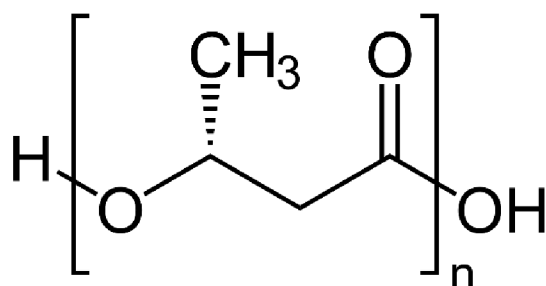
Průmyslovou syntézu poly-3-hydroxybutyrátu můžeme rozdělit na tři fáze: fermentaci, extrakci a purifikaci (čištění). Nejčastěji využívaným mikroorganismem při výrobě P3HB je bakterie *Alcaligenes eutrophus*, a to díky snadné kultivaci v jednoduchém médiu a schopnosti akumulovat až 80 % živin v PHA. Primární část výroby je kultivace živých mikrobiálních buněk, která se odehrává v bioreaktorech za probíhajícího provzdušňování a pasterizace. Poté následuje proces separace biomasy bohaté na polyhydroxyalkanoáty od fermentačního kalu [26]. Při izolaci P3HB z biomasy dochází k chemické, mechanické nebo enzymatické destrukci buněčné membrány, která tvoří bariéru mezi granulemi P3HB a okolím. Zároveň dochází k heteronukleaci, kdy se amorfní P3HB přeměňuje na semikrystalický polymer. Rychlost krystalizace je dána stupněm poškození membrány. Dále dojde k rozpuštění ve vhodném rozpouštědle jako je například chloroform nebo dichlormethan [23]. Separace od hrubých nečistot, jako jsou zbytky buněčných stěn, většinou probíhá pomocí sedimentace, odstředování, flokulací, anebo filtračními technikami [26]. Pomocí extrakce s vhodným typem směsi (voda/organické rozpouštědlo) dojde ke konečnému pročištění P3HB [23].

Fáze získávání intracelulárních PHA od okolní buněčné masy, která neobsahuje PHA, je finančně omezující pro průmyslovou výrobu, protože okolo 50 % nákladů na výrobu je spjato

právě s extrakcí a čištěním PHA. Při získávání biopolymeru nesmí být negativně ovlivněny jeho vlastnosti, jako je například molekulová hmotnost. Proto je třeba dbát pozornosti při sušení PHA lyofilizačními nebo tepelnými procesy z mikrobiální biomasy [26]. Nevýhodou polyhydroxyalkanoátů jsou tak vysoké výrobní náklady (potřeba živného substrátu pro bakterie), složitost výrobní technologie, obtížná extrakce s nízkým výtěžkem, komplikace spojené s jejich následným zpracováním a také minimální výnosy, což jsou omezující faktory pro jejich vývoj a následnou produkci [16, 21, 24]. I jejich náchylnost k degradaci je v tomto ohledu problém, kterému jeho výroba čelí. Ve snaze docílit snížení výrobních nákladů a zároveň dosáhnout a udržet krok s konkurencí, tedy s nízkonákladovou výrobou konvenčních plastů, se vyvíjí a zkoumá skupina nově vznikajících bakteriálních fermentačních procesů, které mohou mít potenciál zesílit kinetiku růstu mikroorganismů a akumulaci P3HB tak, aby bylo dosaženo zisku při výrobním procesu. Jiné studie se zabývají použitím různých směsí, přidáváním funkčních skupin a vývojem kopolymerů a chemických modifikací materiálu, za účelem snížení vysokých výrobních nákladů [16].

### 2.3.1 Polyhydroxybutyrát

Jako první z polyhydroxyalkanoátů byl ve 20. letech 20. století izolován a charakterizován polyhydroxybutyrát a díky němu tak došlo k objevení celé skupiny (Obrázek 3). Od té doby byl studován vědci jako biosyntetický produkt pro skladování energie a uhlíku bakteriemi a jako materiál s jedinečnými vlastnostmi, z nichž některé vykazují lepší parametry, než konvenční polymery [16]. Například jeho bariérové vlastnosti jsou lepší oproti polypropylenu (PP) a polyethylenu (PE) a mohou být využity v obalovém průmyslu [23]. P3HB patří díky dobrým mechanickým vlastnostem, zdravotní nezávadnosti a biodegradabilitě mezi nejslibnější vyvíjené a hodnocené biomateriály. Je považován za potenciální náhradu konvenčních polymerů (PP, PE) [16]. Zatím však jako čistý homopolymer nenachází tak velké uplatnění kvůli jeho nízké termické stabilitě a nízké deformovatelnosti a také neefektivní výrobě [23].



Obrázek 3: Chemická struktura molekuly poly-3-hydroxybutyrátu (P3HB) [28].

P3HB je mikrobiálně zpracovaný biokompatibilní polyester vyskytující se ve formě pevné bílé látky, který se řadí mezi polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem s monomery obsahujícími 4–5 atomů uhlíku [16, 24]. P3HB je vysoce krystalický, extrémně křehký, tuhý a má nízkou tepelnou stabilitu [16, 21, 24]. Ve formě vláken vykazuje elastický charakter. Jeho šroubovicová krystalická struktura určuje možnosti chemického a mechanického zpracování polymeru [21]. Kontaktní úhel P3HB se uvádí v rozmezí mezi 70° až 80°, což mu dává mírně hydrofobní charakter [5]. Hustota krystalického P3HB je 1,26 g/cm<sup>3</sup>, 1,18 g/cm<sup>3</sup> pak jeho amorfni podoby. V amorfni fázi je P3HB pružný, ohebný, má nízkou pevnost v tahu a téměř

výhradně v něm probíhá molekulární transport díky jeho méně definované molekulární struktuře. Oproti krystalické fázi má větší volný objem, který může za snížení bariérových vlastností [29].

P3HB dosahuje stupně krystalinity v rozsahu 55-85 % [23]. Teplota krystalizace ( $T_c$ ) je okolo 110 °C, při této teplotě je schopný snadno krystalizovat z taveniny za vysokého stupně krystalinity ( $X_c$  přes 80 %) [26]. Podle zdroje růstu krystalů (tavenina, roztok) je schopný tvořit velmi tenké laminární krystaly (4–7 nm), které vytváří destičkové tvary nebo sférolity [23]. Díky této vlastnosti projevuje vyšší bariérové vlastnosti a odolnost vůči vodním parám, kyslíku a ultrafialovému záření [26]. Pro semikrystalické polymery jako je P3HB jsou důležité dvě hlavní teploty, a to teplota skelného přechodu ( $T_g$ ) pro amorfni fázi, která leží mezi 5–9 °C a teplota tání ( $T_m$ ) pro krystalickou fázi ležící mezi 165–175 °C [16]. Při zpracování P3HB nastává jeden závažný problém, kterým je jeho rychlá termická degradace (okolo 180–200 °C). Proto je potřeba počítat s jejím vlivem na výsledné vlastnosti materiálu, neboť ke zpracování dochází v rozsahu 10–15 °C nad  $T_m$ . Při termické degradaci dochází převážně ke vzniku kyseliny krotonové [23].

P3HB nachází uplatnění v lékařství jako materiál na výrobu umělé kůže a srdečních chlopní, jednorázových potřeb, ale také pro řízené uvolňování léčiv [24]. P3HB je schopný stimulovat buněčnou proliferaci (tvoření nebo růst buněk) a regeneraci tkání bez indukce růstu nádoru. Také může podle experimentálních studií na zvířatech sloužit jako podpora pro regeneraci buněk gastrointestinálního traktu a krevních cév. Mezi jeho další využití patří výroba bavlněných transgenních vláken. Tato vlákna vykazují vlastnosti jako je zvýšená pružnost, pevnost, tuhost a snížená absorpce tepla a vody. Toho se využívá při výrobě termolátek a izolačních materiálů. Podobně jako u bavlny je genetická modifikace s P3HB zavedena například i u lnu. Při mírné akumulaci P3HB v kmenových buňkách lnu dochází ke zlepšení elasticity a pevnosti v tahu. Tento materiál nachází uplatnění v lékařství na výrobu speciálních obvazů na chronické rány, které vykazují vlastnosti jako je podpora proliferace lidských fibroblastů a antibakteriální a antifungální aktivita [21].

## 2.4 Mikroplasty

I přes vysokou odolnost syntetických polymerů dochází k jejich opotřebování a degradaci na malé částice, tzv. mikroplasty. Je to způsobeno kombinací oxidace, hydrolyzy, mechanické koroze, fotodegradace, termické degradace a mikrobiologického rozkladu [30]. O malých částicích plastu vznášejících se na hladině oceánu byla první vědecká zmínka na začátku 70. let 20. století [2, 31, 32]. Mikroplasty (MP) jsou definovány jako drobné, pravidelné i nepravidelné částice o velikosti v rozmezí 1 až 1000  $\mu\text{m}$  [15]. Obecně je lze dělit do dvou skupin – primární a sekundární.

Primární mikroplasty jsou účelově vyráběné pro průmyslové využití, vyskytují se často v podobě pelet a mikrokuliček [3]. Jejich využití se nachází v řadě průmyslových odvětví jako příměs pro čisticí prostředky, produkty osobní péče (tekutá mýdla, zubní pasty, krémy), nátěrové hmoty a pro mnohé technické účely [2, 14, 33].

Vlivem mechanických a degradačních procesů vznikají rozpadem větších částic (makroplastů) v životním prostředí sekundární mikroplasty. Ty jsou mnohem reaktivnější a nebezpečnější pro živé organismy. Jejich zdrojem mohou být různé druhy materiálů, například průmyslové pryskyřicové pelety, rybářské sítě v mořích, zemědělské mulčovací fólie, částice z otěru pneumatik, vlákna z praní oděvů, různé předměty z domácností a plastový odpad [2, 3]. K degradaci a vzniku mikroplastů dochází snáze v půdním než ve vodním prostředí. Nejúčinnější bývá u pobřeží, a to díky tomu, že je zde plastový odpad vystaven extrémnějším podmínkám než ve vnitrozemských oblastech a degradační procesy jsou zde účinnější. Dalším z možných důvodů snížení účinnosti rozkladu plastů ve vodním prostředí je i nízká teplota a koncentrace kyslíku [2, 13]. Všeobecně je degradace hydrofilního plastu rychlejší oproti hydrofobnímu [34].

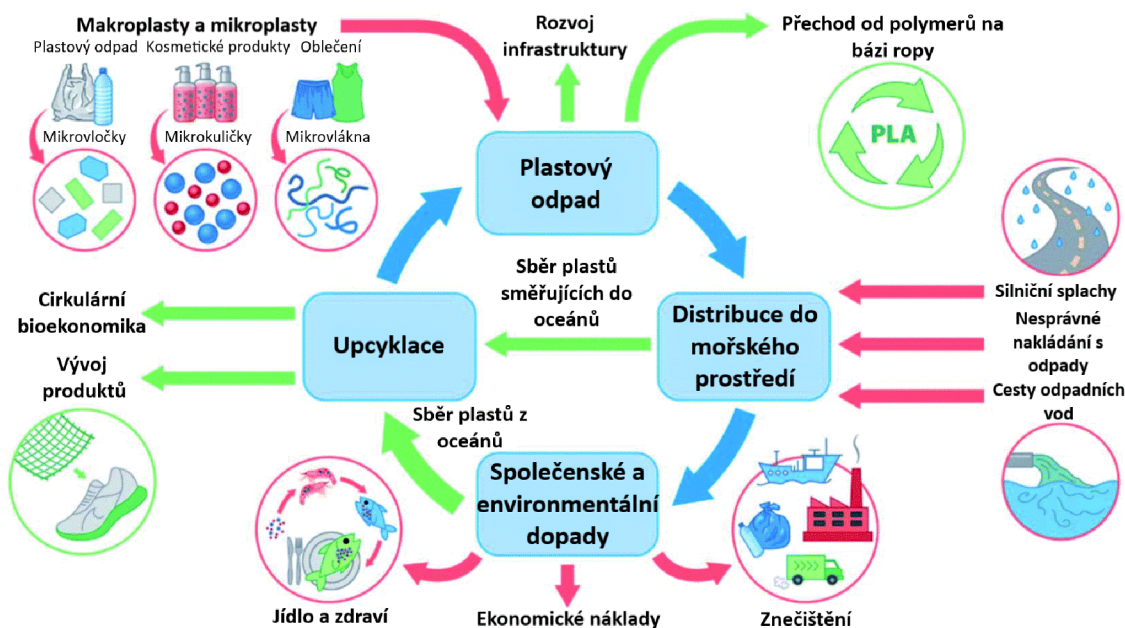
Do akvatického prostředí se mikroplasty dostávají z různých zdrojů jako jsou například průmyslové a domácí kanalizace, odtoky ze silnic, čistírny odpadních vod, přenos větrem nebo nevhodnou likvidací plastového odpadu (viz Obrázek 4) [2, 30]. U zemědělských půd je častým zdrojem mikroplastů, kromě čistírenských kalů, mulčování plastovými fóliemi. Jejich likvidace je časově náročná a pracná, a proto se často tyto fólie anebo jejich části úmyslně i neúmyslně nechávají v půdě, kde poté dochází k jejich degradaci na mikročástice, které se zde postupně hromadí. Tyto částice pak mohou být z půd vymývány a mohou se dostávat do podzemních a povrchových vod. Dalším významným zdrojem mikroplastů je atmosférická depozice a splachy z komunikací, které kontaminují povrchové půdy a vody [13, 35]. Kontaminace plasty bývá obzvlášť významná v ústích řek, což dále vede ke znečištění pobřeží a mořského prostředí. Řeky mohou přinášet kolem 80–94 % z celkové plastové zátěže v mořích a oceánech [13]. I přes to, že čistírny odpadních vod zvládnou zachytit až 98 % mikroplastů z odpadních vod, tak se jen v USA denně dostane do akvatického prostředí odhadem 8 bilionů plastových kulovitých mikročástic převážně z primárních zdrojů (mikroplasty z potřeb osobní hygieny, pracích prostředků) [33]. Téměř 80 % mořského odpadu je dnes tvořeno plasty a podle odhadů se do mořského prostředí každý rok dostane okolo osmi milionů tun plastů [2].

Mikroplasty byly ještě donedávna přehlíženým problémem. Zájem o toto téma vědci i veřejností začal růst až během posledních let proto, že byly nalezeny ve vodních ekosystémech po celém světě. Hodnocení jejich možného ekologického dopadu se tak stalo jednou z klíčových oblastí výzkumu [2, 3, 15]. Nyní jsou mikroplasty vnímány jako jedna z hlavních environmentálních hrozeb. Jsou všudypřítomné, persistentní a mají toxický potenciál [5]. V roce 2022 vědci poprvé objevili mikroplasty v čerstvě napadeném sněhu na Antarktidě a z 19 vzorků každý obsahoval drobné plastové částice. Nejčastěji vyskytujícím se plastem byl polyethylentereftalát (PET), který byl nalezen v 79 % vzorků [36]. Možný vliv mikroplastů na zdraví člověka začal být výrazně rozebírán v roce 2017, kdy se v médiích vyskytla zpráva s výsledky malé pilotní studie neziskové organizace Orb Media, která provedla testování několika vzorků pitné vody z různých částí světa. U většiny vzorků byly nalezeny částice mikroplastů v řádu jednotek na litr o velikosti od 2,5  $\mu\text{m}$  do cca 1 mm [33]. Potenciální škody, které mohou mikroplasty způsobit jsou různé, přes přímé účinky, způsobené jejich požitím nebo schopností sorpce toxických látek ze životního prostředí [2].



V suchozemských ekosystémech mohou mít mikroplasty negativní vliv na půdní biotu, klíčení semen a růst a produktivitu rostlin. U akvatického ekosystému výrazně ovlivňují živé organismy, hlavně mnohoštětinatce, korýše a zooplankton. Vlivem požití mikroplastů může docházet ke snížení příjmu potravy, zpomalení růstu, oxidačnímu stresu, abnormálnímu chování až úhynu. Mikroplasty jsou také schopny kvůli lipofilně adsorbovat různé toxické anorganické a organické sloučeniny (např. těžké kovy, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), polychlorované bifenylly (PCB), per-/poly-fluoroalkylové látky (PFAS)), které mohou následně uvolnit do okolí nebo v těle organismu po jeho konzumaci. Tato schopnost zvyšuje jejich toxické účinky, čímž se stává nebezpečnější pro biotu. Schopnost adsorpce je u starších mikroplastů vyšší než u těch nově vzniklých [34].

Dostupnost a transport mikroplastů je ovlivněna různými procesy jako je proudění vzduchu, tok vody, ale i pohyb lidí a zvířat mezi ekosystémy [2, 15]. Na jejich distribuci a mobilitu má výrazný vliv i jejich povaha a vlastnosti, např. hustota, tvar, schopnost adsorpce a velikost [2]. Plastové částice tak mohou plavat na vodní hladině, vznášet se v různých hloubkách vodního sloupce nebo se usazovat na mořském dně [34]. Větší plastové částice, které jsou dobře viditelné (makroplasty), mají negativní vliv na volně žijící organismy a rostliny – při jejich kontaktu může docházet k požití částic nebo zamotání se do nich a poranění organismu [15].



Obrázek 4: Zdroje, dopad a migrační cesty MP. Převzato z [34].

