



# 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

## VYUŽITÍ ORGANISMU DAPHNIA MAGNA V MULTIGENERAČNÍM TESTU EKOTOXICITY

USE OF THE ORGANISM DAPHNIA MAGNA IN A MULTIGENERATIONAL ECOTOXICITY TEST

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristýna Klasová

### VEDOUČÍ PRÁCE

SUPERVISOR

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

BRNO 2023

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1867/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany  
životního prostředí  
Studentka: **Kristýna Klasová**  
Studijní program: Aplikovaná analytická,  
environmentální a forenzní chemie  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **doc. MVDr. Helena Zlámalová**  
**Gargošová, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Využití organismu *Daphnia magna* v multigeneračním testu ekotoxicity

### Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat rešerši na téma využití multigeneračních testů v ekotoxikologii se zaměřením na organismus *Daphnia magna*.
2. Provést testování mikročástic PHB prostřednictvím multigeneračního testu na hrotnatce menší.
3. Vyhodnotit výsledky testu a posoudit vliv těchto látek na zástupce akvatického ekosystému.

### 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.

-----  
Kristýna Klasová  
studentka

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

-----  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

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

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce zabývá multigeneračním vlivem mikročastic biodegradabilního polymeru polyhydroxybutyrátu (P3HB) na sladkovodní organismus *Daphnia magna*. Přítomnost mikroplastů v životním prostředí je často diskutovaným environmentálním problémem, proto je vyvíjena snaha o vývoj v oblasti biodegradabilních plastů, které se v životním prostředí snadněji rozkládají. Nejvíce prostudovaným biopolymerem je P3HB, nicméně o jeho ekotoxicitě zatím není mnoho informací. V rámci této práce byla ekotoxicita hodnocena pomocí multigeneračního testu, navíc byl vliv mikročastic P3HB porovnán s vlivem přírodně se vyskytujících částic. Multigenerační testy nejsou zatím pro ekotoxikologické hodnocení běžně využívány, nabízejí však komplexní a realistický pohled na účinek testované látky na testovací organismy. V rámci této práce byly 4 generace organismu *D. magna* exponovány mikročasticemi P3HB a pro porovnání přírodními mikročasticemi kaolinu. Výsledky neprokázaly žádný negativní vliv na mortalitu organismu, byl však zaznamenán mírný pokles reprodukční aktivity.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with the multigenerational effect of microparticles of the biodegradable polymer polyhydroxybutyrate (P3HB) on the freshwater organism *Daphnia magna*. The presence of microplastics in the environment is a frequently discussed environmental problem, hence efforts are being made to develop biodegradable plastics that would degrade more easily in the environment. The most studied biopolymer P3HB, however, there is not much information on its ecotoxicity yet. In the context of this work, ecotoxicity was assessed using a multigeneration assay; in addition, the effect of P3HB microparticles was compared to that of naturally occurring particles. Multigeneration assays are not yet commonly used for ecotoxicological evaluation, but they offer a comprehensive and realistic view of the effect of the test substance on the test organisms. In this work, 4 generations of *D. magna* were exposed to P3HB microparticles and kaolin microparticles for comparison. The results showed no negative effect on the mortality of the organism, but a slight decrease in reproductive activity was observed.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Multigenerační test, polyhydroxybutyrát, ekotoxicita, *Daphnia magna*, mikroplasty

## **KEY WORDS**

Multigenerational test, polyhydroxybutyrate, ecotoxicity, *Daphnia magna*, microplastics

KLASOVÁ, Kristýna. Využití organismu *Daphnia magna* v multigeneračním testu ekotoxicity [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-22]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/147603>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Helena Zlámalová Gargošová.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....

podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D. za její cenné rady a odborné vedení při zpracovávání bakalářské práce. Také děkuji své konzultantce Ing. Petře Procházkové za její vedení během experimentu a za její ochotu vždy poradit během vyhodnocení práce. Děkuji své rodině a svým nejbližším za podporu při studiu.

## OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
	2.1 Ekotoxikologie .....	8
	2.2 Mikroplasty v životním prostředí.....	9
	2.3 Testy toxicity na organismu <i>Daphnia magna</i> .....	10
	2.4 Modelový živočich <i>Daphnia magna</i> .....	11
	2.5 Praktické využití multigeneračních testů na <i>Daphnia magna</i> .....	16
	2.6 Testovaná látka P3HB .....	19
3	Praktická část.....	29
	3.1 Použité přístroje .....	29
	3.2 Příprava média ASTM .....	30
	3.3 Chov testovacích organismů .....	30
	3.1 Testovaná látka P3HB .....	30
	3.2 Postup při testování .....	31
4	Výsledky .....	32
	4.1 Reprodukční aktivita .....	32
	4.2 Mortalita.....	36
5	Diskuse.....	37
6	Závěr .....	39
7	Bibliografie .....	40

# 1 ÚVOD

Lidská společnost produkuje velké množství chemických látek, které využívá v průmyslu, zemědělství, lékařství a mnoha dalších oblastech. Mezi těmito látkami mají důležitou roli plasty, které jsou velmi odolné rozkladu, což je pro jejich využití velkou výhodou. V životním prostředí se však rozpadají na mikro až nano částice, které ve složkách životního prostředí přetrvávají po mnoho let. Plasty jsou díky svým fyzikálním a chemickým vlastnostem hojně využívány v našem každodenním životě, na životní prostředí však mají negativní dopad. Velké množství plastových odpadů, popř. jejich fragmentů, se dostává do půdy, vody, vzduchu a následně i do potravin a organismů. Mikroplasty mají negativní účinky na složky životního prostředí, dochází k jejich kumulaci, mohou způsobovat úhyn živočichů a rostlin, zhoršení kvality vody a půdy.

V posledních letech je vyvíjena snaha některé plasty nahradit bioplasty vyráběnými z přírodních zdrojů jako jsou například kukuřičné škroby, cukrová třtina nebo odpadní oleje, na rozdíl od tradičních plastů, které jsou vyráběny z ropy. Bioplasty mají mnoho výhod, jako je např. snížení závislosti na fosilních palivech. Nicméně, i přesto, že bioplasty jsou považovány za šetrnější k životnímu prostředí než tradiční plasty, mohou být biologicky odbourávány pouze za určitých podmínek a pokud jsou uloženy v běžném odpadu, mohou se rozkládat velmi pomalu a kumulovat se v životním prostředí. Je tedy velmi důležité znát ekotoxikologická rizika těchto materiálů. Tato rizika můžeme studovat a hodnotit pomocí biotestů toxicity, tj. experimentálních metod, které se používají k posuzování toxicity různých chemických látek na živé organismy. Cílem těchto testů je určit, jaké je minimální množství látky, které může být toxické pro daný organismus.

Výsledky těchto testů pomáhají predikovat vliv různých chemických látek na životní prostředí a jejich ekotoxikologická rizika. Tyto informace jsou důležité pro vytváření regulací a opatření, které minimalizují vliv těchto látek na životní prostředí a pro ochranu zdraví lidí a zvířat. V ekotoxikologii jsou běžně prováděny akutní testy a chronické testy s jednou generací testovacího organismu. Realističtější pohled na toxicitu testované látky v životním prostředí by mohl přinést test trvající po vícero generací. Multigenerační testy mohou pomoci identifikovat možné dlouhodobé a kumulativní účinky na organismy dalších generací.