#### 2.4.1 Vliv mikroplastů na vodní ekosystém

Vliv mikroplastů ještě není zcela objasněn, ale během posledních několika let se objevuje stále více studií, které se snaží monitorovat přítomnost plastů v oceánech a jejich vliv na mořskou faunu a flóru [13]. Nedávno byly publikovány články o negativních účincích mikroplastů na mořský a sladkovodní ekosystém. Příčinou je jejich všudypřítomnost, perzistence, toxický potenciál, vysoká stabilita, difúze a malá velikost, která umožňuje přímý, anebo nepřímý příjem organismy na různých trofických úrovních jako jsou zooplankton, fytoplankton, ryby, mořští ptáci, kytovci, mořské želvy, ostnokožci a bezobratlí [2, 14].

K nepřímému vstupu dochází při konzumaci kontaminované potravy, zatímco u přímého dochází k neplánovanému pozření mikroplastů vyskytujících se volně v okolním prostředí, a to kvůli jejich velikosti a zbarvení, což může vést k záměně za kořist [2, 13]. Příjem mikroplastů mořskými organismy je ovlivněn několika faktory, jako je barva, náboj, hustota, tvar, množství a agregace těchto částic. Tvar mikroplastů například ovlivňuje dobu jejich přetrvávání po požití v těle organismu a následně jeho vylučování. Všeobecně mají částice nepravidelného tvaru oproti těm pravidelným toxičtější charakter. Je to kvůli náročnějšímu a déletrvajícimu vylučování z těl organismů. Barva výrazně ovlivňuje atraktivitu mikroplastů pro organismy, které si je poté pletou s potravou, například zelená plastová vlákna se podobají mořskému planktonu [13]. Mikroplasty se mohou akumulovat v živých organismech, kde může docházet k přímému fyzickému poškození a ucpaní vnitřních orgánů, což poté vede k hladovění, oslabení až následné smrti organismu [2, 14]. Může také nastat zánět a toxicita jater, patologický a oxidační stres, falešné nasycení a zablokovaná produkce enzymů. Ohledně požití mikroplastů je na tom nejhůře z mořských organismů plankton, který je zároveň potravou pro velkou část mořské fauny a flóry. Mikroplasty a na nich nasorbované kontaminanty tak mohou dál postupovat potravním řetězcem [13]. Mimo to byly zaznamenány i různé změny u organismů jako snížení dravosti způsobené falešným pocitem nasycení, který nastává po pozření plastových částic, anebo změny v metabolismu a endokrinních funkcích [2]. Akvatický ekosystém může být také ovlivněn tím, že na plastovém odpadu mohou vznikat nové biotopy – habitat, který dále může vytvářet bariéru, kvůli které se zatemňuje akvatické dno a dochází k omezení výměny plynů mezi ekosystémy [13].

Další rizikový faktor je složení plastu. Při výrobě se do plastové směsi přidávají různá aditiva pro zlepšení jejich vlastností – změkčovadla, stabilizátory, pigmenty, plniva a retardéry hoření. Aditiva často vykazují toxické nebo karcinogenní účinky. Příkladem jsou ftaláty či bisfenol A (BPA) používaný jako aditivum pro antioxidační vlastnosti [2, 14]. Tyto látky prokazatelně ovlivňují reprodukci vodních organismů. Podle Globálně harmonizovaného systému klasifikace a označování chemikálií (GHS) obsahuje více než polovina druhů plastů nebezpečné monomery a přísady, které se mohou z plastů vylučovat a dále se koncentrovat v daném prostředí [14].

Kromě výše uvedeného, může docházet i k sorpci jiných toxických látek přítomných ve vodním prostředí na mikroplasty. Mezi sorbované látky patří léčiva (antibiotika, farmaceuticky účinné látky (PhACs)), perzistentní organické polutanty (POPs), těžké kovy a polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) [2]. Tyto polutanty se jen velmi těžko odbourávají přirozenými pochody v životním prostředí. Jejich dalším problémem je to, že jsou špatně rozpustné ve vodě a dobře v tucích, což vede k jejich následnému uvolňování z mikroplastů s následnou možnou kumulací v živých organismech i v lidském těle [37].

## **2.5 Ekotoxikologie**

Ekotoxikologie je mezioborová vědní disciplína spojující poznatky z toxikologie a ekologie. Jejím cílem je vyvíjet metody, které mohou charakterizovat přímé i nepřímé působení škodlivých látek na bakterie, rostliny, živočichy a přírodní ekosystémy a jejich následky [38, 39]. Dále monitoruje transport a interakci kontaminantů s živými organismy v prostředí

a zaměřuje se na predikci rizik, prevenci a způsoby odstranění škodlivých látek z kontaminovaného životního prostředí [38].

Do životního prostředí se kvůli lidské činnosti dostává velké množství znečišťujících látek, které jsou škodlivé pro ekosystém. V životním prostředí dochází k transportu polutantů pomocí vody a proudění vzduchu i do velmi vzdálených míst, kde se daný polutant nikdy nevyskytoval. V půdě dochází k pomalému transportu nebo akumulaci polutantů. Cizorodé látky se v jednotlivých složkách prostředí účastní biochemických cyklů, kde může dojít k jejich transformaci na neutrální metabolity nebo přeměně na více toxické produkty. V organismech může docházet k bioakumulaci xenobiotik, které se dostanou k dalším organismům přes potravní řetězec. Tento proces vede ke změnám v populaci a ekosystému. Těmi může být vliv na reprodukci, mortalita, druhová diverzita a změny ve funkci ekosystému [38].

Bioakumulace je proces, při kterém se toxické látky akumulují v tělech organismů z okolního prostředí nebo konzumací kontaminované potravy a dochází k postupnému zvyšování koncentrace toxikantu v daném organismu oproti koncentraci v prostředí. Proces je ovlivněn různými biotickými a abiotickými faktory. Do biotických řadíme například druh organismu, jeho způsob života nebo druh a kvantita přijímané potravy. Do abiotických dále stupeň hydrofobicity látek, čas a způsob kontaminace, velikost částic a množství organického uhlíku v sedimentu. Biokoncentrace je proces, při kterém dochází ke zvyšování koncentrace cizorodých látek v těle organismu pouze přímým působením prostředí, ve kterém se nachází. Je tedy ovlivněna koncentrací toxikantu v ekosystému a chemickou povahou látky. Bioobohacování je následek biokoncentrace a bioakumulace, vede ke zvýšení koncentrace toxikantů v organismech s přenosem přes dvě a více trofických úrovní. Čím vyšší má organismus pozici ve stupnici potravní pyramidy, tím pravděpodobněji nalezneme vyšší koncentraci polutantů v jeho biomase [40].

Toxicita nebo také škodlivost je vlastnost dané látky, která při určité koncentraci vyvolá nepříznivý účinek na organismus. Látka může být toxická pro některé organismy a pro jiné naopak. To, zda tomu tak je určuje její dávka. Velké množství látek může mít při nízké dávce pozitivní vliv na organismus, ale při vyšší dávce už tomu tak není [38]. Toxicitu dělíme podle jejího projevu na letální (dochází k úhynu organismu), subletální (vede k ovlivnění životních funkcí), mutagenní, neurotoxickou, hemotoxickou a jiné. Toxický účinek se dále dělí na okamžitý (akutní), který nastane při jednorázové aplikaci a jeho míra se odvíjí od dávky – čím je vyšší jednorázová dávka toxikantu, tím je větší poškození jedince nebo skupiny organismů [40]. V případě dlouhodobé a opakované aplikace malých dávek se jedná o chronickou toxicitu [38]. Mezi chronické účinky se řadí mutageneze nebo genotoxicita, u které se mohou následky projevit až na dalších generacích, například na plodnosti nebo degeneraci potomků [40].

Ekotoxicita je podle legislativy České republiky definována ve vyhlášce č. 94/2016 Sb., o odpadech, jako nebezpečná vlastnost odpadu H14. Stanovuje se pomocí sady ekotoxikologických testů na organismech. Mezi tyto základní organismy patří hrotnatka velká (*Daphnia magna*), salát (*Lactuca sativa*), řasy (*Desmodesmus subspicatus*), bakterie (*Vibrio*

*fischeri*) a ryby, například živorodka duhová (*Poecilia reticulata*) nebo dánío pruhované (*Brachydanio rerio*). Testování toxicity probíhá u těchto organismů ve vodném roztoku nebo výluhu zkoumané látky. Při negativní odezvě alespoň jednoho z testovaných organismů je testovaná látka hodnocena jako ekotoxicky pozitivní [39, 41, 42].

Získaná věrohodná a potvrzená data z ekotoxikologických výzkumů je nutné převést do legislativní formy, kde se stanoví limity a vytvoří se normy. Celý tento proces je složitý a časově náročný a v průběhu času dochází k neustálým úpravám, nejčastěji k zpřísnování limitů. Tyto legislativní limity jsou závazné a při překročení právně postižitelné. V rámcové směrnici EU o vodě (nařízení 2000/60/EC) jsou stanoveny dva typy limitů, a to maximální (jednorázová) přípustná koncentrace a průměrná roční hodnota [43]. Jednou z organizací poskytující normy je mezinárodní organizace pro normalizaci – ISO (International Standardization Organization) poskytující standardizované metodiky a normy ve všech oblastech normalizace [44]. Standardizované ISO normy jsou mezinárodně dohodnuté a schválené mezi odborníky v daném oboru.

Pro kontrolu chemických látek v Evropě se zavádí nové a lepší systémy evidence a hodnocení průmyslových chemických látek v rámci EU [43]. V roce 2007 vstoupila v platnost legislativa REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals), což je nařízení Evropské unie, které cílí na zlepšení ochrany lidského zdraví a životního prostředí ve spojitosti s riziky, která mohou nastat u chemických látek. Zároveň má za cíl vytvářet lepší konkurenceschopnost chemického průmyslu EU. Nařízení REACH předepisuje postupy shromažďování a vyhodnocování informací o vlastnostech a nebezpečnosti chemických látek. Vztahuje se na všechny chemické látky, ať už využívané v běžném životě nebo v průmyslových procesech. Společnosti, které vyrábí a uvádí chemické látky na trh, musí splňovat ustanovená nařízení a musí stanovit rizika s nimi spojená, ke kterým musí zavést důsledná opatření. U nebezpečných látek dochází k omezení použití a je snaha o jejich nahrazení bezpečnějšími látkami [45].

Ekotoxikologické indexy jsou veličiny, které kvantitativně vystihují účinky látek působících na organismy v různých složkách prostředí (půda, voda, vzduch). Podle těchto indexů je možné vzájemné porovnávání toxicity chemických látek. Jejich cílem je určení míry toxicity dané látky a její přiřazení do souboru tříd nebezpečnosti [40]. Jako hlavní ekotoxikologický index se určuje dávka toxikantu, která již ovlivní organismus a vyvolá účinek u sledovaných parametrů jako je například inhibice růstu, mortalita, změna v chování, imobilizace a změny v aktivitě rozmnožování [39]. Dělíme je na indexy vypočtené a určené. Vypočtené byly získané interpolační metodou z experimentálně zjištěných dat a řadí se sem hodnoty jako LD (letální dávka), LC (letální koncentrace), EC (účinná koncentrace) a IC (inhibiční koncentrace) [40]. V ekotoxikologii se nejčastěji používá index efektivní koncentrace EC50, který udává koncentraci testované látky, při které dochází k vyvolání účinku u 50 % testovacích organismů. Tedy čím nižší je vypočtená hodnota EC50, tím vyšší je toxicita testované látky [39]. Určené indexy jsou takové, u kterých byly koncentrace látek bezprostředně v experimentu testovány a následně ověřeny statickým srovnáním s kontrolou. Nejvíce využívané jsou indexy NOEC a LOEC. NOEC (No observed effect concentration) značí nejvyšší koncentraci testované látky,

kteřá ještě nevyvolala staticky významný vliv na organismy oproti kontrole. LOEC (Lowest observed effect concentration) je naopak nejnižší testovaná koncentrace látky, při které byl staticky významný efekt v porovnání s kontrolou zaznamenán [40].

### **2.5.1 Faktory ovlivňující toxicitu látek**

Toxicita látek je ovlivněna řadou různých faktorů, od kterých se odvíjí vliv expozice a účinek toxické látky. Účinnost toxicity je obecně dána faktory jako je koncentrace a charakter toxikantu v prostředí, ve kterém se vyskytuje organismus. Dále mají vliv jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, biodostupnost a následné působení toxické látky v organismu. Všeobecně je míra toxicity ovlivněna vztahem mezi toxikantem, organismem a životním prostředím [40, 46].

Fyzikálně-chemické faktory mají vliv na transport látek v prostředí a dostupnost látky při kontaktu s živými organismy, jejich distribuci uvnitř organismu s případným následným vyloučením z těla ven. Nejdůležitější faktor, který ovlivňuje sílu působení toxické látky je koncentrace látky v prostředí a v organismu. Dalším důležitým faktorem je rozpustnost látky ve vodě nebo v tucích. Díky této vlastnosti lze odhadnout chování toxikantu v metabolismu, jeho možnou kumulaci v organismu a případné vyloučení z těla. U látek, které jsou dobře rozpustné ve vodě (hydrofilní), dochází k rychlé distribuci v těle s rychlým nástupem toxického účinku. Tyto látky jsou ale snadno vylučitelné z těla organismu. U látek lipofilních je tomu naopak, protože u nich dochází k ukládání v tucích, kde jsou silně vázány. Vstřebávání i vylučování je výrazně pomalejší a může docházet k bioakumulaci. Mezi další faktory patří struktura látky, perzistence, doba a způsob expozice [40].

Mezi environmentální faktory řadíme podmínky prostředí, ve kterém se toxická látka a organismus vyskytuje. Těmito faktory jsou teplota a vlhkost prostředí, případně intenzita světla. Mohou ovlivnit vstřebávání a degradaci toxických látek v prostředí, anebo mohou ovlivnit míru jejich účinku. Nepřímo mohou toxicitu ovlivňovat i tzv. stresové faktory, mezi které patří např. hluk [40].

Míra toxického působení se odvíjí i od druhu a taxonomického zařazení organismu, který se dostal do kontaktu s toxickou látkou – biologické faktory. Určitý toxikant bude jinak působit na hmyz, plazy nebo savce. Ve skupině jedinců stejného druhu také nenastane stejný toxický účinek. Každý jedinec je totiž ovlivněn faktory jako je jeho genetická variabilita, stáří, pohlaví a zdravotní stav [40].

### **2.5.2 Ekotoxikologické biotesty**

Ekotoxikologické biotesty jsou experimenty, které probíhají na živých organismech ve snaze zjistit, zda má testovaná látka negativní účinek v konkrétním ekosystému a v jaké koncentraci je toho docíleno [40]. Poskytují poměrně rychlé, nenáročné a dostatečné zhodnocení testované látky [46]. Testy probíhají za přesně definovaných podmínek a výstupem je reakce testovaného organismu [40].

Cílem biotestů je predikce nebo stanovení environmentálního dopadu testované látky na životní prostředí. Toxická látka může organismus ovlivňovat dvěma způsoby v závislosti na koncentraci. Určitá koncentrace může vést ke stimulaci růstu nebo reprodukční aktivity

organismu (hormeze) nebo naopak může způsobit jeho inhibici až případnou smrt. Obě varianty mohou být nežádoucí [40].

Toxicita se může projevovat na různých úrovních od molekuly až po ekosystém a její rozlišení bývá často velmi komplikované, protože velké procento organismů žije ve vzájemně propojeném společenstvu v daném ekosystému, kde se vzájemně ovlivňují [40]. Testování probíhá na třech úrovních – testy na úrovni buněk a tkání, testy na úrovni organismů, a nakonec testy na úrovni biocenóz, kde se sleduje toxicita látky v přírodním prostředí nebo na modelu [46]. Ekotoxikologické testy je možné členit do několika skupin dle různých parametrů, například podle doby expozice na akutní (krátkodobé), semiakutní a chronické (dlouhodobé) testy [40]. Akutní testy se řadí mezi nejrozšířenější standardní laboratorní testy a jejich délka trvání je v řádu hodin až dnů (24–96 hodin). Jsou sledovány účinky na organismu při jednorázovém podání testované látky. U krátkodobé expozice jsou předpokládány dva scénáře účinku podle velikosti dávky testované látky. U nízké dávky může nastat stav bez účinku nebo velmi mírný pokles vitality s rychlou regenerací testovaného organismu. Při vysoké dávce mohou nastat dva stavy. Buď dojde jen ke snížení vitality a po skončení testování nastane postupná regenerace organismu, nebo se dostaví akutní otrava, která následně způsobí smrt organismu [43].