## **2 TEORETICKÁ ČÁST**

### **2.1 Ekotoxikologie**

Toxické látky v životním prostředí vyvolávají nepříznivé účinky na všech úrovních biologické organizace od molekulární úrovně až po společenstvo a ekosystém. Ekotoxikologie je přírodní věda, která se zabývá toxickým působením přírodních i antropogenních látek na různé úrovně ekosystémů. Monitoruje interakce mezi živými organismy a chemickými látkami a transport látek v životním prostředí. Ekotoxikologie je velmi náročná a komplexní disciplína na pomezí ekologie a toxikologie, zatímco klinická toxikologie studuje toxické účinky látek na člověka, tedy na jeden biologický druh, ekotoxikologie se zabývá působením těchto látek na celá společenstva živých organismů [1,2].

#### **2.1.1 Význam ekotoxikologie**

Testování možných ekotoxických účinků chemických látek dostávajících se do životního prostředí je důležité pro zachování kvalitních ekosystémů dalším generacím. Kvalitní pitná voda, čistý vzduch, zemědělské suroviny, dřevo atd., jsou pro život člověka nezbytné. Poškození funkčnosti ekosystémů toxickými látkami vede ke snížení kvality těchto důležitých složek životního prostředí [1,3].

Poznatky ekotoxikologie jsou aplikovány i v dalších vědách o životním prostředí. Ekotoxikologické metody jsou používány pro naplňování zákonů týkajících se ochrany životního prostředí např. Hodnocení vlivů na životní prostředí EIA, Hodnocení environmentálních rizik ERA, Zákon o chemických látkách a zákon o odpadech [1].

#### **2.1.2 Cíl ekotoxikologie**

Cílem ekotoxikologie je porozumět vzájemným interakcím mezi chemickými látkami antropogenního i přírodního původu přítomným v životním prostředí na všechny úrovně ekosystémů. Dále vývoj metod, které umožňují sledovat vliv chemických látek na živé organismy v ekosystémech za standardních a reprodukovatelných podmínek. Tyto poznatky jsou důležité nejen z hlediska ochrany životního prostředí, ale také z hlediska hospodářského [1]. Praktickým cílem ekotoxikologie je tedy posuzovat účinky, které mohou toxikanty přinášet, a navrhnout ochranná opatření. Rostoucí množství chemických látek dostávajících se do životního prostředí, zvyšuje význam ekotoxikologie [3].

#### **2.1.3 Nástroje ekotoxikologie**

Nástrojem ekotoxikologie jsou ekotoxikologické testy s živými organismy, které jsou využívány k odhadu možného negativního účinku chemických látek. Souhrně



se pro experimenty prováděné na živých systémech, tj. buňkách, organismech a ekosystémech, používá označení biotesty. Ekotoxikologie na rozdíl od analytické chemie neposkytuje informace o tom, jaká látka a v jaké koncentraci je přítomna ve vzorku, díky biotestům je zjišťováno, zda a do jaké míry vzorek ovlivňuje testovací systém [1].

Biotesty můžeme rozdělit na specifické: prezentují přítomnost určitých toxických látek nebo toxických účinků, a nespecifické: prezentují celkové toxické účinky všech látek přítomných v testovacích systémech. Dále můžeme biotesty dělit podle testované složky životního prostředí, kdy může být testována voda, půda, vzduch, sediment apod. Nazývají se podle prostředí, ve kterém test probíhá, tj. testy akvatické a terestrické. Cílem akvatických testů je určit účinek testované látky nebo vzorku na organismy vodního prostředí. Testy terestrické umožňují posouzení možných toxických účinků chemických látek a vzorků na půdní ekosystémy. Nejčastěji používaným testovacím organismem v akvatické ekotoxikologii je zástupce drobných korýšů *Daphnia magna* [1,4].

## 2.2 Mikroplasty v životním prostředí

Díky schopnosti plastů odolávat environmentálním faktorům, chemikáliím, mikroorganismům a hydrolýze dochází ke hromadění plastového odpadu po celém světě. Velké množství plastového odpadu se hromadí v životním prostředí a rozpadá se na mikroplasty. Mikroplasty můžeme rozdělit na primární a sekundární. Primární mikroplasty jsou vyráběny záměrně, využívají se v např. kosmetice nebo v obráběcích směsích. Sekundární mikroplasty jsou částice uvolňované z výrobků při jejich využívání, otěrem plastových výrobků nebo jejich rozpadem. Nejvíce sekundárních plastů vzniká při otěru pneumatik, praní prádla, v zemědělství a při nevhodném nakládání s odpadem [5, 6].

Tyto částice se kumulují ve všech složkách životního prostředí a mohou mít negativní vliv na živé organismy i člověka. Expozice mikroplasty ve všech biologických systémech může způsobit oxidativní stres, zánětlivé léze. Neschopnost imunitního systému odstranit syntetické částice může vést k chronickému zánětu a zvýšit riziko tvorby nové tkáně. Mikroplasty mohou fungovat jako transportní médium pro kontaminanty např. DDT a hexachlorbenzen i patogeny, které se dostávají do těl organismů společně s mikroplasty. Částice mikroplastů byly již nalezeny i v lidském těle. K expozici člověka i dalších organismů mikroplasty může docházet požitím, vdechnutím nebo dermálním kontaktem v důsledku přítomnosti mikroplastů v produktech, potravinách a vzduchu. [6,7].

## 2.3 Testy toxicity na organismu *Daphnia magna*

Testy toxicity na organismu *D. magna* poskytují informace o působení chemických látek antropogenního i přírodního původu na zástupce drobných planktonních korýšů. Tyto testy lze podle doby expozice rozdělit na testy akutní, semichronické a chronické. Do poslední jmenované skupiny se také řadí testy multigenerační.

### 2.3.1 Akutní test toxicity

Testy akutní toxicity se vyznačují kratší dobou expozice a také jednorázovou expozicí testovacích organismů testovanou látkou, která je podávána v poměrně vysoké koncentraci. U akutního testu je sledována hlavně mortalita, ale také imobilizace organismů. [1, 8]

Pokud chybí jakékoli informace o ekotoxicitě zkoumané látky, volí se pro testování koncentrační řada v širokém rozmezí koncentrací, přičemž každá koncentrace je testována ve čtyřech opakováních. Součástí každého testu je kontrolní skupina organismů, kterým není testovaná látka podána, v této skupině jsou zachovány stejné podmínky jako ve skupinách testovacích. Po uplynutí 24 a 48 hodin jsou na základě zjištěné mortality a imobilizace vypočteny ekotoxikologické indexy. V případě akutního testu s *D. magna* jsou to hodnoty 24, 48 EC50, tedy koncentrace, která za 24 popřípadě za 48 hodin způsobí smrt, popř. imobilizaci u 50 % testovacích jedinců [1,8].

### 2.3.2 Chronický test toxicity

Chronické testy toxicity na tomto organismu probíhají po delší dobu (období zhruba 1 měsíce), testovaná látka je podávána opakovaně v nízkých koncentracích. Dochází také v pravidelných intervalech k výměně média s testovanou látkou, aby nedocházelo k hromadění metabolitů a k ovlivnění výsledků testu. U chronických testů sledujeme nejčastěji reprodukční aktivitu, dále je možno sledovat velikost těla mateřských organismů, zbarvení nebo také mortalitu. Negativní efekt se může projevit až u potomků testovacích organismů.