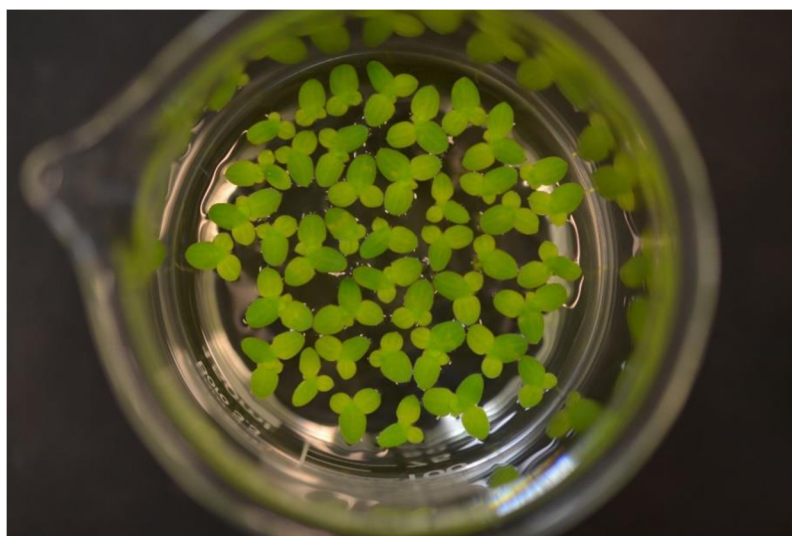
Chronické testy jsou vyznačovány expozicí po celou délku života organismu. Tyto organismy jsou pravidelně v určitém stanoveném intervalu vystavovány testované látce. U nízké dávky při dlouhodobé expozici může nastat adaptace organismu, která se odvíjí od toho, jestli je organismus schopen daný toxikant imobilizovat nebo vyloučit z těla ven nebo může dojít k chronické otravě, kdy organismus není schopen účinně vylučovat toxikant z těla a s dlouhodobou expozicí dochází k překročení limitní hodnoty s následnou smrtí organismu. Při vysoké dávce s dlouhou expozicí je předpokládáno vážné poškození organismu končící úhynem. Chronické testy nám poskytují data o dlouhodobém působení látky na testovaný organismus, které jsou použity pro stanovení hodnot NOEC a LOEC [43].

Dalším významným parametrem je pokročilost designu testovacího systému. Dle toho se testy dělí na testy 1. generace, do kterých patří klasické (standardní, konvenční) testy s intaktními organismy, testy 2. generace tzv. mikrobiotesty (alternativní testy toxicity), testy 3. generace (biosenzory, biosondy a biomarkery) a testy 4. generace, což jsou on-line systémy včasného varování s dálkovým přenosem dat z biotestů [43, 44]. Dále se dělí podle cílového ekosystému (sedimenty, půdní, mořský a sladkovodní), trofické úrovně testovacích organismů (testy s producenty, konzumenty a destruenty), testované matrice (půda, sediment, odpad, chemická látka, voda a vzduch), složitosti testovaného vzorku (směsi látek, přírodní vzorky a nebo čisté chemické látky), způsobu přípravy vzorku (přímé testování environmentálních matric – kontaminovaná půda, sedimenty, definované koncentrace chemických látek, testování výluhů nebo extraktů přírodních vzorků, odpadní vody), počtu testovacích organismů (jednodruhové a vícedruhové s přírodními společenstvy nebo laboratorními směsmi druhů), stupně komplexnosti detekčního systému (enzymy, biosondy, buněčné a tkáňové kultury, intaktní organismus, populace a společenstvo), sledované odpovědi (reprodukční aktivita, letální či subletální účinky a hodnocení fyziologické aktivity) [40].

Biotesty ve vodním prostředí se řadí mezi nejpoužívanější metodiky testování ekotoxicity [40]. U vodních organismů dochází k častému kontaktu s přírodními a antropogenními stresory, mezi které můžeme například zařadit přítomnost kontaminantů, změnu teploty, dostupnost potravy a hladinu kyslíku [47].

### 2.5.2.1 *Lemna minor*

*Lemna minor* neboli okřehek menší se řadí mezi nejběžnější a nejrozšířenější volně plovoucí krytosemennou jednoděložnou rostlinu čeledě okřehekovitých (*Lemnaceae*), vyskytující se v široké škále prostředí a na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy [40, 48]. Je to drobná vodní plovoucí rostlina s plochou stélkou, ze které vyrůstá pouze jeden nevětvený kořen (viz Obrázek 5). Tato rostlina na vodních plochách stojatých až mírně tekoucích vod tvoří rozsáhlé kolonie [40]. Kvetení je poměrně vzácné, a proto je rozmnožování u této rostliny vegetativní a klonální, kdy ze spodní strany mateřské lodyhy vyrůstají dceřiné listy. Tento způsob rozmnožování vede k velmi krátké generační době, pokud jsou dodány vhodné podmínky vnějšího prostředí [48]. Okřehek menší patří mezi primární producenty, slouží převážně jako zdroj potravy pro ryby, vodní ptactvo a malé živočichy a také tvoří útočiště pro širokou škálu malých bezobratlých organismů [49]. Jeho kolonie vytváří za příznivých podmínek kompaktní plochy, přes které nedochází k propouštění světla, což vede k úniku asimilačního kyslíku do vzduchu. To má za následek snížení jakosti vody pod kolonií [40]. Díky jeho fyziologickým a morfologickým vlastnostem a rychlému rozmnožování je okřehek menší vhodný modelový laboratorní organismus pro vyšší vodní rostliny. V ekotoxikologii se využívá jako bioindikátor pro testování fytotoxicity různých druhů polutantů, těžkých kovů a nanomateriálů v testech *in vivo* a *in vitro* [50, 51].



Obrázek 5: Okřehek menší (*Lemna minor*).

Testování probíhá podle normy ČSN EN ISO 20079 Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) – Zkouška inhibice růstu okřehek [49].

### 2.5.3 Ekotoxikologické testy s mikroplasty

Ekotoxikologické studie většinou probíhají s konvenčními mikroplasty a studují jejich vliv na akvatické organismy. Mezi testované plasty se řadí například polyethylentereftalát (PET), polyethylen (PE), polyvinylchlorid (PVC), polystyren (PS), nebo polyuretan (PUR). Mezi nejčastěji využívaný testovací vodní organismus patří planktonní korýš *Daphnia magna* z řádu perlooček. Protože se řadí mezi základní složku potravy ryb, je významnou složkou vodní biocenózy [40].

Studií vlivu mikroplastů na vodní ekosystém nebylo zatím provedeno mnoho, např. Eltemsah a Bøhn zkoumali distribuci a účinky 6  $\mu\text{m}$  částic mikroplastů z polystyrenu na organismus *D. magna*. Pro test byla vybrána 2 stádia, a to 24 hodin stará mláďata a 9 dní staří jedinci. Pro akutní toxicitu byla zvolena koncentrace 0–300 mg/L po dobu 120 hodin a u chronické toxicity 0–100 mg/l po dobu 75–77 dní. U akutního testu po uplynutí 48 hodin nebyla zaznamenána akutní toxicita, ale po 120hodinové expozici byla zjištěna zvýšená mortalita. U chronického testu byla sledována mírně zvýšená mortalita, snížený růst a stimulace rané reprodukce na úkor reprodukce pozdější. Také byla zaznamenána mechanická interakce a interference mikroplastu s organismem při krmení, trávení a také změnou chování [52]. Dále de Felice a kol., studovali účinky polystyrenových mikroplastů (1 a 10  $\mu\text{m}$ ) v koncentracích (0,125, 1,25 a 12,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Zjistili, že tyto částice mohou ovlivnit behaviorální vlastnosti testovaného organismu *D. magna*. Při testování bylo zaznamenáno u nejvyšší koncentrace zvětšení těla a zvýšená aktivita organismu s významným nárůstem průměrného počtu potomků [53]. PS mikroplasty (<63  $\mu\text{m}$ ) studovali také Schür a kol., kteří také potvrdili toxicitu mikroplastů při vícegeneračním testování. Pro test využily nepravidelné sekundární polyesterové mikroplasty (400, 2 000 a 10 000 částic/ml) a kaolin po dobu čtyř generací v podmínkách s omezením potravy, zabývali se vlivem těchto částic na organismus *D. magna*. U koncentrace 10 000 částic/ml došlo během 21 dní téměř k jejich vyhynutí. U koncentrace 2 000 částic/ml nastal ve druhé a třetí generaci výrazný pokles přeživších jedinců, a to na 55 % a následně 35 %. Při čtvrté generaci byla 100% úmrtnost. Byl také zaznamenán vliv na jejich snížený růst a reprodukci. Expozice kaolinu při podobných koncentracích na rozdíl od MP nevyvolala negativní účinky [54].

Dalším často testovaným organismem jsou řasy, u kterých byly rovněž pozorovány negativní účinky mikroplastů na růst a změny v obsahu chlorofylu *a* a *b* a také možné změny v biochemickém složení buněk. U konvenčních plastů byly například testovány mikročástice PE, PP a PVC na řasu *Acutodesmus obliquus*, dále částice PE, PP, PS, PVC a PET na řasu *Chlorella* sp. a PP a PVC na *Ch. pyrenoidosa* a *Microcystis flos-aquae* [55–57].

S příchodem biodegradabilních plastů se začaly zkoumat i tyto materiály, přesněji mikročástice a také jejich možný dopad na organismy v životním prostředí. Například Su a kol., se zaměřili na porovnání negativního vlivu konvenčních (polyethylen (PE), polyamid (PA)) a biodegradabilních (kyselina polymléčná (PLA) a polybutylensukcinát (PBS)) mikroplastů na řasu *Chlorella vulgaris*. Podle výsledků oba druhy mikroplastů inhibují růst řas ve srovnání s kontrolou. Mikročástice PLA vykazovaly nejsilnější inhibiční účinek na růst této řasy, a to o 47,95 %. Skoro totožné inhibice dosáhly i mikročástice PE, a to o 47,24 % [58].



González-Pleiter a kol., se pro změnu zabývali vlivem sekundárních nanoplastů PHB získaných abiotickou degradací z mikroplastů PHB na 3 reprezentativní organismy, a to primární producenty jako je sinice *Anabaena sp.*, zelená řasa *Chlamydomonas reinhardtii* a primární konzument *D. magna*. U všech testovaných subjektů nastalo výrazné snížení buněčného růstu a došlo ke změně fyziologických parametrů. U *Anabaena* a *C. reinhardtii* došlo ke snížení růstu o 90 až 95 % a u *D. magna* byla pozorována výrazná imobilizace (85 %). Následně bylo zkoumáno, zdali zmíněnou toxicitu způsobují přímo tyto nanoplasty či jiné látky vznikající při abiotické degradaci PHB mikroplastů. Zde nebyly pozorovány žádné výrazné toxické účinky na organismech. Mírný efekt nastal jen u růstu sinic. Z výsledku je patrné, že za pozorovanou toxicitu pravděpodobně mohou samotné PHB nanočástice a vylučuje se tím přítomnost dalších toxických přísad. Z dosažených výsledků bylo patrné, že sekundární nanočástice PHB vzniklé při abiotické degradaci PHB mikroplastů mohou být pro akvatické organismy škodlivé. U všech testovaných subjektů nastalo výrazné snížení buněčného růstu a došlo ke změně fyziologických parametrů [59].

Interakce mikroplastů s vodními cévnatými rostlinami nebyla zatím téměř zkoumána i přes to, že jsou důležitou součástí ekosystému. Hustota mikroplastů má výrazný vliv na jejich rozložení ve vodním ekosystému. Mikročástice jsou buď lehčí než voda, a tak se mohou vznášet se na vodní hladině (PE, PP, EPS), anebo jsou těžší než voda a při vstupu do vodního prostředí začnou klesat ke dnu (PS, PET, PVC). Pokud se vznáší, tak dochází k jejich interakci s plovoucími vodními rostlinami a může následně nastat sorpce na jejich listy a kořeny [60]. Mezi nejčastěji testované mikroplasty na vodní rostlině *Lemna minor* patří PE, PET, PS, bakelit a směs butadienové a styren-butadienové gumy (materiál pro výrobu pneumatik).

Kalčíková a kol., zkoumali vliv polyethylenových mikroperliček z kosmetických výrobků na vodní rostlinu *L. minor*. Zároveň byly pro testování připraveny i vodné výluhy z těchto PE mikroplastů, aby mohl být vyloučen podíl kosmetických složek na měřených parametrech. Koncentrace mikrokuliček v experimentu byly 0, 10, 50, a 100 mg/L a doba expozice byla 7 dní. Z dosažených výsledků bylo zjištěno, že specifická rychlost růstu listů a obsah fotosyntetických pigmentů (chlorofylu *a* a *b*) v listech nebyla PE mikročásticemi ovlivněna. Výrazná změna nastala u růstu kořenů, které byly ovlivněny mechanickým blokováním těchto mikroplastů. Také byl zaznamenán vliv ostrých částic PE na snížení viability kořenových buněk. U mikročástic s hladkým povrchem byl tento vliv zanedbatelný [61].

Mateos-Cárdenas a kol., testovali mikroplasty o velikosti 10-45  $\mu\text{m}$  z polyethylenu (koncentrace 50 000 částic/ml) a přišli na to, že se tyto částice mohou silně adsorbovat na povrch vodní rostliny *L. minor*, a to až 7 mikroplastů na  $\text{mm}^2$ . *L. minor* je tak potenciálním vektorem pro trofický přenos mikroplastů. Z výsledných dat bylo dále patrné, že účinnost fotosyntézy a růst rostlin nejsou mikroplasty ovlivněny. Dále pozorovali sladkovodního blešivce *Gammarus duebeni*, který přijímal jako potravu mikroplasty kontaminovaný *L. minor*. Po expozici 24 a 48 hodin nebyl zjištěn žádný zjevný vliv na pohyblivost nebo úmrtnost organismu [62].

Rozman a kol., se zaměřili na komplexní studium šesti různých typů mikroplastů, které měly simulovat běžné mikroplasty vyskytující se v životním prostředí. Koncentrace všech mikroplastů byla 100 mg/l. Ve studii byl zkoumán vliv těchto částic a také jejich výluhů na *L. minor* a bylo zjištěno, že žádný z těchto mikroplastů nemá vliv na specifickou rychlost růstu a obsah chlorofylu v listech. Naopak ostré mikroplasty s drsným povrchem zavinily výrazné snížení růstu kořenů. U mikroplastů z bakelitu bylo zaznamenáno jejich intenzivní vyluhování, což zvyšuje jejich ekotoxikologický potenciál [63].

### 3 CÍL PRÁCE

Biodegradabilní bioplasty představují v současné době ekologičtější alternativu za konvenční plasty a své uplatnění nachází například v průmyslu obalových materiálů, zemědělství anebo v medicíně. Předpokládá se, že v ekosystému dochází k jejich poměrně rychlému odbourání a rozložení přítomnými organismy, čímž by se omezilo hromadění a znečišťování životního prostředí plasty. Zároveň jsou biodegradabilní bioplasty považovány za neškodné a netoxické pro přítomnou biotu. Avšak v reálných podmínkách může být biodegradace negativně ovlivněna okolními vlivy, jako je například teplota, pH či přítomnost mikroorganismů. Proces tak může být poměrně zdlouhavý za vzniku sekundárních mikroskopických částic – mikrobioplastů, které mohou následně setrvávat v prostředí a jejich přítomnost může mít nepříznivý vliv na přítomné organismy a rostliny [4, 5]. Důvodem vzniku této práce je to, že prozatím existuje jen velmi málo studií zabývajících se vlivem P3HB na vodní organismy a akvatické ekosystémy, a i přes jeho biodegradabilní potenciál a údajnou nezávadnost není prozatím jisté, jak může ovlivnit životní prostředí v dlouhodobém časovém měřítku.

Cílem této bakalářské práce je posoudit možný ekotoxikologický vliv biodegradabilních mikroplastů na vývoj a růst vodní rostliny *Lemna minor*. Jako modelový biodegradabilní polymer byl zvolen poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB), který patří do skupiny biodegradabilních polymerů polyhydroxyalkanoátů. Pro ekotoxikologické testování v této práci byly vybrány dvě velikostní frakce <63  $\mu\text{m}$  a 63 až 125  $\mu\text{m}$  částic P3HB v koncentracích 10, 50 a 100 mg/L oproti kontrole, na kterou bylo použito čisté Steinbergovo médium. Pro studium těchto mikroplastů bylo vybráno několik přístupů, a to vliv suspenze, výměny suspenze v průběhu testu, přímého navázení P3HB a jeho výluh. Všechny tyto přístupy byly prováděny za kontrolovaných podmínek. Po ukončení tohoto ekotoxikologického testu byly zaznamenány endpointy o hmotnosti a délce kořene, vlivu na růst rostliny a množství fotosyntetického pigmentu (chlorofyl *a* a *b*, karotenoidy). Dále byl proveden pro porovnání výsledků experiment s konvenčními PET mikroplasty, který probíhal za stejných podmínek a ve stejných frakcích a koncentracích. Na závěr proběhla série sorpčních experimentů na P3HB i PET a test se snižováním nutrientů.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Příprava PHB a PET

Pro ekotoxikologické testy byly použity mikročástice kulovitého tvaru P3HB (ENMAT Y3000), které byly dodané od TianAn Biologic Materials Co., Ltd. (Ningbo City, China). Připravená suspenze PHB v MilliQ vodě byla za mokra přesítována přes síta s velikostí ok 125  $\mu\text{m}$  a 63  $\mu\text{m}$ . Tímto způsobem získané frakce byly sušeny v digestoři za laboratorní teploty.

Pro porovnávací ekotoxikologické testy s rostlinou *Lemna minor* byly použity nepravidelné mikročástice polyethylentereftalátu (PET). Ty byly získány jako zbytkový materiál z mechanické recyklace z firmy PETKA CZ a.s. (Brno, Česká republika). Mikročástice PET byly několikrát přečištěné pomocí vody a poté byly také přesítovány přes síta s velikostí ok 63 a 125  $\mu\text{m}$ .

### 4.2 Příprava kultivačního média

Pro kultivaci rostliny *L. minor* bylo použito modifikované Steinbergovo médium (ISO 20079 2005). Toto médium bylo připraveno z předem připravených zásobních roztoků podle zmíněné normy [49]. Pro odběr požadovaného množství makrosložek byl použit odměrný válec s objemem 100 ml a pro odběr mikrosložek byla použita automatická pipeta na 1 ml. Odměřené roztoky byly postupně přidávány do skleněné odměrné baňky o objemu 1 000 ml, která byla poté doplněna destilovanou vodou po rysku.

### 4.3 Test toxicity na organismu *Lemna minor*

Pro laboratorní testování toxicity byly využity rostliny okřehku menšího (*L. minor*) z čeledi *Araceae*. K tomuto účelu byly použity rostliny z laboratorní kultury na Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí (Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, ČR). Kultivace zde probíhá ve Steinbergově médiu (ISO 20079 2005) při stanovených podmínkách (teplota  $23 \pm 2$  °C, fotoperioda 16/8 h) [49].

Použité mikročástice P3HB v testovaném médiu klesaly ke dnu kvůli jejich hustotě, která je 1,23  $\text{g}/\text{cm}^3$ . Z toho důvodu bylo potřeba kombinovat několik různých přístupů, jak dostat částice P3HB do kontaktu s rostlinou *L. minor* při ekotoxikologickém testu. Pro toto testování byl vybrán vliv a) suspenze (bez výměny), b) s výměnou suspenze během testu, c) výluh a d) přímé navážení, u kterého některé nedostatečně smočené částice P3HB zůstávají plavat na hladině vlivem povrchového napětí. Tímto způsobem mohou být v kontaktu s listovou částí *L. minor*. U všech zmíněných přístupů proběhlo testování s oběma velikostními frakcemi P3HB. Test s mikročásticemi PET byl proveden stejným způsobem a za stejných podmínek jako s mikročásticemi P3HB v suspenzi.

V případě a) suspenze byly všechny vzorky připraveny navážením potřebného množství P3HB, který byl kvantitativně převeden do odměrné baňky. Ta byla následně doplněna Steinbergovým médiem po rysku. Připravené suspenze byly umístěny pro lepší homogenizaci a rozptýlení všech částic na 10 minut do ultrazvukové lázně. Při b) výměně suspenze byla příprava stejná. Suspenze byla v tomto případě měněna v průběhu testu za nově připravenou během testu dvakrát. U c) výluhu byla nejprve připravena suspenze P3HB ve Steinbergově

médiu, která byla poté inkubována po dobu 7 dní za stejných podmínek, jako probíhal test s *L. minor*. Po uplynutí stanoveného času bylo médium přefiltrováno na filtru o velikosti pórů 0,8  $\mu\text{m}$ . Při d) přímém navážení bylo potřebné množství mikročastic P3HB pro každou testovací nádobu naváženo zvlášť. Mikročástice byly následně přeneseny přímo do testovací nádoby.

Testování vlivu mikročastic P3HB probíhalo ve 150 ml skleněných kádinkách. Každá z nich byla naplněna 100 ml připravené testované suspenze, výluhu, nebo čistého média, které sloužilo jako kontrola. Koncentrace mikročastic kulovitého tvaru P3HB byla 0, 10, 50 a 100 mg/L, to dle distribuce částic odpovídá  $3,20 \cdot 10^{13}$  částic v 1 g pro frakci  $<63 \mu\text{m}$  a  $2,39 \cdot 10^{13}$  částic v 1 g pro frakci  $<125 \mu\text{m}$ . Tato koncentrace byla použita i u mikročastic PET, které byly nepravidelného tvaru. Koncentrační rozmezí bylo vybráno podle již dříve zmíněné studie Kalčíkové a kol., kde testovali toxicitu mikroplastů na *L. minor* [61]. Každý experiment zahrnoval 3 opakování o stejných expozičních koncentracích a byl opakován třikrát. Do každé kádinky bylo vybráno 9 listů rostliny tak, aby více než 50 % plochy povrchu bylo k dispozici pro růst rostliny. Před vložením byly rostlinám opatrně odstraněny kořeny. Po nasazení testu byly kádinky zakryty tak, aby nedocházelo k odpařování média a přeneseny na místo s vhodnými podmínkami pro testování. Experiment byl proveden za teploty  $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  s nastavenou fotoperiodou 16/8 h (světlo/tma) a za světelné intenzity 4300 lux na úrovni rostlin. Rostlina byla těmito podmínkám vystavena po celou dobu experimentu, a to tedy sedm dní.

#### 4.3.1 Stanovení počtu stélek

Všechny nasazené vzorky byly po týdnu přeneseny na dobře osvětlené místo, kde došlo k pořízení fotografií z vrchního pohledu. Tyto fotografie byly využity při pozdějším počítání jednotlivých listů v každém vzorku. Získaná data o počtu listů byla dále využita při vyhodnocení rychlosti růstu/inhibice růstu. Výpočet byl proveden podle normy (ISO 20079 2005) [49].

#### 4.3.2 Měření délky kořene

Náhodným výběrem bylo přeneseno 5 rostlin *L. minor* na zalaminovaný milimetrový papír, který byl položen na osvětlené desce. U každého sledovaného vzorku byla pořízena fotografie fotoaparátem Nikon D3100 a objektivem AF-S Micro NIKKOR 40 mm 1:2.8 G (Nikon, Japan) (Obrázek 6). Délka kořenů byla poté vyhodnocena pomocí programu ImageJ.



Obrázek 6: Délka kořenů u kontroly a nejvyšší koncentrace P3HB (výluh).

### 4.3.3 Stanovení čerstvé a suché biomasy

Rostliny *L. minor* byly opatrně přeneseny na filtrační papír, kde byly osušeny tak, aby nedošlo k jejich poškození. Poté byl vzorek přenesen na předem zváženou skleněnou lodičku a byla stanovena jeho váha na analytických váhách. Hmotnost byla zaznamenána. Po odebrání 30 mg pro další stanovení byl zbylý vzorek přenesen na předem vysušený a zvážený filtrační papír a sušen v sušárně při 80 °C do konstantní hmotnosti (kolem 48 h).

### 4.3.4 Stanovení fotosyntetických pigmentů

Modifikovanou metodou dle Arnona byly stanovovány fotosyntetické pigmenty (n=9) – chlorofyl *a* a *b*, a celkový obsah karotenoidů. Tuto metodu popsali Radić a Pevalek-Kozlina [64]. Předem navážených přibližně 30 mg rostliny *L. minor* z každého vzorku bylo rozetřeno v třecí misce s 1 ml ledového 80% acetonu a špetkou uhličitanu hořečnatého, který byl použit pro lepší homogenizaci. Připravený extrakt byl převeden do 10 ml odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou. Po extrakci byly vzorky odstředěny při 5 000 rpm po dobu 3 minut a následně bylo změřeno absorpční spektrum supernatantu při 470, 646,8 a 663,2 nm na přístroji Specord 40 proti 80% acetonu.

## 4.4 Sorpční experiment

U obou velikostních frakcí (63  $\mu\text{m}$  a 125  $\mu\text{m}$ ), ve stejných koncentracích (0, 10, 50 a 100 mg/L) a za stejných podmínek jako při testu s rostlinou *L. minor* proběhla inkubace mikročástic P3HB a PET ve Steinbergově médiu po dobu 168 h. V čase 0, 24, 96 a 168 h proběhl odběr vzorku média, který byl následně přefiltrován přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . U těchto přefiltrovaných vzorků byla poté stanovena spektrofotometrickou metodou koncentrace dusičnanového dusíku. Ke stanovení byla použita komerční sada (Spectroquant®, Millipore, 109713).

### 4.4.1 Test s menší koncentrací živin

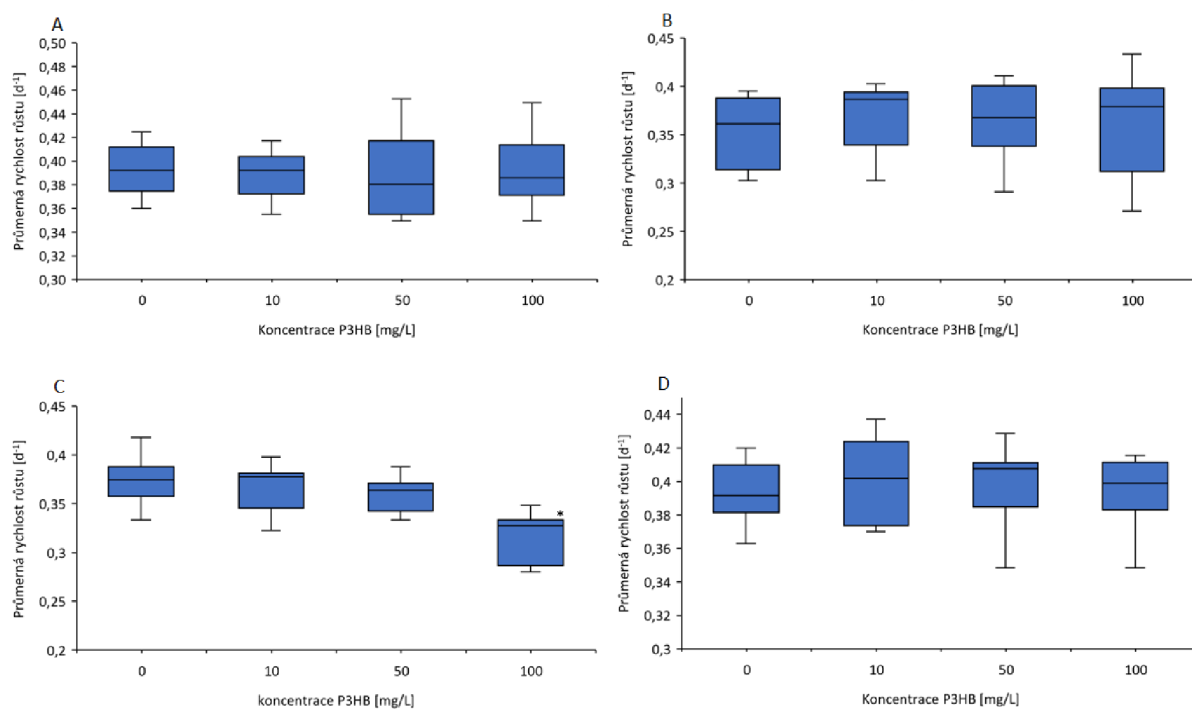
Na základě dosažených výsledků při sorpčním experimentu byl pro porovnání proveden test s menší koncentrací živin. Experiment proběhl za stejných podmínek jako při testech s mikročásticemi P3HB a PET. Rostlina *L. minor* byla inkubována v připraveném Steinbergově médiu, u kterého došlo při každé sadě k postupnému snížení živin a to o 5 %, 10 %, 20 %, 30 % a 40 % oproti kontrole.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

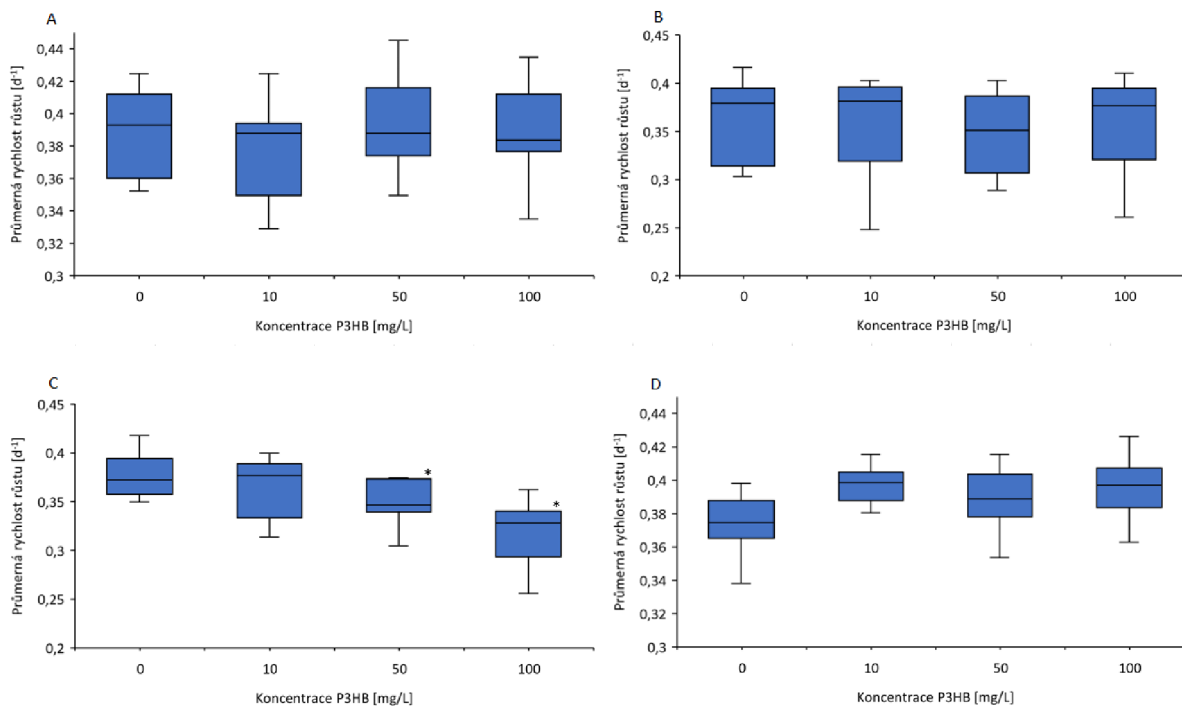
### 5.1 Vliv na rychlost růstu a hmotnost biomasy

Z dosažených výsledků testů s vodní rostlinou *L. minor* je patrné, že při sedmidenní expozici mikročástic P3HB (<63  $\mu\text{m}$  a 63 až 125  $\mu\text{m}$ ) v a) suspenzi (bez výměny), b) s výměnou suspenze každé dva dny během testu a d) při přímém navážení částic P3HB do kádinek nedochází k významnému ovlivnění rychlosti růstu listů. U obou velikostních frakcí ve všech testovaných koncentracích 10, 50 a 100 mg/L byla pozorována inhibice, případně stimulace růstu menší než 10 % oproti kontrole. U testování částic <63  $\mu\text{m}$  byla zjištěna inhibice/stimulace růstu oproti kontrole, a to 0,65 %, 0,61 %, -0,46 % pro a) suspenzi, -5,28 %, -3,76 % a -2,96 % pro b) výměnu suspenze během testu a -3,05 %, -2,42 % a -0,45 % pro d) přímé navážení částic P3HB do kádinek, kde došlo ke stimulaci růstu menší než 10 % oproti kontrole (Obrázek 7). Pro částice o velikosti 63 až 125  $\mu\text{m}$  byly zaznamenány podobné hodnoty, a to 2,32 %, 0,13 % a 1,13 % pro a) suspenzi, 1,05 %, 2,40 % a 0,18 % pro b) výměnu suspenze během testu a -2,21 %, -2,75 % a -4,67 % pro d) přímé navážení částic P3HB do kádinek (Obrázek 8).

Naopak u sedmidenní expozice c) výluhu z částic P3HB byl zaznamenán významný negativní vliv na rychlost růstu *L. minor*, a to u obou velikostních frakcí. U všech testovaných koncentrací částic (10, 50 a 100 mg/L) byla pozorována zvyšující se inhibice růstu *L. minor*, a to 4,72 %, 4,01 % a 15,95 % pro částice <63  $\mu\text{m}$  a 2,79 %, 7,61 % a 17,69 % pro částice o velikosti 63 až 125  $\mu\text{m}$  (Obrázek 7, Obrázek 8). Negativní vliv mikročástic P3HB na hmotnost *L. minor* nebyl zjištěn ani po zvážení čerstvé a suché biomasy u všech provedených testů.



Obrázek 7: Výsledky pro rychlost růstu rostliny *L. minor* pro částice <63  $\mu\text{m}$  (A – suspenze (a), B – výměna suspenze (b), C – výluh z P3HB (c), D – přímé navážení mikročástic P3HB (d)). Hvězdička značí signifikantní změny oproti kontrole.



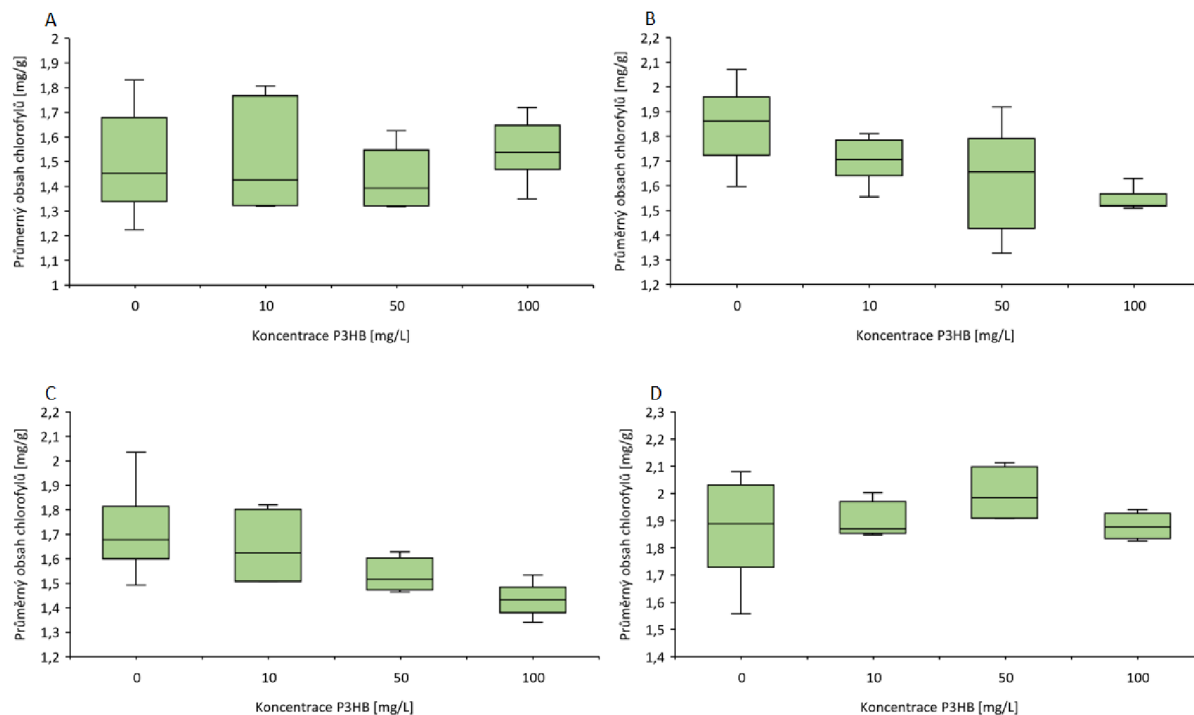
Obrázek 8: Výsledky pro rychlost růstu rostliny *L. minor* pro částice 63 až 125  $\mu\text{m}$  (A – suspenze (a), B – výměna suspenze (b), C – výluh z P3HB (c), D – přímé navážení mikročástic P3HB (d)). Hvězdička značí signifikantní změny oproti kontrole.