Tento test probíhá podle metodiky OECD 211 [9]. Během testu zaznamenáváme počet narozených jedinců v různých koncentracích testované látky a kontrole. Expoziční doba je podle OECD 211 [9], 21 dní, roztoky s testovanou látkou jsou měněny třikrát týdně. Organismy by měly být krmeny denně, nejméně však třikrát týdně společně s výměnou roztoků. [1, 9]

Výstupem testu je celkový počet narozených jedinců na jeden mateřský organismus v různých koncentracích testované látky a v kontrole. Zjišťujeme toxické indexy NOEC

(koncentrace při které nejsou pozorovány žádné účinky látky) a LOEC (nejnižší koncentrace, při které je již účinek látky pozorován) [9].

### 2.3.3 Multigenerační test

Multigenerační test probíhá po delší dobu, je sledován vliv testované látky na několik generací testovacího organismu. Testovaná látka je podávána opakovaně během celého testu po malých dávkách, přičemž koncentrace zkoumané látky reflektuje koncentrace běžně se vyskytující v životním prostředí, popř. je na úrovni hladin NOEC a LOEC zjištěných prostřednictvím chronických testů. Jedná se vlastně o několik chronických testů toxicity navazujících přímo na sebe [10].

Multigenerační test není prozatím ošetřen žádnou normou, proto tyto testy vycházejí z poznatků vědecké literatury. Řada studií poukazuje na fakt, že látky vyskytující se v životním prostředí v nízkých koncentracích mohou negativně ovlivnit další generace organismů, aniž by ovlivnily mateřské organismy přicházející do styku s těmito látkami. Potomci mohou být citlivější nebo tolerantnější k testované látce oproti rodičovské generaci. Jelikož multigenerační test studuje efekt zkoumané látky v koncentraci, ve které se běžně vyskytuje v životním prostředí, nabízí mnohem reálnější pohled na účinky látek, než test akutní nebo chronický [10, 11].

## 2.4 Modelový živočich *Daphnia magna*

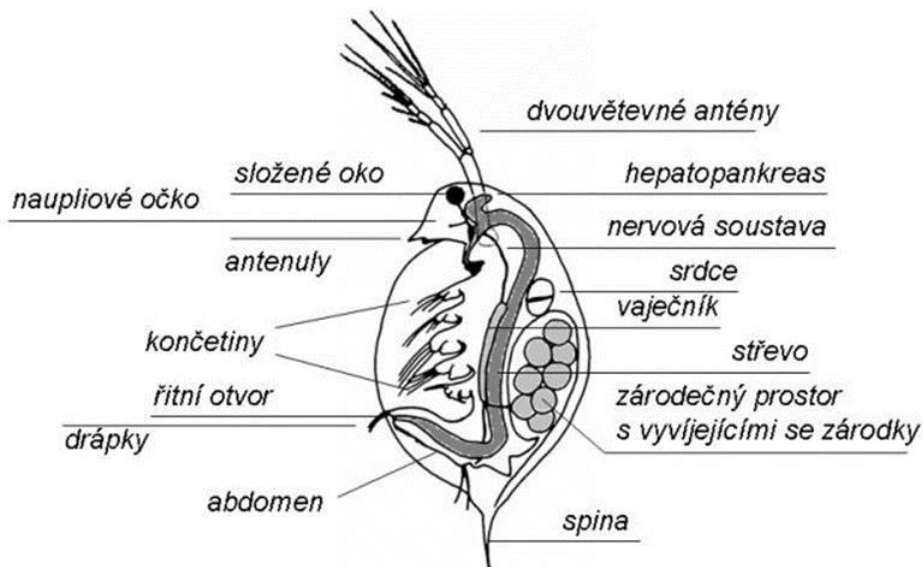
Organismus *D. magna* je typickým zástupcem rodu hrotnatek (*Daphnia*), jedná se o jeden z největších druhů tohoto rodu, česky tento rod nazýváme hrotnatka nebo také perloočka. Perloočky jsou starověkou skupinou paleozoického původu. Je známo již více než 100 druhů organismů rodu *Daphnia*, vyskytují se po celém světě. Taxonomicky se řadí do čeledi hrotnatkovití (*Daphniidae*), řádu perloočky (*Cladocera*), třídy korýši (*Crustacea*) a kmene členovci (*Arthropoda*) [4, 12].

Tento organismus je také přezdíván jako „vodní blecha“, s blechami však není nijak příbuzný, toto označení hrotnatky získaly díky jejich pohybu, „skáčou“ během plavání. Jedná se o drobného vodního korýše vyskytujícího se nejčastěji ve sladkých stojatých vodách, kde může být potravou pro ryby a další organismy. Hrotnatky se živí planktonními řasami, tím zabraňují přemnožení řasy ve vodním ekosystému, napomáhá tedy ke správnému fungování ekosystému [4, 13].

### 2.4.1 Obecný popis a stavba těla

*D. magna* je drobný organismus, který je však pohodlně viditelný pouhým okem. Tento organismus je odděleného pohlaví, pohlavní dimorfismus je zřetelně viditelný. Délka těla dospělé samičky dosahuje 5 mm bez započítání helmy a spiny. Dospělí samečci jsou výrazně menší jejich tělo dorůstá délky 2 mm [4].

Zploštělé tělo tvořené z článků je chráněno průhledným krunýřem tvořeným polysacharidem chitinem. Krunýř má dvojitou stěnu, mezi stěnami protéká bezbarvá hemolymfa, ve které je volně uložen hemoglobin, *Daphnie* tedy mají otevřený krevní oběh. Díky průhlednému tělu můžeme pozorovat vnitřní orgány. Srdce je uloženo na zadní straně těla, bije zhruba 200 úderů za minutu, při nižších teplotách zpomaluje. Krevní buňky proudí tělní dutinou, pod mikroskopem je můžeme pozorovat skrz průhledné tělo. U samic se pod srdcem nachází zárodečný prostor na vajíčka [4]. Stavba těla tohoto organismu viz Obrázek 1.



Obrázek 1: Stavba těla samice perloočky [1].

Z ochranného krunýře vyčnívá hlava se dvěma dvouvětevnými anténami a velkým složeným okem doplněným o oko naupliové. Perloočky mají až 10 párů výběžků: první pár tykadel sloužící jako smyslový orgán, druhý pár tykadel sloužící k pohybu, maxily a mandibuly sloužící k mechanickému zpracování potravy, následuje 5 nebo 6 drobných nožek na trupu (hrotnatka má 5 končetin), končetiny jsou využívány jako filtr k získávání částeczek potravy. Tělo je

zakončeno abdomenem (zadečkem), který je zahnutý pod břišní stranou těla a na jeho konci se nachází 1 pár výběžků „drápů“ [4].

Dvouvětevné antény jsou využívány jako hlavní pohybový aparát, těžiště těla perlooček se nachází u těchto antén, pomocí jejich úderů *D. magna* vykonává skákavý pohyb. Hrotnatky se pohybují ve vodním sloupci podle osvětlení, v noci migrují blíže k vodní hladině, ráno a během dne se vyskytují spíše ve větší hloubce vodní plochy. Toto chování je pravděpodobně chrání před predátory [4, 14].

Trávicí soustava je jako u všech členovců trubicová, dělí se na 3 části: ústní dutina: kousací ústrojí, kusadla, čelisti; střední část: hrtan, trávicí trubice, střevo; zadní část: přímá trubice končící řitním otvorem. Centrálním orgánem nervové soustavy je mozkové ganglium, které se nachází v hlavové části blízko oka [4].

#### **2.4.2 Výskyt a ekologie**

Hrotnatky jsou hlavně sladkovodní organismy, ale mohou se vyskytovat i ve vodě brakické a dokonce slané – *D. magna* snáší vyšší úroveň vodní salinity než většina ostatních druhů rodu perlooček, z tohoto důvodu se vyskytuje ve všech typech povrchových vod po celém světě. Mnohem častěji se nacházejí ve stojatých vodách než ve vodách tekoucích. Neobývají pouze extrémní stanoviště jako jsou horké prameny, velmi prudké toky nebo extrémně znečištěné vody [15, 16].

Všechny věkové skupiny hrotnatek dobře plavou a vyskytují se hlavně v pelagické oblasti příslušného vodního útvaru, tzn. vyskytují se v oblasti volné vody. Filtrují vodu, ve které se vyskytují, proto jsou pro ně vhodné stojaté organicky znečištěné vody např. mělké rybníky a jezera s hustou vegetací. Hrotnatky jsou důležitou součástí fauny sladkých vod hrají významnou roli v potravním řetězci vodního ekosystému. Jejich potravou jsou organické zbytky a samy jsou potravou ryb [4, 12].

#### **2.4.3 Potrava**

Hrotnatky se živí malými organickými suspendovanými částicemi ve vodě jako jsou řasy nebo bakterie. Tuto potravu přijímají filtrováním pomocí zploštělých končetin. Končetiny rozvíří vodu, vznikne proud, ten protéká od přední části těla k zadní části a voda je pomocí pohybu končetin nasávána do filtračního prostoru, tato fáze se nazývá addukční. Na konci této fáze je odfiltrovaná potrava shromažďována v postranní břišní rýze a odtud se přetlakem dostává do ústního prostoru, kde je pomocí kusadel rozdrcena a polknuta pomocí čelistí [4].

Nejčastější a v laboratoři nejhojněji používanou potravou pro hrotnatky je zelená řasa. Používají se řasy rodu *Scenedesmus* nebo *Chlamydomonas* pro jejich snadnou kultivaci. *Daphnie* obvykle konzumují částice o velikosti od 1 µm do 50 µm [4].

Barva těchto organismů je dána potravou, která v jejich jídelníčku převládá. *Daphnie* živící se zelenými řasami jsou průhledné se zeleným nebo žlutým nádechem, zatímco ty, které se živí bakteriemi, jsou bílé nebo lososově růžové. Dobře živěné organismy jsou výrazněji zbarveny než organismy hladovějící [4].

#### 2.4.4 Rozmnožování

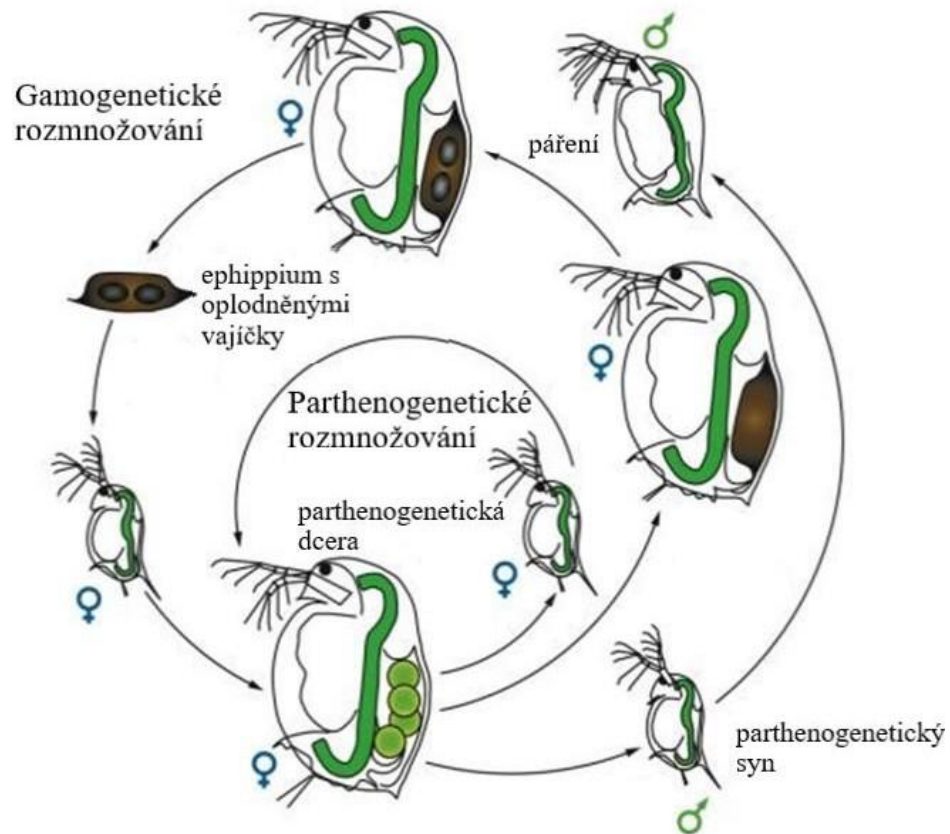
Hrotnatky jsou odděleného pohlaví, samečci jsou zřetelně menší než samičky, dále mají delší druhý pár antén. a jejich první pár nohou je modifikován, je přeměněn na silně zahnutý kopulační háček s brvou. Perloočky se rozmnožují partenogeneticky i gamogeneticky. V populaci díky převládajícímu partenogenetickému neboli asexuálnímu rozmnožování převládají samičky. Samička produkuje snůšku partenogenetických vajíček, ze kterých se líhnou další partenogenetické samičky. Vývoj vajíček je okamžitý, při 20 °C se embrya líhnou z vajíček asi po 1 dni, zůstávají však v zárodečném prostoru, kde se dále vyvíjejí. Zhruba po 3 dnech jsou mláďata vypouštěna matkou ventrální flexí abdomenu [4].

Nově narození jedinci vypadají téměř jako dospělé hrotnatky, pouze jsou menší a samičky nemají vyvinut zárodečný prostor. Mladé hrotnatky projdou několika juvenilními stádii, než dospějí a poprvé produkují vajíčka. Jednotlivá stádia jsou oddělena svlékáním chitinové skořápky – svlečky. Stádia před dosažením dospělosti jsou označována jako preadultní, po dosažení dospělosti je označujeme jako adultní. Stádium, kdy v zárodečném prostoru poprvé vzniknou vajíčka, je označován jako primipara a jedná se o první adolescentní stádium. Stádia primipara dosáhne jedinec zhruba ve věku 5–10 dní. Záleží však na podmínkách okolního prostředí a výživě jedince. Nově narození potomci jsou označováni jako neonata. Dospělá samička může vyprodukovat snůšku vajíček každé 3–4 dny až do své smrti. V laboratoři mohou samičky žít déle než 2 měsíce [4].

Při partenogenetickém rozmnožování produkují hrotnatky diploidní vajíčka, která se vyvíjí přímo, bez klidové fáze, při gamogenetickém rozmnožování dochází k diferenciaci vajíček. Tato vajíčka procházejí klidovou fází, jsou haploidní a líhnou se z nich samečci nebo haploidní samičky. Vajíčka jsou v klidové fázi umístěna v ochranném obalu tzv. ephippiu. Díky ephippiím jsou zárodky schopné přežít i velmi nepříznivé podmínky a líhnout se až

za příznivých podmínek. Ke gamogenetickému rozmnožování dochází při změně vnějších podmínek, díky ehippiím má populace větší šanci na přežití [4].