U a) suspenze, b) její výměny a d) přímé navážky nedochází k výraznému vlivu pravděpodobně kvůli tomu, že hustota částic P3HB se pohybuje okolo 1,18 až 1,26  $\text{g}/\text{cm}^3$ , což vede k jeho sedimentaci na dno kádinky [29]. Díky tomu má rostlina u povrchu dostatek prostoru pro vývoj a růst. U c) výluhu během jeho týdenní inkubace došlo pravděpodobně buď k výrazné sorpci živin na P3HB, anebo ke spotřebování živin vytvořeným biofilmem. Po následné filtraci už tyto potřebné živiny (pro normální vývoj rostliny) chyběly v získaném výluhu. Možný vliv sorpce byl následně testován a porovnáván v experimentu s PET mikročásticemi a snížením živin v médiu pro *L. minor*.

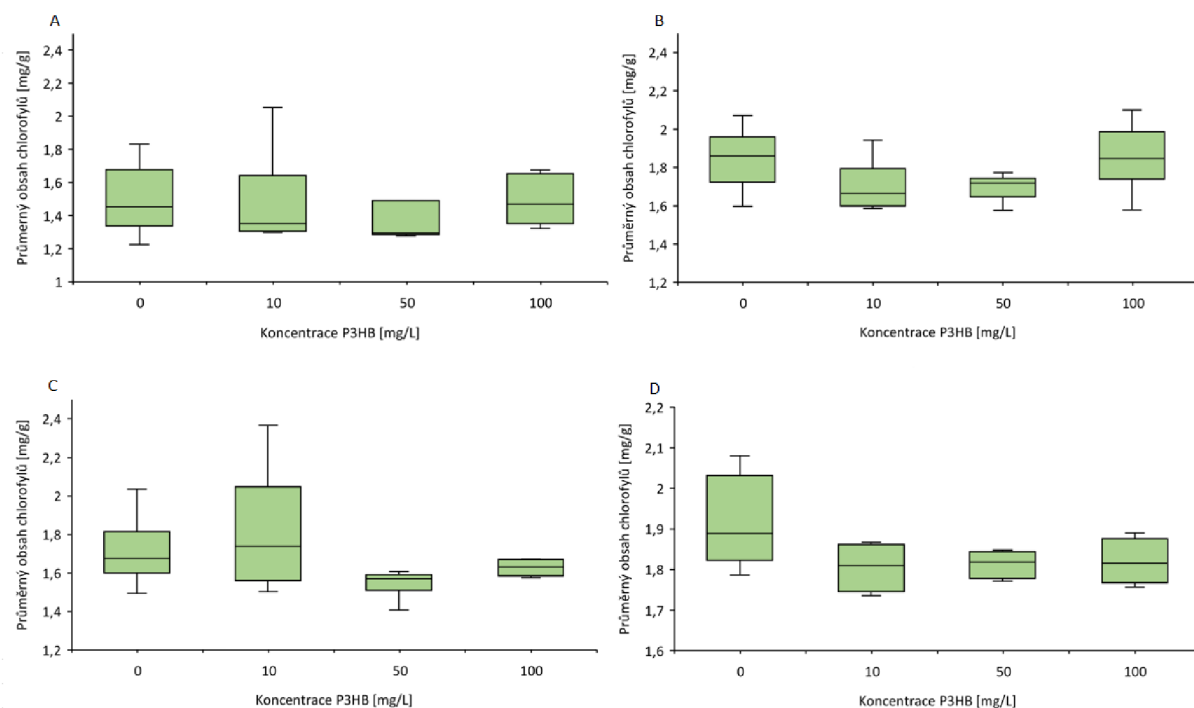
## 5.2 Vliv na obsah fotosyntetických pigmentů

Nebylo zjištěno žádné výrazné snížení koncentrace fotosyntetických pigmentů (karotenoidy, chlorofyl *a* a *b*) v porovnání s kontrolou u obou velikostních frakcí částic (<63  $\mu\text{m}$ , 63 až 125  $\mu\text{m}$ ) a ve všech testovaných koncentracích (10, 50 a 100  $\text{mg}/\text{L}$ ) (Obrázek 9 až Obrázek 12).

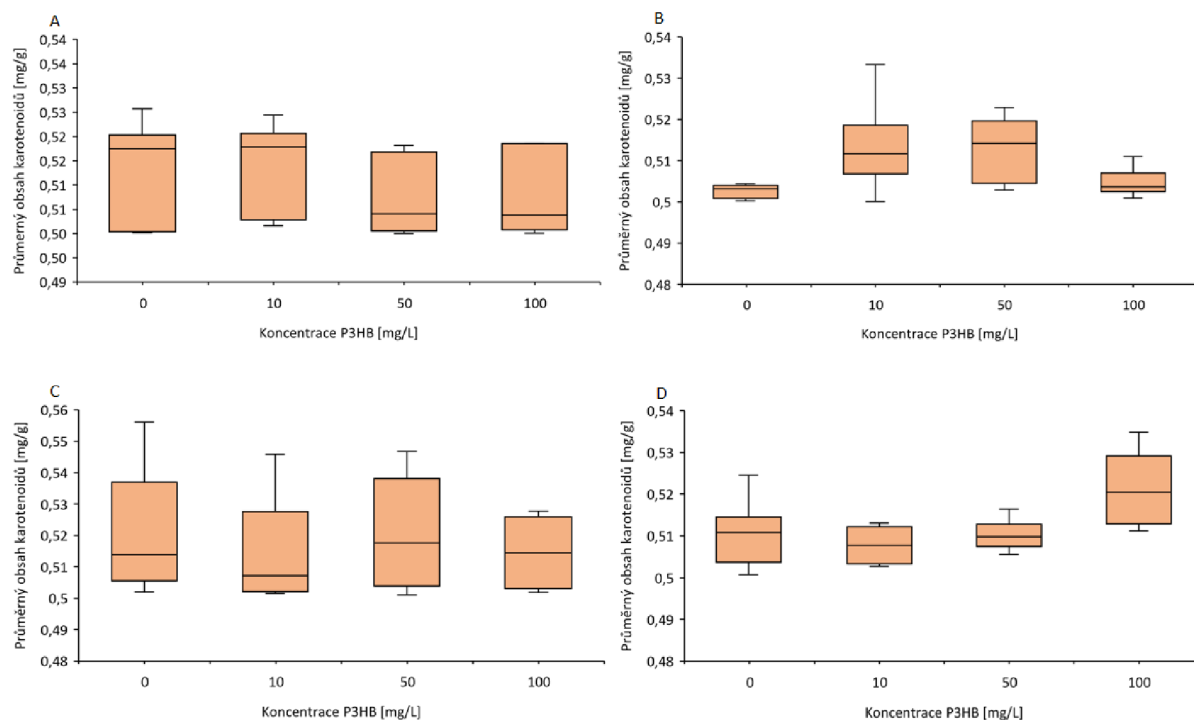




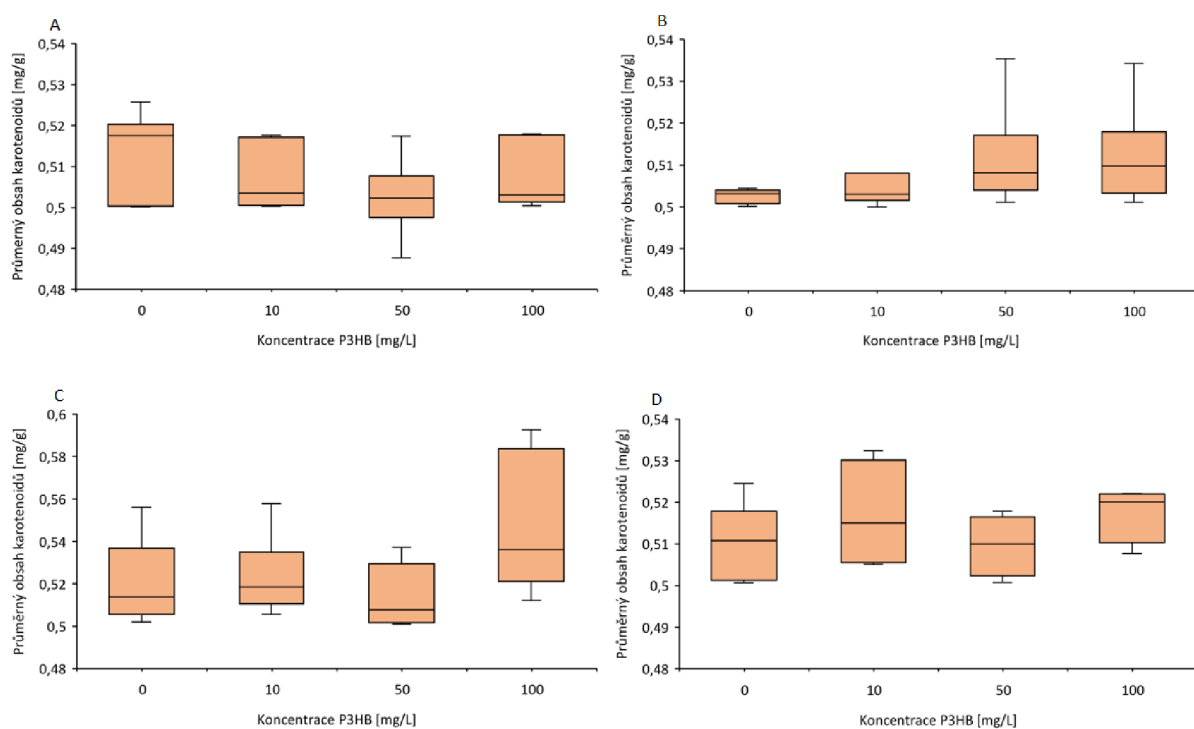
Obrázek 9: Výsledky pro obsah chlorofylů v rostlině *L. minor* pro částice <63 μm (A – suspenze (a), B – výměna suspenze (b), C – výluh z P3HB (c), D – přímé navázení mikročástic P3HB (d))



Obrázek 10: Výsledky pro obsah chlorofylů v rostlině *L. minor* pro částice 63 až 125 μm (A – suspenze (a), B – výměna suspenze (b), C – výluh z P3HB (c), D – přímé navázení mikročástic P3HB (d))



Obrázek 11: Výsledky pro obsah karotenoidů v rostlině *L. minor* pro částice <63 μm (A – suspenze (a), B – výměna suspenze (b), C – výluh z P3HB (c), D – přímé navázení mikročástic P3HB (d))



Obrázek 12: Výsledky pro obsah karotenoidů v rostlině *L. minor* pro částice 63 až 125 μm (A – suspenze (a), B – výměna suspenze (b), C – výluh z P3HB (c), D – přímé navázení mikročástic P3HB (d))

Kalčíková a kol. studovali ekotoxikologický vliv mikrokuliček PE z exfoliačních produktů (A –  $71,30 \pm 34,29 \mu\text{m}$ , B –  $96,00 \pm 69,99 \mu\text{m}$ ) a to v koncentracích 0, 10, 50, and 100 mg/L na vodní rostlinu *L. minor*. V této studii přišli na to, že obsah fotosyntetických pigmentů a specifická rychlost růstu listů nebyla mikročásticemi z PE nijak výrazně ovlivněna, na rozdíl od průměrného růstu kořenů, kde došlo mechanickým blokováním k jeho omezení [61].

K minimálnímu efektu mikroplastů na rychlost růstu rostliny *L. minor*, její hmotnost a obsah fotosyntetických pigmentů došli ve svých studiích i Rozman a kol., kteří zkoumali vliv polyethylenových mikrokuliček ( $149 \pm 75 \mu\text{m}$ ), částic vzniklých z opotřebení pneumatik ( $47 \pm 22 \mu\text{m}$ ), polyethylentereftalátových vláken (délka:  $5362 \pm 1082 \mu\text{m}$ , průměr:  $9,6 \pm 3,5 \mu\text{m}$ ) a z přírodních mikročástic zkoumali dřevěné piliny ( $253 \pm 142 \mu\text{m}$ ) a celulózové částice ( $296 \pm 45 \mu\text{m}$ ) v koncentraci 100 mg/L. Z výsledků bylo patrné, že polyethylentereftalátová vlákna a přírodní částice neměly žádný vliv na obsah chlorofylu, specifickou rychlost růstu a délku kořenů. Podobně tomu bylo i u PE mikrokuliček a částic z opotřebení pneumatik, avšak způsobily významné zkrácení délky kořene. Je pravděpodobné, že to bylo způsobeno jeho mechanickým poškozením, tedy vlivem ostrých hran mikroplastů [65].

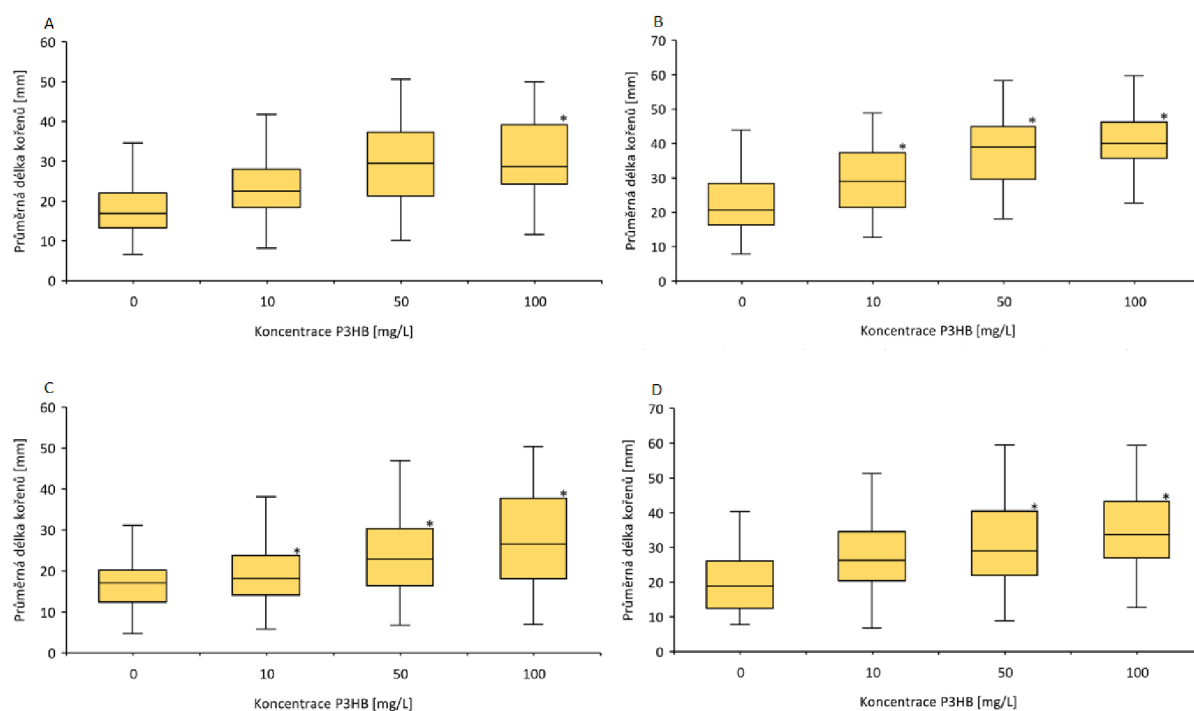
V další studii testovali Rozman a kol. mikročástice PE z tělového peelingu ( $148,7 \pm 75,4 \mu\text{m}$ ), vlákna PE ( $9,58 \pm 3,51 \mu\text{m}$ ), bakelit ( $7,64 \pm 3,48 \mu\text{m}$ ), mikročástice PET z nákupní tašky ( $652,2 \pm 47,6 \mu\text{m}$ ), z PET láhve ( $211,8 \pm 51,7 \mu\text{m}$ ) a z pneumatiky ( $47,39 \pm 22,2 \mu\text{m}$ ) se zvolenou koncentrací 100 mg/L na rostlinu *L. minor*. U všech testovaných mikroplastů nedošlo k zaznamenání výrazného vlivu na specifickou rychlost růstu a obsah chlorofylu v rostlině. Významný rozdíl byl jen u mikroplastů, které měly ostrý a drsný povrch, čímž omezily růst délky kořenů. Navíc u bakelitu bylo zjištěno intenzivní vyluhování, čímž se navyšuje jeho ekotoxický potenciál [63].