Ve volné přírodě většinu roku dochází k rozmnožování partenogenetickému, populace je tedy tvořena pouze samicemi. Na podzim se do populace začnou dostávat i samečci a samičky začnou produkovat haploidní vajíčka, tato vajíčka jsou oplodněna samečkem a jsou odolná, přežijí zimu a na jaře se vylíhnou opět samičky [12]. Rozmnožovací cyklus viz Obrázek 2.



Obrázek 2: Rozmnožovací cyklus *D. magna*, upraveno dle [4].

### 2.4.5 Chov

Hrotnatky jsou schopné žít i v laboratorních podmínkách, proto jsou hojně využívány v laboratořích. Jsou chovány v médiu, pro jejich chov lze využít jakoukoli skleněnou nádobu, její velikost musíme uzpůsobit počtu jedinců, aby měl každý organismus dostatek prostoru pro svůj růst a vývoj. Hrotnatky je vhodné chovat v chladnější místnosti, teplota by měla být konstantní a měla by se pohybovat zhruba mezi 15–25 °C, neměla by být vyšší než 26 °C. Perloočky je doporučeno chovat ve světelném režimu 16 hodin světlo, 8 hodin tma.

Hrotnatky je možno chovat buď v přirozeném médiu nebo v médiu laboratorně připraveném. V případě přirozeného média, kterým je voda z nádrže, která již obsahuje řasy a organické zbytky, stačí pouze několikrát týdně vyměnit médium za čerstvé. Pokud perloočky chováme v médiu laboratorně připraveném musíme je pravidelně krmit. Nejčastěji se ke krmení v laboratoři používá zelená řasa kultivovaná souběžně s chovem *Daphnií*. Perloočky krmíme v určitém intervalu, který je závislý na objemu kultivačního média, množství krmených jedinců a hustotě a množství krmiva, je tedy pro každý chov individuální. Výhodou použití laboratorně připraveného média je přesná znalost jeho chemického složení. Chov hrotnatek musíme pravidelně kontrolovat, sledujeme vzhled jedinců, porodnost, mortalitu, barvu (dobře krmené perloočky by neměly být příliš průhledné) a výskyt samečků.

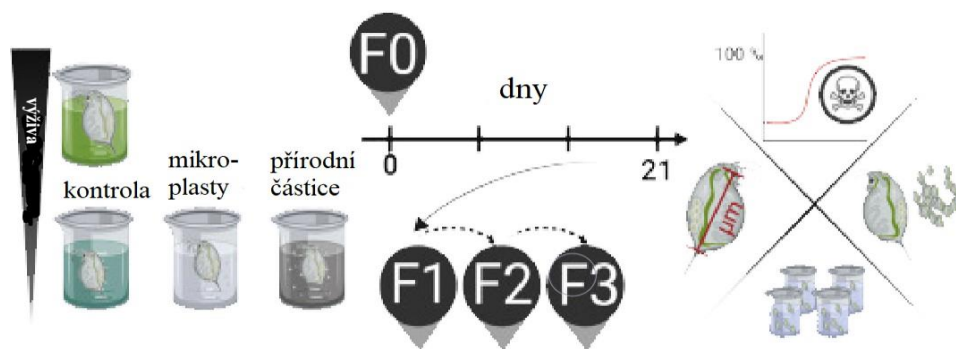
## 2.5 Praktické využití multigeneračních testů na *Daphnia magna*

Multigenerační testy s organismem *D. magna* byly již několikrát úspěšně provedeny, jejich prostřednictvím byl testován vliv mikroplastů a nanoplastů na akvatické ekosystémy, dále byla testována některá léčiva, pesticidy a také těžké kovy. [11,17,18,19,20]

### 2.5.1 Multigenerační testy s mikroplasty

Multigenerační studie zabývající se vlivem mikroplastů zkoumala negativní vliv mikročástic polystyrenu o velikosti  $\leq 63 \mu\text{m}$  na organismus *D. magna*. Aby byl vyloučen negativní vliv částic jako takových, byl souběžně testován i vliv částic přírodního původu – kaolinu. Tento test byl prováděn po 4 generace, jako přídatný reálný stresor byla organismům podávána potrava pouze v malém množství. Byla sledována mortalita, reprodukční aktivita, a rychlost růstu. Zatímco nebyl zaznamenán negativní vliv mikročástic kaolinu na žádný ze sledovaných ukazatelů mikročástice polystyrenu negativně ovlivnily mortalitu, reprodukci i růst [11]. Schéma tohoto testu viz Obrázek 3.





Obrázek 3: Schéma multigeneračního testu zabývajícího se mikroplasty [11].

Jiná multigenerační studie zkoumala také vliv částic polystyrenu, studované částice byly ještě menší než mikročástice, jednalo se o nanočástice. Vliv těchto nanočástic byl testován v koncentraci 1  $\mu\text{g/L}$  po 3 generace organismu *Daphnia pulex*, organismus blízké příbuzný *D. magna*. Byla sledována mortalita, reprodukční aktivita, růst a genová exprese. Mortalita nebyla nijak ovlivněna. Reprodukční aktivita nebyla ovlivněna u prvních dvou generací, poklesla až u třetí generace. U této generace byla také změněna genová transkripce související s reprodukcí, antioxidanty, buněčným stresem a vývojem u třetí generace [10].

Individuálními a kombinovanými multigeneračními účinky indukovanými polystyrenovým nanoplastem a glyfosátem u *D. magna* se zabývala další z provedených multigeneračních studií. Tento test probíhal po tři generace a testovanými látkami byla exponována pouze první generace, na dalších generacích byla posouzena možnost trvalého poškození po expozici rodičovských organismů testovaným látkám a jejich směsím. Zatímco samotný glyfosát neměl významný dopad na mortalitu a reprodukci druhé a třetí generace, polystyrenové mikroplasty a směs obou testovaných látek významně snížily reprodukční schopnost druhé a třetí generace [21].

Mikroplasty v životním prostředí mohou podléhat fyzikálně chemickým změnám, které mohou významně ovlivnit jejich toxicitu. Tato problematika byla zkoumána pomocí multigeneračního testu na organismu *D. magna*. Byly připraveny dvě suspenze, jedna obsahovala odpadní a jedna ultra čistou vodu, obě obsahovaly částice polystyrenu o velikosti ( $\leq 63 \mu\text{m}$ ). Organismy byly exponovány těmito částicemi v různých koncentracích po čtyři generace. Obě suspenze ovlivnily mortalitu, reprodukční schopnost i parametry jedinců. Suspenze s ultra čistou vodou způsobila vyhynutí třetí generace. Částice v odpadní vodě

způsobily nižší úmrtnost, odpadní voda nezměnila velikost, povrchový náboj a strukturu mikroplastů. Tato studie předpokládá, že adsorpce rozpuštěné organické hmoty je klíčovým procesem stárnutí snižujícím toxicitu mikroplastů [22].

### 2.5.2 Multigenerační testy s léčivy

Fluoxetin je běžné léčivo, používané jako antidepresivum, toto léčivo je považováno za potencionálně nebezpečné pro biotu kvůli jeho rostoucímu využívání a detekci v evropských, severoamerických a asijských řekách. Byly prováděny akutní i multigenerační testy zabývající se touto látkou, byla sledována mortalita, reprodukční schopnost a chování jedinců *D. magna*. Výsledky týkající se hodnocení multigenerační reprodukce neprokázaly vliv na organismy, který by mohl být považován za znepokojivý. Během experimentu nebyl pozorován žádný vliv na přežití ani jiné známky stresu, jako je tvorba ephippií (gametogenetických vajíček) nebo změna plodnosti [20].

Studie zabývající se multigenerační bioakumulací, biotransformací propranololu (léčiva používaného pro léčbu vysokého krevního tlaku) sledovala vliv této látky v environmentálně relevantní koncentraci na 11 generacích *D. magna*. Tělesná zátěž a hlavní metabolit, desisopropylpropranolol, propranololu byly kvantifikovány pomocí LC-MS/MS na konci každé generace. Bylo zjištěno, že biokumulaci propranololu v *D. magna* při environmentální koncentraci 0,2 µg/l se příliš nelišila mezi parentální a jedenáctou generací [23].

Další multigenerační studie se zabývala jednorázovou a kombinovanou toxicitou léčiv v environmentálně relevantních koncentracích. Test byl prováděn po 6 generacích *D. magna*, přičemž u první generace účinky ovlivnily v reprodukční schopnost a délku těla exponovaných organismů, v dalších generacích nebyl již detekován stejný vliv, možným vysvětlením tohoto výsledku je vývoj rezistence vůči testovaným léčivům [24].

### 2.5.3 Další multigenerační testy

Multigenerační test na *D. magna* byl také využit pro zjištění vlivu fungicidu karbendazimu. Organismy byly po dobu 12 generací exponovány koncentrací ekvivalentní NOEC karbendazimu. Byly pozorovány biomarkery (cholinesteráza, kataláza, a glutathion - S transferáza), reprodukční aktivita a délka života rodičovských organismů. Dlouhodobá expozice neměla žádný vliv na nárůst populace nicméně v poslední generaci byla snížena dlouhověkost a byly zjištěny značné změny týkající se biomarkerů. Bylo zjištěno, že karbendazim vyvolal některé účinky na subcelulární úrovni, které se promítly do změn v dlouhověkosti. Multigenerační expozice *D. magna* karbendazimu v koncentraci ekvivalentní

NOEC sice vyvolala nízké účinky, ale poskytla užitečné informace o tom, jak populace reagují na dlouhodobou chemickou expozici [25].

Studie zkoumající vztah mezi toxicitou a biokinetikou rtuti v populaci *D. magna* probíhala po dobu 10 generací. Pomocí vybraných biomarkerů bylo zjištěno, že organismus je schopen, přizpůsobit se chemickému stresoru, pokud je populace nepřetržitě vystavena subletální koncentraci tohoto stresoru ve vodě. Výsledky této studie prokázaly, že je velmi důležité studovat ekotoxikologii stopových kovů pomocí multigeneračního přístupu, spíše než jedné generace nebo bez jakékoli předchozí expozice [17].

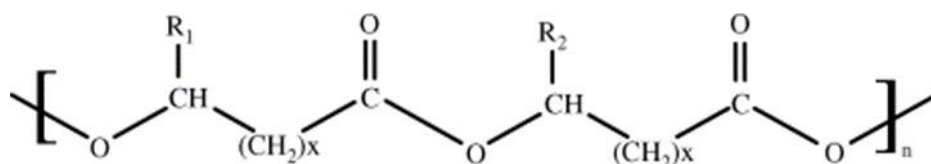
Úspěšně provedeným multigeneračním testem je také test vlivu perfluorooktansulfonátu (PFOS) na parametry jednotlivců a populační růst organismu *D. magna* při nepřetržité a přerušované expozici. Při nepřetržité expozici byly nepříznivé účinky související s růstem populace zjištěny během všech testovacích období a nepříznivý účinek měl tendenci být v pozdějších generacích slabší, individuální parametry (délka těla, váha) nebyly v první generaci ovlivněny, v dalších generacích se však zhoršovaly. Test probíhal po pět generací [18].

## 2.6 Testovaná látka P3HB

### 2.6.1 Obecný popis a zařazení

Poly-3-hydroxybutyrát (P3HB) je významným zástupcem skupiny látek nazývajících se polyhydroxyalkanoáty (PHA). Jedná se o látky, které by v budoucnosti mohly nahradit konvenční plasty, proto jsou předmětem zkoumání mnoha vědců. PHA jsou to polymery přírodního původu, jsou biodegradabilní, biokompatibilní a jejich vlastnosti jsou velmi podobné klasickým plastům [13].

PHA je skupinou lineárních polyesterů složených z 3, 4, 5 a 6 hydroxykyselin produkovaných některými druhy bakterií. Jejich obecná struktura je znázorněna viz Obrázek 4: Obecná struktura PHA,  $R1/R2 =$  alkylové skupiny,  $x = 1-4$ ,  $n = 100- 30\ 000$ . Těmito organismy jsou PHA syntetizovány jako zásobní látky, pokud se bakterie nachází ve stresových podmínkách; v prostředí s dostatkem uhlíku, ale nedostatkem dusíku, fosforu nebo kyslíku. PHA je tedy pro bakterie zásobním zdrojem uhlíku a energie. V bakteriální buňce jsou PHA přítomné ve formě cytoplazmatických inkluzí. Přebytný uhlík je ukládán intracelulárně, kdy se uvnitř buňky kolem polymeru zformuje vrstva složená z fosfolipidů a proteinů. Takto může být zásobní látka ve formě PHA využita, pokud se bakterie dostane do nevhodných podmínek [13, 26, 27, 28].



Obrázek 4: Obecná struktura PHA,  $R_1/R_2 =$  alkylové skupiny,  $x = 1-4$ ,  $n = 100- 30\ 000$  [26].

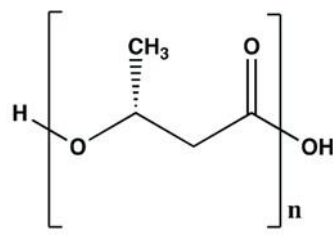
Všechny monomery, ze kterých se skládají PHA jsou vždy v R konfiguraci, je to způsobeno stereospecifitou biosyntetizujících enzymů. PHA můžeme rozdělit do 3 skupin podle počtu uhlíků v monomerních jednotkách. PHA obsahující 5 a méně uhlíků v monomeru řadíme do skupiny PHA s krátkým řetězcem neboli „short-chain-length PHA“ (scl-PHA). PHA s monomerními jednotkami obsahujícími 6-14 uhlíků patří do skupiny PHA se středním řetězcem „medium-chain-length PHA“ (mcl-PHA) a PHA s monomerními jednotkami obsahujícími více než 14 uhlíků řadíme do skupiny PHA s dlouhým řetězcem „long-chain-length PHA“ (lcl-PHA) [13].

### 2.6.2 Struktura a vlastnosti P3HB

PH3B je nejběžnějším zástupcem PHA s krátkým řetězcem a je také ze všech PHA nejlépe prostudovaný. PHB se vyznačuje vysokou krystalinitou, teplotu tání má kolem 180 °C, teplota skelného přechodu je 4 °C. Jedná se o slabě hydrofobní ve vodě nerozpustný materiál.

Vyznačuje se biodegradabilitou, biokompatibilitou a svými vlastnostmi se řadí mezi termoplasty. Svými vlastnostmi je podobný konvenčním plastům jako je polystyren nebo polyethylen. PHA mají velký potenciál pro využití v medicíně a farmacii, ale i pro výrobu komerčních produktů jako jsou vlákna a folie. Důležité je, že tento materiál je přírodní a ve vhodných podmínkách je rozložitelný na oxid uhličitý a vodu [13, 27, 28, 29].