Jak již bylo zmíněno, hustota částic P3HB se pohybuje okolo  $1,18$  až  $1,26 \text{ g/cm}^3$  a díky tomu dochází k jeho sedimentaci a usazování na dně kádinky, kde neovlivňuje přístup světla k listové části rostliny [29]. Naopak, Bhattacharya a spol. zaznamenali snížení fotosyntetické aktivity buněk řas po expozici s polystyrenovými nanoplasty ( $20 \mu\text{m}$ ) s předpokladem, že tyto částice blokují přístup světla k řasám [66].

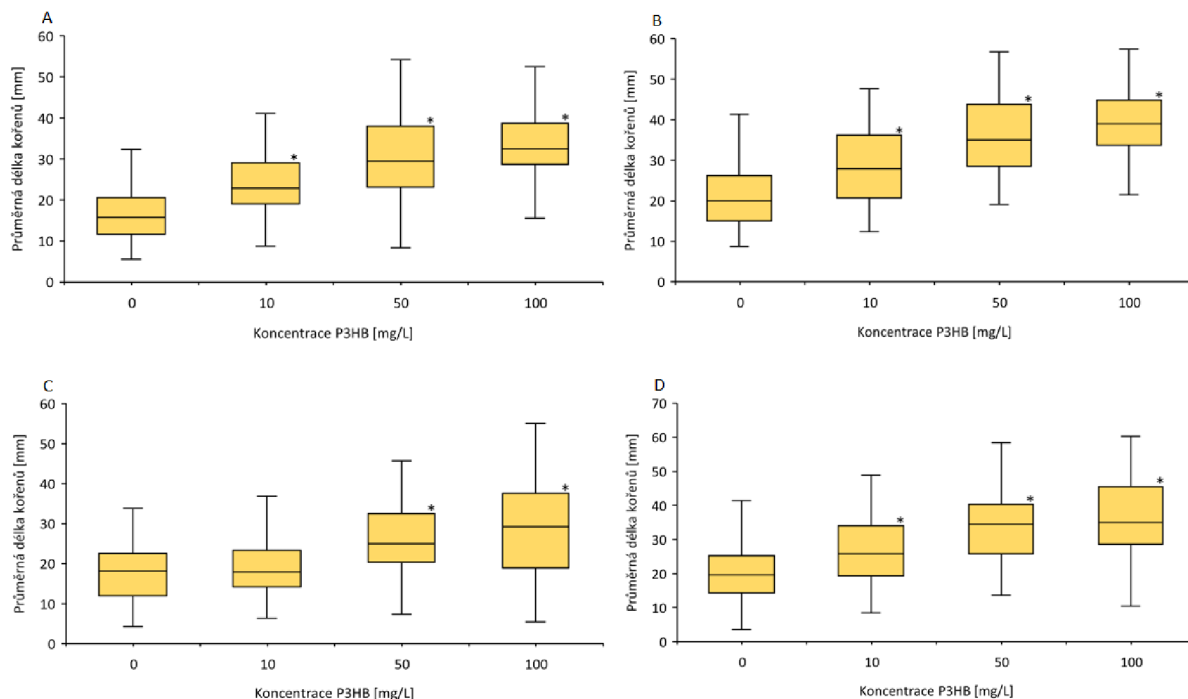
Je patrné, že výše zmíněné studie poskytují různé výsledky s ohledem na sledované endpointy. To může být způsobeno řadou faktorů, ať už typem sledovaných mikroplastů, a tedy různou chemií částic, jejich odlišným povrchem a hustotou, ale i podmínkami během testu. V našem případě nebyly pozorovány žádné vlivy na základní stresové indikátory, nicméně, jak je zmíněno v dalších kapitolách, jeden z endpointů odchylky vykazoval.

### 5.3 Vliv na růst kořene

Na rozdíl od ostatních sledovaných parametrů byl u růstu kořenů zaznamenán významný nárůst délky kořene u obou velikostních frakcí P3HB u všech typů ošetření. U mikročástic P3HB o velikosti  $<63 \mu\text{m}$  pro koncentrace 0, 10, 50 a 100 mg/L částic byla průměrná délka kořene po sedmi dnech 1,73, 2,41, 3,00 a 3,45 cm pro a) suspenzi, 2,23, 2,86, 3,60 a 4,06 cm pro b) výměnu suspenze během týdne, 1,77, 1,89, 2,59 a 2,87 cm pro c) výluh a 2,12, 2,69, 3,46 a 3,64 cm pro d) přímou navážku P3HB (Obrázek 13). Podobně tomu bylo i u mikročástic o velikosti 63 až 125  $\mu\text{m}$ . Průměrná délka kořene byla 1,92, 2,53, 2,98 a 3,10 cm pro a) suspenzi, 2,29, 2,99, 3,82 a 4,17 pro b) výměnu suspenze během týdne, 1,78, 1,91, 2,44 a 2,80 cm pro c) výluh a 2,04, 2,78, 3,09 a 3,47 cm pro d) přímou navážku P3HB (Obrázek 14).



Obrázek 13: Výsledky pro délku kořene rostliny *L. minor* pro částice  $<63 \mu\text{m}$  (A – suspenze (a), B – výměna suspenze (b), C – výluh z P3HB (c), D – přímé navázení mikročástic P3HB (d)). Hvězdička značí signifikantní změny oproti kontrole.



Obrázek 14: Výsledky pro délku kořene rostliny *L. minor* pro částice 63 až 125  $\mu\text{m}$  (A – suspenze (a), B – výměna suspenze (b), C – výluh z P3HB (c), D – přímé navázení mikročástic P3HB (d)). Hvězdička značí signifikantní změny oproti kontrole.

Při stavu s ideálními podmínkami je kořen rostliny *L. minor* krátký (cca 1 cm), nebo může docházet i k jeho úplné absenci, protože *L. minor* je schopna přijímat živiny svou listovou částí. Zvýšený růst kořenů poskytuje kořenovému systému možnost přijímat více živin, což poté pozitivně ovlivňuje růst rostlin [67]. Dostupnost živin u rostlin je klíčovým faktorem ovlivňujícím jejich vývoj. Předpokládá se, že zejména koncentrace dusíku a fosforu ovlivňuje vitalitu a četnost plovoucích vodních rostlin [68]. Reakce rostlin jsou vyvolány řadou chemických, biologických a fyzikálních podnětů. Teorie stresu poukazuje na vztah mezi intenzitou a dobou trvání podnětu a odpovídající reakcí rostliny. Mírné podněty působí na růst rostlin pozitivně (eustres), zatímco nadměrné podněty mají negativní vliv na růst rostlin (distres) [67].

Zhang a kol. při studiu růstu a morfologických reakcí plovoucí klonální rostliny *Spirodela polyrhiza* (*Lemnoideae*) na klonální fragmentaci, dostupnost živin a hustotu populace došli k závěru, že vysoká hladina živin snížila šířku, délku a plochu listů a délku kořenů v porovnání s testem s nízkou hladinou živin, kde došlo k prodlužování kořene [68]. Baiyn a kol. zkoumali vliv průtoku živinového roztoku na růst hydroponických rostlin a zjistili, že při nadměrném průtoku živin dochází ke zkracování a menší ploše povrchu kořenů, což se následně projevuje sníženou absorpcí živinových iontů a horším růstem rostlin. Naopak při použití vhodného průtoku živin nastává podpora růstu kořenů, příjem více živin a celkovému navýšení růstu rostlin [67].

K podobnému závěru došli i Green a kol. u studie vlivu konvenčních a biodegradabilních třpytek v koncentracích 60 mg/L a v průměru – PET (100  $\mu\text{m}$ ), modifikovaná regenerovaná

celulóza (150  $\mu\text{m}$ ), přírodní slída (průměr 40–200  $\mu\text{m}$ ) a syntetická slída (70–200  $\mu\text{m}$ ) ve sladkovodním mezokosmu s *L. minor*. U všech sledovaných mikročastic došlo ke snížení délky kořenů *L. minor*. U biomasy a obsahu chlorofylu v rostlině nebyl zjištěn žádný významný rozdíl [69].

K tomuto jevu dochází i u suchozemských rostlin, kdy se při nízkém obsahu dusíku zvyšuje poměr nazývaný „root:shoot ratio“. Jedná se tedy o poměr kořenů vůči biomase rostliny. Zároveň při tomto nedostatku dochází ke zkracování laterálních kořenů, zatímco při vysoké koncentraci dusičnanů dochází k inhibici růstu kořenů [70].

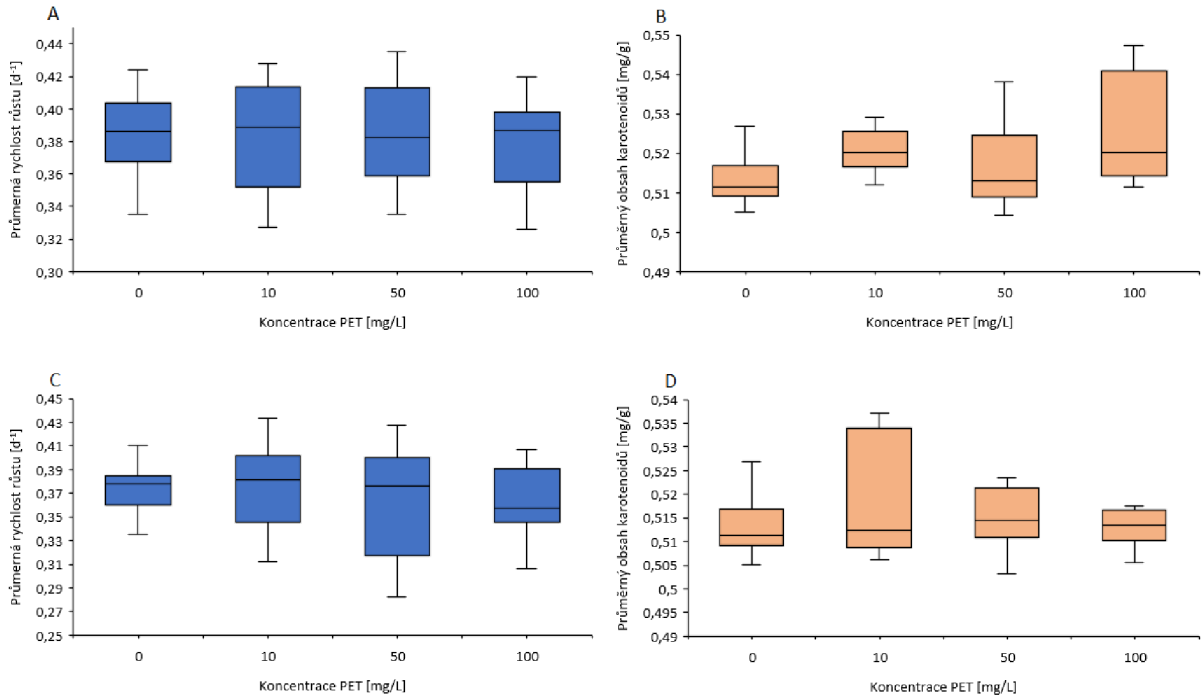
V našem případě docházelo při navyšování koncentrace P3HB k prodlužování délky jediného hlavního kořene rostliny *L. minor*, zatímco růstová rychlost zůstala zachována. Při prodloužení došlo ke zvýšení povrchu kořene pro lepší příjem živin z média. Zároveň při prodlužování délky kořene dochází ke změně poměru délky kořene k biomase. Tento poměr se s rostoucí koncentrací P3HB v médiu zvyšoval. To naznačuje možnost určitého stresu, který mohl být vyvolaný přítomností P3HB v médiu. Případné změny jako ztenčování kořene nebo omezení viability kořenových buněk nebyly v průběhu testování pozorovány, což poukazuje na možný problém s nedostatkem živin.

#### 5.4 Test s mikročasticemi PET

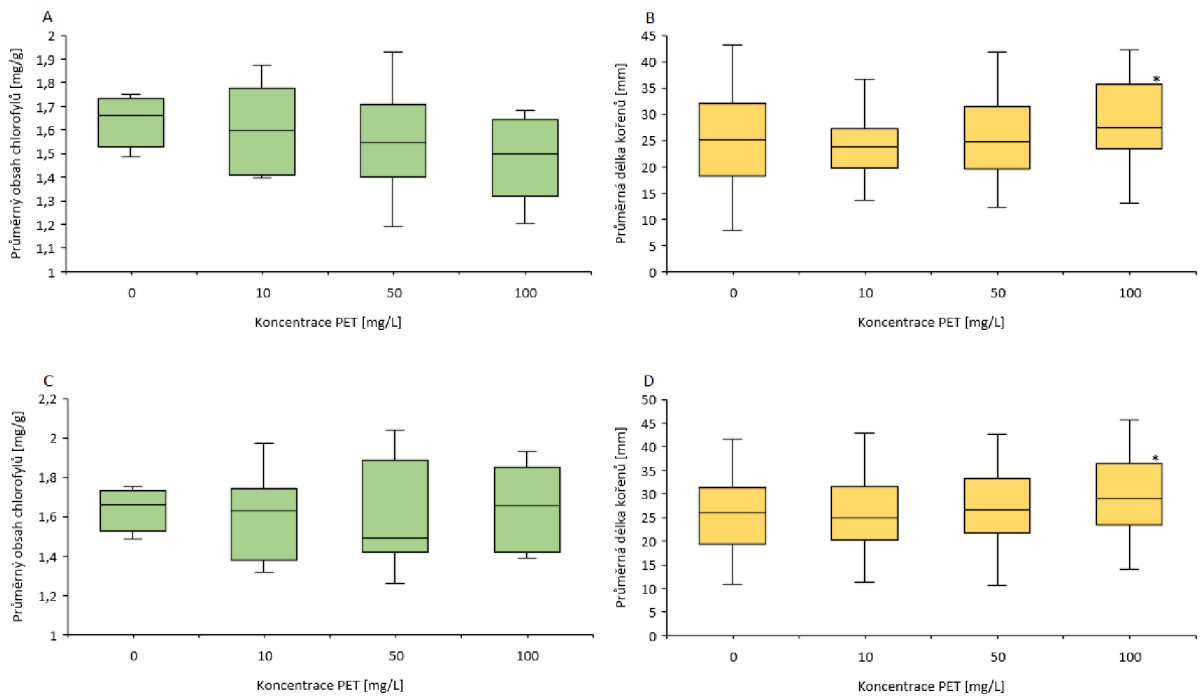
Na základě dosažených výsledků byla navržena hypotéza, že nedostatek živin může být způsoben buď jejich sorpcí na mikročastice P3HB, anebo tvorbou biofilmu vznikajícího na povrchu biodegradabilního polymeru, který živiny spotřebovává. Proto byl proveden test s mikročasticemi PET ve stejných velikostních frakcích (<63  $\mu\text{m}$  a 63 až 125  $\mu\text{m}$  částic) a za stejných podmínek jako testy s P3HB, i se stejnými koncentracemi částic ve vzorku (10, 50 a 100 mg/L).

Polyethylentereftalát (PET), jako zástupce konvenčních plastů, rovněž patří do skupiny polyesterů a řadí se mezi nejrozšířenější mikroplasty v životním prostředí. PET byl vybrán díky vlastnostem podobným P3HB, jako je například smáčivost. Kontaktní úhel P3HB se nachází mezi 70° až 81° (mírně hydrofobní charakter). Pro PET je tento úhel v rozmezí 66° až 81° [5].

Bylo zjištěno, že vliv mikročastic PET je podobný vlivu mikročastic P3HB. U hmotnosti biomasy a obsahu fotosyntetických pigmentů nebyla zaznamenána žádná výrazná změna oproti kontrole (Obrázek 15, Obrázek 16). U vlivu na rychlost růstu byla pozorována při nízkých koncentracích mírná stimulace růstu a při vyšších koncentracích docházelo k mírné inhibici růstu rostliny *L. minor* oproti kontrole, a to -0,56 %, -0,53 % a 0,43 % pro částice <63  $\mu\text{m}$  a - 1,13%, 2,65% a 2,70% pro částice 63 až 125  $\mu\text{m}$ . S rostoucí koncentrací mikročastic PET v médiu byl pozorován nárůst délky kořene, nicméně významná změna ve srovnání s kontrolou byla pozorována pouze v nejvyšší koncentraci mikročastic PET (100 mg/L) (Obrázek 16).



Obrázek 15: Výsledky pro rychlost růstu a obsah karotenoidů v rostlině *L. minor* pro PET částice <63 μm (A, B) a 63 až 125 μm (C, D)



Obrázek 16: Výsledky pro obsah chlorofylů a délky kořene rostliny *L. minor* pro PET částice <63 μm (A, B) a 63 až 125 μm (C, D). Hvězdička značí signifikantní změny oproti kontrole.

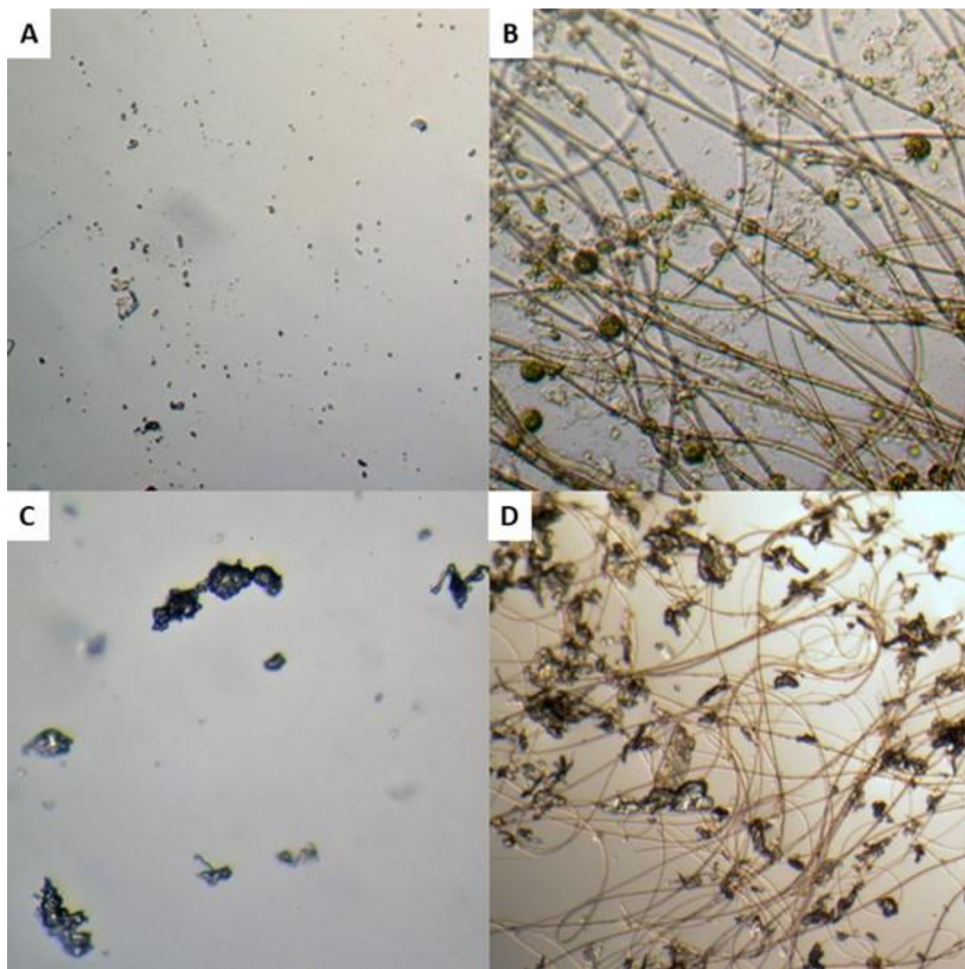
I přes podobné vlastnosti probíhala adsorpce živin a vývoj biofilmu výrazněji u mikročásteček P3HB než u mikročásteček PET. Výrazný vliv na délku kořenů byl pozorován na všech testovaných koncentracích P3HB. Tento jev ovlivňuje pravděpodobně tvorbu biofilmu, která u P3HB probíhá rychleji než u PET a významně ovlivňuje jeho sorpční potenciál vůči okolí. Důvod rychlejšího vzniku biofilmu na P3HB oproti PET může být dán jeho biodegradabilitou, čímž představuje zdroj uhlíku pro přítomné mikroorganismy [71].

## 5.5 Sorpční experiment

Abychom zjistili, zda dochází ke snížení koncentrace živin v médiu pouze vlivem přítomnosti mikročásteček (P3HB i PET) byly provedeny sorpční experimenty. Z dosažených výsledků bylo zjištěno, že vyšší sorpce živin nastává u P3HB, a to až o 30% snížení živin v médiu v porovnání s kontrolou. Oproti tomu u PET mikročásteček bylo nevyšší snížení živin pouze o 12 %.

Proces sorpce živin a tvorba biofilmu na mikroplastech byla potvrzena u obou testovaných plastů. Ovšem výraznější efekt na růst délky kořene byl zaznamenán jen u částic P3HB, a to ve všech zvolených koncentracích (10, 50 a 100 mg/L) a všech přístupech testování. U částic PET byl tento výrazný efekt zaznamenán jen v nejvyšší koncentraci (100 mg/L) v porovnání s kontrolou. Z dosažených výsledků vyplývá, že za výrazné snížení živin a následné prodlužování kořenů mohou pravděpodobně biodegradabilní částice P3HB, u kterých dochází k výrazně rychlejší tvorbě biofilmu (oproti PET), který je schopný výrazně a silně vázat živiny z použitého média pro vlastní potřebu. U částic PET vznikal biofilm v mnohem menší míře a zároveň se předpokládá, že dochází k fyzikální sorpci, při které nedochází k tak silné interakci s živinami (Obrázek 17). V médiu pak může dojít k jejich opětovnému uvolnění a příjmu rostlinou.





Obrázek 17: Částice P3HB před testem (A) a sedm dní po testu (B), částice PET před testem (C) a sedm dní po testu (D)

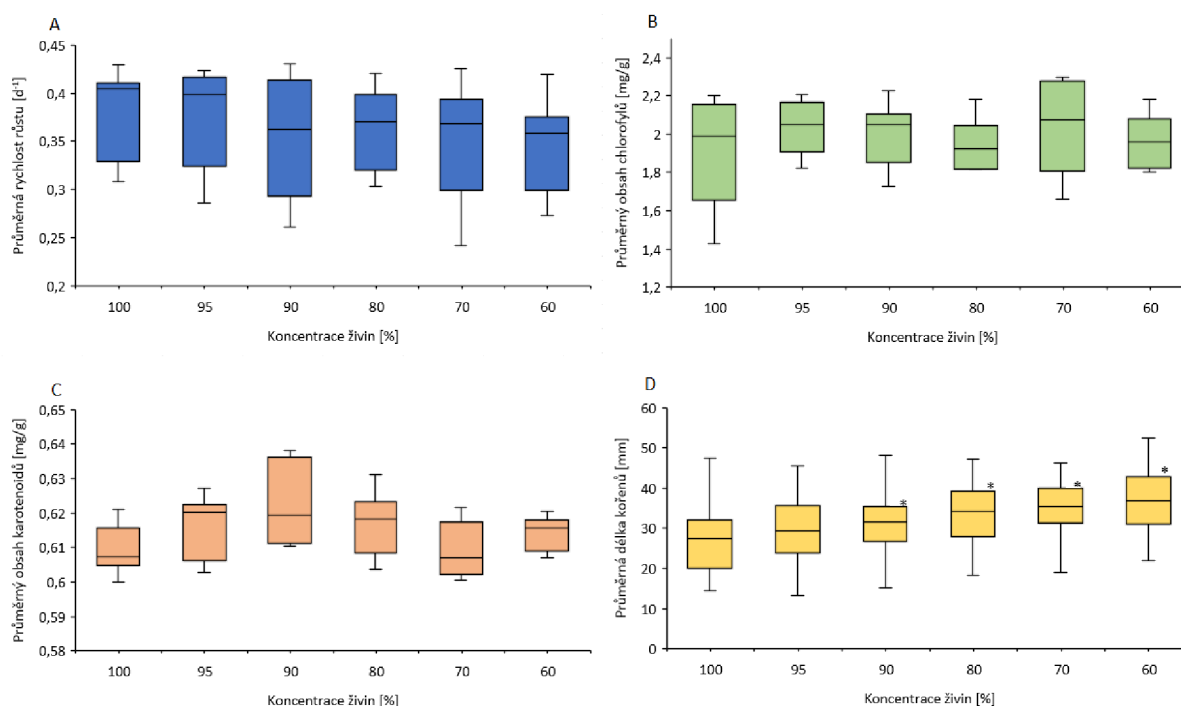
Biofilmy jsou fylogeneticky a funkčně různorodá společenstva mikroorganismů. Vznik a vývoj biofilmů na povrchu mikroplastů může změnit jejich fyzikální a chemické vlastnosti, například polaritu povrchu (hydrofobitu), specifický poměr povrchu a objemu, hustotu a drsnost. Problém nastává v tom, že jsou mikroplasty schopny sorbovat na svém povrchu látky znečišťující životní prostředí, jako jsou například těžké kovy, perzistentní organické polutanty nebo polycyklické aromatické uhlovodíky. U mikroplastů, na kterých navíc vzniká biofilm, dochází k navýšení afinity k výše zmíněným polutantům, čímž se také zvyšuje jejich environmentální riziko [2]. Richard a kol. se ve své studii zabývali hypotézou, že koncentrace kovů je spjata s akumulací biofilmu na mikroplastech ve vodách. Pro svůj výzkum zvolili plastové pelety kyseliny polymléčné (průměr 4 mm) a polyethylenu nízké hustoty (délka 3 mm, průměr 5 mm) a po vyhodnocení testu došli k závěru, že biofilmy zvyšují akumulaci různých kovů v plastových odpadech (např. Cu, Cs, Co, Fe, Al, Ni, U, Ga, Mn, Pb) [72]. Předpokládáme tedy, že podobně jako je tomu u polutantů, může docházet i k sorpci nutrientů na mikroplasty z okolního prostředí nebo biosorpci na vzniklý biofilm.

Brtnický a kol. zkoumali podobné účinky P3HB, který byl přidán do půdy s omezeným obsahem živin na růst salátu (*Lactuca sativa L. var. capitata L.*). Z výsledných dat bylo zjištěno, že P3HB, který byl zaveden do půdy, zvyšoval mikrobiální aktivitu, a to kvůli jeho

přednostnímu využití jako zdroje uhlíku. Tím došlo k vyčerpávání půdního dusíku a výrazné inhibici růstu testované rostliny [73]. I přes podobnost dosažených výsledků s prací Brtnického a kol. nejde o ten stejný problém, ale pouze analogický. Půdní prostředí se liší od toho vodního a tím jsou ovlivněny i probíhající procesy, jako například mikrobiální aktivita, která je výraznější v půdě. Díky tomu je v půdě problémem deficit nutrientů díky přemnožení mikroroganisů, lze tedy říct, že problém je především mikrobiologické povahy. Ve vodě je problém patrně díky růstu biofilmu (biosorpci) a fyzikální sorpci, pro rozlišení těchto procesů bylo nutné provést další experimenty.

## 5.6 Nutrienty

Pro ujištění, že při úbytku živin v médiu dochází k prodlužování délky kořene u rostliny *L. minor*, byl proveden test s menším množstvím živin na základě výsledků sorpčního experimentu. Test probíhal za stejných podmínek jako u testování P3HB. Po vyhodnocení testu bylo ze získaných dat povrženo, že se snižující se koncentrací živin v médiu docházelo k mírné inhibici růstu oproti kontrole a k postupnému snižování hmotnosti biomasy. Nejvyšší inhibice byla 6,46 %, a to u vzorku, kde bylo jen 60 % živin oproti kontrole. To odpovídá úbytku živin o 40 %. Dále docházelo k výraznému nárůstu délky kořene postupně zvyšující se při každém snížení množství živin v připraveném médiu. Nebyly pozorovány žádné významné změny v obsahu fotosyntetických pigmentů (Obrázek 18).



Obrázek 18: Výsledky testů se sníženým obsahem nutrientů v médiu (A – rychlost růstu, B – obsah chlorofylů, C – obsah karotenoidů, D – délka kořene). Hvězdička značí signifikantní změny oproti kontrole.

Jak již bylo zmíněno výše, vodní plovoucí rostliny jsou schopny přijímat živiny nejen svými kořeny, ale i listy. V případě sníženého množství živin dochází k prodloužení kořene. *L. minor*, která se mezi tyto rostliny řadí. *L. minor* má pouze jeden jednoduchý kořen, ale za ideálních podmínek může docházet i k jeho absenci [74]. V ekotoxikologických testech je zvyšující nebo zkracující se délka kořene jedním z citlivějších sledovaných endpointů. K tomuto závěru došli například Kalčíková a kol., kteří testovali vliv mikroplastů PE na vodní rostlinu *L. minor*. Ze sledovaných endpointů (specifická rychlost růstu listů, obsah fotosyntetických pigmentů a délka kořene) došlo k výraznému ovlivnění jen u růstu kořenů, kde došlo k jejich snížení délky oproti kontrole, a to vlivem mechanického blokování mikroplasty [61]. A dále Gopalapillai a kol. kteří přišli k závěru při studiu ekotoxikologických endpointů na stanovení kvality důlních odpadních vod, že délka kořenů byla při jejich výzkumu nejcitlivějším a nejpřesnějším koncovým ukazatelem při různém složení vody. Druhým přesným endpointem pak byl počet listů [75].

Nedostatek dusíku se projevuje pomalým růstem rostlin. Pokud je absorpce tohoto prvku kořeny omezena, tak se z listů vytrácí chlorofyl, který je nezbytný pro fotosyntézu. Dusík je také potřebný pro samotný vývoj rostliny. Avšak v našem případě nedošlo k žádné významné změně v obsahu chlorofylů v listech [76].

Jak již bylo dříve zmíněno, při vyšším obsahu živin v médiu dochází u rostliny ke zkracování kořenů, mezitím co při nízkém obsahu živin nastává prodlužování kořenového systému, čímž se zvětšuje plocha, kterou je rostlina schopná potřebné živiny přijímat. Tímto testem bylo potvrzeno, že s postupným snižováním živin se rostlina snaží přizpůsobit těmto zhoršeným podmínkám a dochází k inhibici růstu a nárůstu délky kořene [67]. Z krátkodobého měřítka se rostlina s těmito podmínkami vypořádá, avšak z dlouhodobého hlediska je těžké odhadnout, jaké to může mít následky na vývoj rostliny a její okolní biotu. Je proto třeba se zaměřit na dlouhodobý vliv přítomnosti biodegradabilních bioplastů, jako je již zmíněný P3HB na rostlinu *L. minor*.

## 6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce ukázala, že sledované endpointy, jako je vliv na růst vodní rostliny *L. minor*, hmotnost biomasy a obsah fotosyntetických pigmentů v listech, nebyly výrazně ovlivněny žádnou z koncentrací obou velikostních frakcí <63  $\mu\text{m}$  a 63 až 125  $\mu\text{m}$  částic mikroplastů P3HB. Jediným pozorovaným endpointem s významným vlivem na testovanou rostlinu bylo prodlužování délky kořenů při zvyšující se koncentraci P3HB. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je poměrně rychle probíhající vznik biofilmu na biodegradabilních mikroplastech P3HB, kdy dochází k postupnému vyčerpávání a spotřebovávání živin z média společně s mikroorganismy, tedy biofilmem. U rostliny tak následně dochází k prodlužování jediného kořene, a tedy ke zvýšení povrchu pro možný příjem živin z okolí. Toto řešení je však jen dočasné a je těžké odhadnout, jaký by to mělo dopad v dlouhodobém měřítku na *L. minor* a jeho vzájemném vztahu s organismy a okolím.

Biodegradabilní plasty, i přes svůj významný potenciál jako náhrada za konvenční plasty pro jejich schopnost biodegradace a údajnou neutralitu vůči životnímu prostředí, mohou vykazovat možný vedlejší negativní efekt na vodní rostliny. V průběhu tohoto ekotoxikologického experimentu byl pozorován vznik biofilmu na dně testovací nádoby. Proto byl v této návaznosti proveden sorpční experiment dusičnanů na mikroplasty P3HB a PET (pro porovnání) a následný test s procentuálním snížením všech živin v Steinbergově médiu zkoumající odezvu *L. minor*. Oba tyto experimenty nám potvrdily, že se zvyšující se koncentrací P3HB může docházet k výraznému vyčerpávání živin vlivem vznikajícího biofilmu z akvatického prostředí, což může mít poté potenciální negativní efekt na testovanou vodní rostlinu a přítomnou biotopu.

Tento jev u P3HB a samotný vliv biodegradabilních plastů na životní prostředí nebyl doposud pořádně prozkoumán a existuje jen velmi málo studií, které by měly podobné zaměření. Bylo by proto vhodné a zároveň i potřebné se tomuto tématu do budoucna více věnovat v dalších pracích se zaměřením na ekotoxikologické ukazatele, aby se mohlo předejít případným negativním environmentálním dopadům jak v akvatickém, tak i terestrickém prostředí.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] CHATHALINGATH, Nayana, Joshua Stephen KINGSLY a Anbarasi GUNASEKAR. Biosynthesis and biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) from *Priestia flexa*; A promising mangrove halophyte towards the development of sustainable eco-friendly bioplastics. *Microbiological Research* [online]. 2023, **267**, 127270. ISSN 09445013. Dostupné z: doi:10.1016/j.micres.2022.127270
- [2] MENÉNDEZ-PEDRIZA, Albert a Joaquim JAUMOT. Interaction of Environmental Pollutants with Microplastics: A Critical Review of Sorption Factors, Bioaccumulation and Ecotoxicological Effects. *Toxics* [online]. 2020, **8**(2), 40. ISSN 2305-6304. Dostupné z: doi:10.3390/toxics8020040
- [3] VAN CAUWENBERGHE, Lisbeth, Lisa DEVRIESE, François GALGANI, Johan ROBBENS a Colin R. JANSSEN. Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marine Environmental Research* [online]. 2015, **111**, 5–17. ISSN 01411136. Dostupné z: doi:10.1016/j.marenvres.2015.06.007
- [4] 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* [online]. 2020, **745**, 140975. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140975
- [5] 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* [online]. 2022, **56**(15), 10732–10742. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.2c01970
- [6] SINGH, Rashmi, Rakesh KUMAR a Prabhakar SHARMA. Microplastic in the subsurface system: Extraction and characterization from sediments of River Ganga near Patna, Bihar. In: *Advances in Remediation Techniques for Polluted Soils and Groundwater* [online]. B.m.: Elsevier, 2022, s. 191–217. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-823830-1.00013-4
- [7] Science of Plastics. *Science History Institute* [online]. [vid. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.sciencehistory.org/science-of-plastics>
- [8] PROKOPOVÁ, Irena. *Makromolekulární chemie*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-662-3.
- [9] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006. ISBN 80-708-0617-6.
- [10] BĚHÁLEK, Luboš. *Polymery*. 15. vyd. 2015. ISBN 978-80-88058-66-3.