Využití samotného P3HB v průmyslu je omezeno jeho křehkostí a pevností. Jeho vlastnosti můžeme zlepšit včleněním jiné monomerní jednotky např 3-hydroxyvalerátu (3HV) nebo 3-hydroxyhexanoátu (3HH), kdy získáme kopolymery se zlepšenými fyzikálně mechanickými vlastnostmi, tento kopolymer je pružný a pevný. Takovéto kopolymery jsou mnohem lépe tepelně zpracovatelné a elastičtější než samotné P3HB [13, 27]. Struktura P3HB viz Obrázek 5.

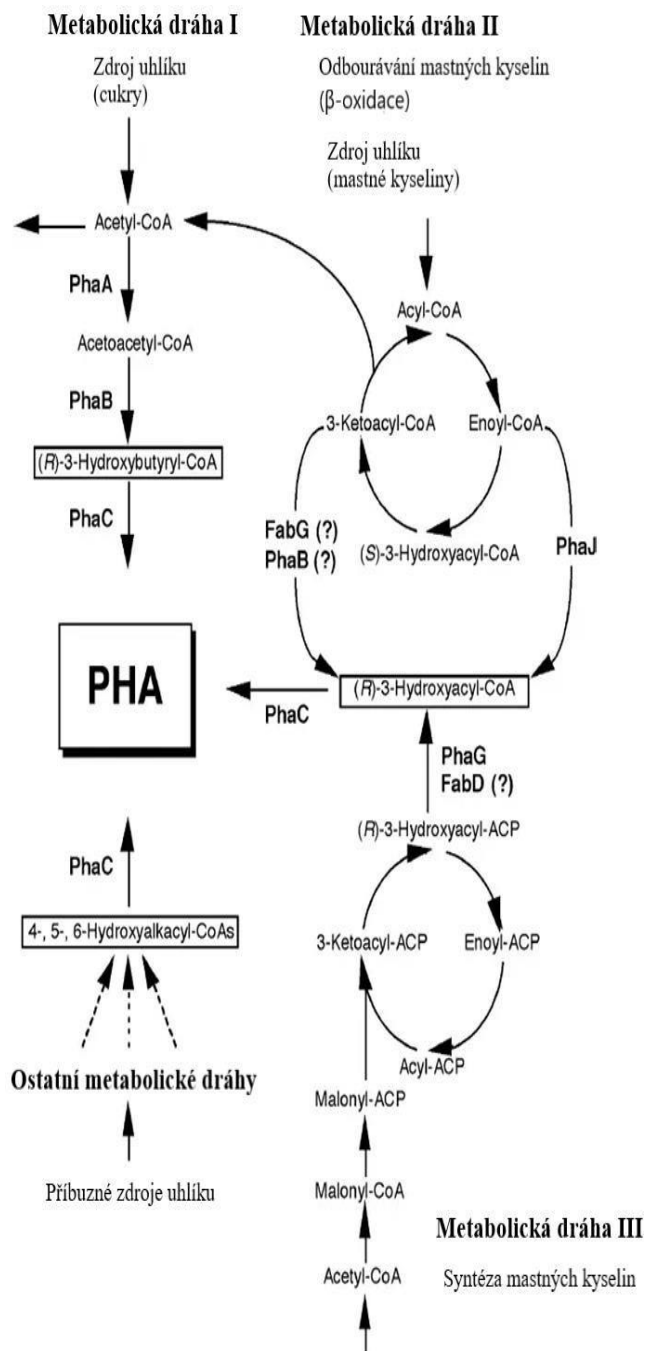


Obrázek 5: Struktura P3HB [30].

### 2.6.3 Biosyntéza

Biosyntéza PHA může probíhat různými metabolickými drahami, 4 nejběžnější jsou znázorněny viz Obrázek 6. Syntéza konkrétního PHA se vždy skládá ze dvou kroků: dodání substrátového monomeru a polymerace [13, 26].

Syntéza P3HB probíhá nejjednodušší z těchto biosyntetických drah, metabolická dráha I viz Obrázek 6. Syntéza PHB probíhá za pomoci tří enzymů a jejich kódujících genů ve třech krocích. V prvním kroku phaA gen, kóduje enzym  $\beta$ -ketothiolázu, pomocí tohoto enzymu probíhá kondenzace 2 molekul acetyl-CoA, ze kterých se zformuje jedna molekula acetoacetylu-CoA. Následuje redukce acetoacetylu-CoA na (R) 3-hydroxybutyryl CoA katalyzovaná enzymem acetoacetyl-CoA reductázou, tento enzym je kódován phaB genem a závislý na NADPH. Posledním krokem je polymerizace (R) 3-hydroxybutyryl CoA monomerů katalyzovaná enzymem PHA syntázou, kódovanou genem phaC. Všechny tři enzymy podílející se na syntéze PHB se nacházejí v buněčném cytosolu [13]. Kromě PHB bakterie syntetizuje i ostatní PHAs. Syntéza PHA v mikroorganismu je závislá na zdroji uhlíku. Zdroj uhlíku, který organismus využívá k syntéze je jedním z faktorů určujících typ produkovaného PHA, dalšími faktory jsou substrátová specifita PHA syntázy a dostupné biochemické dráhy [31].



Obrázek 6: Schéma metabolických drah PHAs probíhajících v mikroorganismech (PhaA -  $\beta$ -ketothioláza, PhaB – NADPH-dependentní acetoacetyl-CoA reduktáza, PhaC-PHA-syntáza, PhaG – 3-hydroxyacyl-ACP: CoA transferáza, PhaJ – (R)-enoyl-CoA hydratáza, FabD- malonyl CoA:ACP transacyláza, FabG 3-ketoacyl-CoA reduktáza), upraveno dle [31].

Dráhy zapojené do metabolismu mastných kyselin vytvářejí hydroxyalkanoátové monomery, které se využívají k syntéze PHA. Substrát pro syntézu PHA může tedy pocházet z  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, metabolická dráha II, viz Obrázek 6. Některé bakterie také dokážou syntetizovat PHA z některých alkanů, alkenů a alkanoátů. Složení monomeru souvisí s použitým zdrojem uhlíku. PHA syntázy, které katalyzují syntézu PHA z mastných kyselin, jsou také zodpovědné za syntézu PHA z glukózy, meziprodukty pro tuto syntézu byly získány ze syntézy mastných kyselin de novo – metabolická dráha III viz Obrázek 6. Pomocí této metabolické dráhy je možné získávat monomery pro syntézu ze strukturálně nesouvisejících levných a jednoduchých zdrojů uhlíku jako je glukóza nebo fruktóza [26].

#### **2.6.4 Produkce PHA a bakteriální producenti**

Biotechnologická produkce PHA z obnovitelných surovin nabízí udržitelnou alternativu za běžné plasty vyrobené z ropy a tím by mohla snížit závislost na stále vzácnějších fosilních palivech [27]. Komerční výroba bioplastů z PHA je založena na využití bakteriálních kultur grampozitivních i gramnegativních bakterií, jako je například *Cupriavidus necator*, rody: *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*. Schopnost syntetizovat PHA je prokázána již u více než 300 druhů organismů [13, 30], příklady některých z nich jsou uvedeny v Tabulka 1.