- [11] Annual production of plastics worldwide from 1950 to 2021. *Statista* [online]. [vid. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>
- [12] VOLOŠINOVÁ, D., D ROHOVEC a E. ČEJKA. Littering. *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace* [online]. 2021, **63**(3), 56–62 [vid. 2023-05-07]. ISSN 0322-8916. Dostupné z: <https://www.vtei.cz/2021/07/littering/>
- [13] TURSI, Antonio, Mariafrancesca BARATTA, Thomas EASTON, Efthalia CHATZISYMEON, Francesco CHIDICHIMO, Michele DE BIASE a Giovanni DE FILPO. Microplastics in aquatic systems, a comprehensive review: origination, accumulation, impact, and removal technologies. *RSC Advances* [online]. 2022, **12**(44), 28318–28340. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/D2RA04713F
- [14] IVLEVA, Natalia P., Alexandra C. WIESHEU a Reinhard NIESSNER. Microplastic in Aquatic Ecosystems. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2017, **56**(7), 1720–1739. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201606957
- [15] 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* [online]. 2019, **53**(3), 1039–1047. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.8b05297
- [16] MCADAM, Blaithín, Margaret BRENNAN FOURNET, Paul MCDONALD a Marija MOJICEVIC. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers* [online]. 2020, **12**(12), 2908. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12122908
- [17] Co jsou bioplasty? *Good Gastro* [online]. 2019 [vid. 2023-05-07]. Dostupné z: <https://www.goodgastro.cz/rubriky/co-jsou-bioplasty/co-jsou-bioplasty/>
- [18] *European Bioplastics* [online]. [vid. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.european-bioplastics.org/>
- [19] GIRONI, F. a V. PIEMONTE. Bioplastics and Petroleum-based Plastics: Strengths and Weaknesses. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* [online]. 2011, **33**(21), 1949–1959. ISSN 1556-7036. Dostupné z: doi:10.1080/15567030903436830
- [20] SUZUKI, Miwa, Yuya TACHIBANA a Ken-ichi KASUYA. Biodegradability of poly(3-hydroxyalkanoate) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments. *Polymer Journal* [online]. 2021, **53**(1), 47–66. ISSN 0032-3896. Dostupné z: doi:10.1038/s41428-020-00396-5

- [21] DOBROGOJSKI, Jędrzej, Maciej SPYCHALSKI, Robert LUCIŃSKI a Sławomir BOREK. Transgenic plants as a source of polyhydroxyalkanoates. *Acta Physiologiae Plantarum* [online]. 2018, **40**(9), 162. ISSN 0137-5881. Dostupné z: doi:10.1007/s11738-018-2742-4
- [22] NASER, Ahmed Z., I. DEIAB a Basil M. DARRAS. Poly(lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: a review. *RSC Advances* [online]. 2021, **11**(28), 17151–17196. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/D1RA02390J
- [23] MIKOVÁ, Gizela a Ivan CHODÁK. Vlastnosti a modifikácia poly(3-hydroxybutyrátu). *Chemické listy* [online]. 2006, **100**(12), 10751083 [vid. 2023-04-15]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006\\_12\\_1075-1083.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_12_1075-1083.pdf)
- [24] GHANBARZADEH, Babak a Hadi ALMASI. Biodegradable Polymers. In: *Biodegradation - Life of Science* [online]. B.m.: InTech, 2013, s. 141–186. Dostupné z: doi:10.5772/56230
- [25] SHARMA, Vibhuti, Rutika SEHGAL a Reena GUPTA. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. *Polymer* [online]. 2021, **212**, 123161 [vid. 2023-04-12]. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/J.POLYMER.2020.123161
- [26] GARCIA-GARCIA, Daniel, Luis QUILES-CARRILLO, Rafael BALART, Sergio TORRES-GINER a Marina P. ARRIETA. Innovative solutions and challenges to increase the use of Poly(3-hydroxybutyrate) in food packaging and disposables. *European Polymer Journal* [online]. 2022, **178**, 111505. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2022.111505
- [27] ROOHI, Mohd Rehan ZAHEER a Mohammed KUDDUS. PHB (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate) and its enzymatic degradation. *Polymers for Advanced Technologies* [online]. 2018, **29**(1), 30–40. ISSN 10427147. Dostupné z: doi:10.1002/pat.4126
- [28] *Polyhydroxyalkanoáty* [online]. San Francisco : Wikimedia Foundation, nedatováno [vid. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Polyhydroxyalkano%C3%A1ty>
- [29] MAJERCZAK, Katarzyna, Dominic WADKIN-SNAITH, Vitor MAGUEIJO, Paul MULHERAN, John LIGGAT a Karen JOHNSTON. Polyhydroxybutyrate: a review of experimental and simulation studies of the effect of fillers on crystallinity and mechanical properties. *Polymer International* [online]. 2022, **71**(12), 1398–1408. ISSN 0959-8103. Dostupné z: doi:10.1002/pi.6402
- [30] MANOJKUMAR, Y., Bhukya GOPAL, C. SUMANTH, Sridhar PILLI, R.D. TYAGI a Ashok PANDEY. Occurrence of microplastics and nanoplastics in marine environment. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2023, 151–181 [vid. 2023-04-15]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-99908-3.00010-5

- [31] CARPENTER, Edward J., Susan J. ANDERSON, George R. HARVEY, Helen P. MIKLAS a Bradford B. PECK. Polystyrene Spherules in Coastal Waters. *Science* [online]. 1972, **178**(4062), 749–750. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.178.4062.749
- [32] CARPENTER, Edward J. a K. L. SMITH. Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science* [online]. 1972, **175**(4027), 1240–1241. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.175.4027.1240
- [33] KOŽÍŠEK, František a Helena KAZMAROVÁ. Mikroplasty v životním prostředí a zdraví. *Vodní hospodářství* [online]. [vid. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://vodnihospodarstvi.cz/mikroplasty-v-zivotnim-prostredi-a%E2%80%AFzdravi/>
- [34] ROY, Poritosh, Amar K. MOHANTY a Manjusri MISRA. Microplastics in ecosystems: their implications and mitigation pathways. *Environmental Science: Advances* [online]. 2022, **1**(1), 9–29. ISSN 2754-7000. Dostupné z: doi:10.1039/D1VA00012H
- [35] KAUR, Paramdeep, Kashmir SINGH a Baljinder SINGH. Microplastics in soil: Impacts and microbial diversity and degradation. *Pedosphere* [online]. 2022, **32**(1), 49–60 [vid. 2023-04-14]. ISSN 1002-0160. Dostupné z: doi:10.1016/S1002-0160(21)60060-7
- [36] KHADKA, Navin S. *Microplastics found in fresh Antarctic snow* [online]. 9. červen 2022 [vid. 2023-04-14]. Dostupné z: <https://www.bbc.com/news/science-environment-61739159>
- [37] CAJTHAML, Tomáš a Zdena HRSINOVÁ KŘESINOVÁ. *Hormonální látky kolem nás: hrozba 21. století* [online]. Praha: Academia, 2016 [vid. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.academia.cz/edice/kniha/hormonalni-latky-kolem-nas-hrozba-21-stoleti>
- [38] PANÁČEK, Aleš a Anna BALZEROVÁ. *Základy toxikologie a ekotoxikologie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. ISBN 978-80-244-3913-6.
- [39] KOČÍ, V. Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí. *Chemické listy* [online]. 2006, **100**(10), 882888 [vid. 2023-04-15]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/issue/view/129>
- [40] KOČÍ, Vladimír a Klára MOCOVÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2009. ISBN 978-80-7080-699-9.
- [41] *Zákon č. 541/2020 Sb., o odpadech § 69* [online]. [vid. 2023-04-14]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2020-541>
- [42] *Vyhláška č. 94/2016 Sb. Vyhláška o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů* [online]. [vid. 2023-04-14]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-94>



- [43] KOPP, Radovan, Klára HILSCEROVÁ a Eva POŠTULKOVÁ. *Základy vodní ekotoxikologie*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN 978-80-7509-334-9.
- [44] MARŠÁLEK, B. Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití . *Informační systém Masarykovy univerzity* [online]. [vid. 2023-04-15]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1431/jaro2008/Bi5620/um/5135634/1.Prehled\\_a\\_rozdeleni\\_EB\\_text.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2008/Bi5620/um/5135634/1.Prehled_a_rozdeleni_EB_text.pdf)
- [45] Porozumět nařízení REACH. *ECHA European Chemicals Agency* [online]. [vid. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/regulations/reach/understanding-reach>
- [46] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. 2. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. ISBN 80-708-0521-8.
- [47] OLIVEIRA PEREIRA, Erico A., Vera KOVACEVIC, Tae-Yong JEONG a Myrna J. SIMPSON. Metabolic responses of the water flea (*Daphnia magna*) to individual contaminants and mixtures in presence of dissolved organic matter. In: *Applied Environmental Metabolomics* [online]. B.m.: Elsevier, 2022, s. 259–271. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816460-0.00013-7
- [48] JEWELL, Mark Davidson a Graham BELL. Overwintering and re-emergence in *Lemna minor*. *Aquatic Botany* [online]. 2023, **186**, 103633. ISSN 03043770. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquabot.2023.103633
- [49] ČSN EN ISO 20079 (757745) *Jakost vod - stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (Lemna minor) - Zkouška inhibice růstu okřehek*. 2007
- [50] ALP, Fatma Nur, Busra ARIKAN, Ceyda OZfidan-KONAKCI, Rumeysa EKIM, Evren YILDIZTUGAY a Metin TURAN. Rare earth element scandium mitigates the chromium toxicity in *Lemna minor* by regulating photosynthetic performance, hormonal balance and antioxidant machinery. *Environmental Pollution* [online]. 2023, **316**, 120636. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2022.120636
- [51] MALINA, Tomáš, Adéla LAMACZOVÁ, Eliška MARŠÁLKOVÁ, Radek ZBOŘIL a Blahoslav MARŠÁLEK. Graphene oxide interaction with *Lemna minor*: Root barrier strong enough to prevent nanoblade-morphology-induced toxicity. *Chemosphere* [online]. 2022, **291**, 132739. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2021.132739
- [52] ELTEMSAH, Yehia Sayed a Thomas BØHN. Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* [online]. 2019, **254**, 112919. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.07.087
- [53] 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* [online]. 2019, **231**, 423–431. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.05.115
- [54] SCHÜR, Christoph, Sebastian ZIPP, Tobias THALAU a Martin WAGNER. Microplastics but not natural particles induce multigenerational effects in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* [online]. 2020, **260**, 113904. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.113904
- [55] MILOLOŽA, Martina, Kristina BULE, Šime UKIĆ, Matija CVETNIĆ, Tomislav BOLANČA, Hrvoje KUŠIĆ, Vesna Ocelić BULATOVIĆ a Dajana Kučić GRGIĆ. Ecotoxicological Determination of Microplastic Toxicity on Algae *Chlorella* sp.: Response Surface Modeling Approach. *Water, Air, & Soil Pollution* [online]. 2021, **232**(8), 327. ISSN 0049-6979. Dostupné z: doi:10.1007/s11270-021-05267-0
- [56] ANSARI, F.A., S.K. RATHA, N. RENUKA, L. RAMANNA, S.K. GUPTA, I. RAWAT a F. BUX. Effect of microplastics on growth and biochemical composition of microalga *Acutodesmus obliquus*. *Algal Research* [online]. 2021, **56**, 102296. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2021.102296
- [57] 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* [online]. 2019, **374**, 219–227. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2019.04.039
- [58] 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* [online]. 2022, **244**, 106097. ISSN 0166445X. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquatox.2022.106097
- [59] 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* [online]. 2019, **6**(5), 1382–1392. ISSN 2051-8153. Dostupné z: doi:10.1039/C8EN01427B
- [60] WALDSCHLÄGER, Kryss, Maximilian BORN, Win COWGER, Andrew GRAY a Holger SCHÜTTRUMPF. Settling and rising velocities of environmentally weathered micro- and macroplastic particles. *Environmental Research* [online]. 2020, **191**, 110192. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2020.110192
- [61] KALČÍKOVÁ, Gabriela, Andreja ŽGAJNAR GOTVAJN, Aleš KLADNIK a Anita JEMEC. Impact of polyethylene microbeads on the floating freshwater plant duckweed *Lemna minor*. *Environmental Pollution* [online]. 2017, **230**, 1108–1115. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2017.07.050

- [62] 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* [online]. 2019, **689**, 413–421. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.359
- [63] 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* [online]. 2021, **773**, 145576. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145576
- [64] RADIĆ, Sandra a Branka PEVALEK-KOZLINA. Effects of osmotic stress on antioxidative system of duckweed (*Lemna minor* L). *Periodicum Biologorum*. 2010, **112**, 293–299.
- [65] ROZMAN, Ula a Gabriela KALČÍKOVÁ. The Response of Duckweed *Lemna minor* to Microplastics and Its Potential Use as a Bioindicator of Microplastic Pollution. *Plants* [online]. 2022, **11**(21), 2953. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants11212953
- [66] 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* [online]. 2010, **114**(39), 16556–16561. ISSN 1932-7447. Dostupné z: doi:10.1021/jp1054759
- [67] BAIYIN, Bateer, Kotaro TAGAWA, Mina YAMADA, Xinyan WANG, Satoshi YAMADA, Yang SHAO, Ping AN, Sadahiro YAMAMOTO a Yasuomi IBARAKI. Effect of Nutrient Solution Flow Rate on Hydroponic Plant Growth and Root Morphology. *Plants* [online]. 2021, **10**(9), 1840. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants10091840
- [68] ZHANG, Li-Min, Yu JIN, Si-Mei YAO, Ning-Fei LEI, Jin-Song CHEN, Qian ZHANG a Fei-Hai YU. Growth and Morphological Responses of Duckweed to Clonal Fragmentation, Nutrient Availability, and Population Density. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2020, **11**. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2020.00618
- [69] GREEN, Dannielle Senga, Megan JEFFERSON, Bas BOOTS a Leon STONE. All that glitters is litter? Ecological impacts of conventional versus biodegradable glitter in a freshwater habitat. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2021, **402**, 124070 [vid. 2023-04-28]. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2020.124070

- [70] ZHANG, Hanma, Andrea JENNINGS, Peter W. BARLOW a Brian G. FORDE. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1999, **96**(11), 6529–6534. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.96.11.6529
- [71] MARTÍNEZ-TOBÓN, Diana Isabel, Maryam GUL, Anastasia Leila ELIAS a Dominic SAUVAGEAU. Polyhydroxybutyrate (PHB) biodegradation using bacterial strains with demonstrated and predicted PHB depolymerase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2018, **102**(18), 8049–8067. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-018-9153-8
- [72] RICHARD, Heather, Edward J. CARPENTER, Tomoko KOMADA, Peter T. PALMER a Chelsea M. ROCHMAN. Biofilm facilitates metal accumulation onto microplastics in estuarine waters. *Science of The Total Environment* [online]. 2019, **683**, 600–608. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.04.331
- [73] 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* [online]. 2022, **9**(1), 75. ISSN 2196-5641. Dostupné z: doi:10.1186/s40538-022-00345-9
- [74] IQBAL, Jamshaid, Atif JAVED a Muhammad Anwar BAIG. Growth and nutrient removal efficiency of duckweed (*lemna minor*) from synthetic and dumpsite leachate under artificial and natural conditions. *PLOS ONE* [online]. 2019, **14**(8), e0221755. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0221755
- [75] GOPALAPILLAI, Yamini, Bernard VIGNEAULT a Beverley A HALE. Root length of aquatic plant, *Lemna minor* L., as an optimal toxicity endpoint for biomonitoring of mining effluents. *Integrated Environmental Assessment and Management* [online]. 2014, **10**(4), 493–497. ISSN 15513777. Dostupné z: doi:10.1002/ieam.1558
- [76] Nitrogen Deficiency In Crops: How To Detect & Fix It. *EOS Data Analytics* [online]. 2021 [vid. 2023-05-13]. Dostupné z: <https://eos.com/blog/nitrogen-deficiency/>

## 8 SEZNAM ZKRATEK

EC50	efektivní koncentrace s účinkem na 50 % testovacích organismů
EPS	pěnový polystyren
LC50	letální koncentrace vzorku způsobující 50% mortalitu testovacích organismů
LD50	letální dávka vzorku způsobující 50% mortalitu testovacích organismů
LOEC	nejnižší koncentrace s pozorovaným účinkem (Lowest observed effect concentration)
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se střední délkou řetězce (medium chain length PHA)
MP	mikroplasty
NOEC	nejvyšší koncentrace, při které není pozorován účinek na testovací organismus (No observed effect concentration)
P3HB	poly(3-hydroxybutyrát)
PE	polyethylen
PET	polyethylentereftalát
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PLA	kyselina polymléčná
POPs	perzistentní organické látky
PP	polypropylen
PS	polystyren
PVC	polyvinylchlorid
REACH	nařízení EU o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals)
scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkou délkou řetězce (short chain length PHA)
T <sub>m</sub>	teplota tání