Tabulka 1: Příklady bakteriálních producentů a jejich zdrojů uhlíku pro syntézu PHB, uvedeno v procentech na suchou hmotnost bakteriální buňky [30].

<b>bakteriální kmen</b>	<b>zdroj uhlíku</b>	<b>PHB %</b>
<i>Alcaligenes latus</i>	slad, sójový a mléčný odpad	70
<i>Azotobacter chroococcum H23</i>	odpadní voda z lisoven olivového oleje	80
<i>Bacillus cereus UW85</i>	glukóza	9
<i>Cupriavidus necator DSM 545</i>	kukuřičný sirup	30
<i>Cupriavidus necator DSM 545</i>	odpadní glycerol	62
<i>Enterobacter aerogenes 12Bi</i>	odpadní voda	43
<i>Escherichia coli mutants</i>	xylóza	27
<i>Pseudomonas aeruginosa NCIB 40045</i>	zemědělsko – průmyslový olejový odpad	66
<i>Pseudomonas hydrogenovora DSM 1749</i>	mléčná syrovátka	21
<i>Pseudomonas putida CA-3</i>	petrochemický plastový odpad	30
<i>Pseudomonas fluorescens A2a5</i>	likér z cukrové třtiny	70

Produkce bioplastů je značně omezena vysokými náklady oproti nákladům na výrobu klasických plastů z ropy. Celková cena produkce závisí na několika faktorech, důležitý je substrát, výtěžek a proces purifikace a extrakce. Tyto faktory nutí vědce zaměřit pozornost na snižování nákladů pomocí levných obnovitelných zdrojů a na vývoj účinných metod separace a purifikace [27].

Z analýz vyplývá, že uhlíkový substrát tvoří zhruba 20-45 % celkové ceny produkce PHA z obnovitelných zdrojů, proto je důležité využívat takové uhlíkové suroviny, aby byla výroba bioplastů z PHA konkurence schopná výrobě plastů založených na ropě. Substrátem



pro syntézu jsou hlavně sacharidy, proto je výhodné využívat vedlejší produkty zemědělské výroby, které obsahují velké množství sacharidů, jako například brambory, rýžové otruby, melasa, syrovátka, sacharóza. Dále jsou to vedlejší produkty průmyslové výroby např. glycerol, který vzniká jako odpad při výrobě biodieselu nebo např. odpadní vody obsahující organické látky. Ekologicky výhodným zdrojem jsou odpadní oleje ze smažení a fritování, které se v současnosti velmi obtížně likvidují. Výroba PHA z odpadních olejů se však ekonomicky vyplatí jen pokud jsou dostupné ve velkém množství. [27, 28, 32].

### **2.6.5 Metody izolace a purifikace PHA**

Průmyslová výroba PHA se skládá z kultivační části a z izolační a purifikační části. Část kultivační zahrnuje výběr vhodného bakteriálního kmenu. Organismů schopných syntetizovat PHA je sice velké množství, nicméně ne všechny jsou vhodné pro průmyslovou výrobu. Prozkoumaným a nejhojněji využívaným organismem pro průmyslovou výrobu je *Cupriavidus necator*. Kultivační část ovlivňuje pH, strategie dávkování živiny, poměr uhlíkaté suroviny ke zdroji dusíku atd. Je vyvíjena snaha o dosažení co největší koncentrace buněk v kultivačním mediu a co nejvyššího podílu PHA na hmotnosti buněk. Kultivaci lze provádět vsádkově, kontinuálně i semikontinuálně [28, 33].

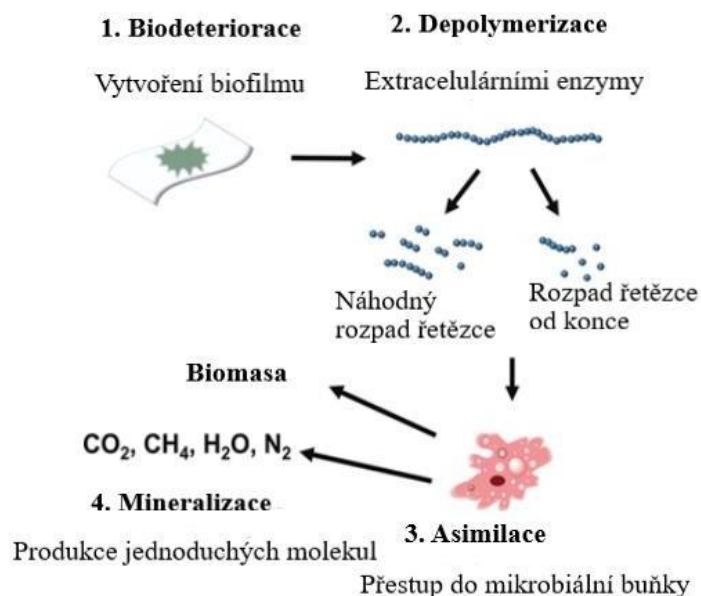
Dalším krokem průmyslové výroby je izolace PHA z mikrobiálních buněk. Izolace je stejně jako výběr vhodného uhlíkového substrátu velmi významnou součástí celkové ceny produkce bioplastů. Je tedy vyvíjena snaha minimalizovat náklady (energie, odpadové hospodářství) a zároveň uspokojit vysoké nároky na výtěžek a čistotu produktu. Vlastní izolaci PHA z buněk předchází zakoncentrování kultivačního média. Dalším krokem je již samotná izolace, které můžeme dosáhnout několika metodami: extrakce v rozpouštědle, digesční metody, chemické narušení, superkritická extrakce [28, 33].

### **2.6.6 Degradace PHA**

Vlastnost, která je charakteristická pro PHA je jejich biologická rozložitelnost, PHA jsou rozkládány v životním prostředí pomocí bakteriálních destruentů. Pro rozložitelnost PHA je důležitá hlavně mikrobiální aktivita v prostředí, dále teplota, vlhkost a pH prostředí. Některé mikroorganismy jsou vybavené depolymerizačním systémem, díky kterému jsou schopné rozkládat PHA [34].

Obecně může být proces biodegradace polymerů rozdělena do čtyř fází: biodeteriorace, depolymerizace, bioasimilace a mineralizace viz Obrázek 7 . V prvním kroku se na povrchu materiálu vytvoří biofilm, jehož působením dochází k povrchové degradaci, při které je polymerní materiál fragmentován na menší částice. Ve druhém Mikroorganismy biofilmu vylučují extracelulární enzymy, které katalyzují depolymerizaci polymerního řetězce na oligomery, dimery a monomery. Následně ve třetím kroku dochází k přestupu nově vzniklých malých molekul do buněk mikroorganismu, následná produkce primárních a sekundárních metabolitů se nazývá asimilace. V posledním kroku mohou být tyto metabolity mineralizovány, vznikají koncové produkty jako  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$ , které se uvolňují do životního prostředí [34].

Rozklad může probíhat v aerobních i anaerobních podmínkách. V aerobních podmínkách degradují za vzniku  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , degradace je urychlena smíšenou mikrobiální populací. V anaerobních podmínkách se polymery rozpadají na organický materiál  $\text{CH}_4$  nebo  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . Tento proces se nazývá mineralizace, po dokončení mineralizace je všechn uhlík vázaný v biologicky odbouratelném polymeru přeměněn na  $\text{CO}_2$  [26, 35, 36].



Obrázek 7: Schéma biodegradace biopolymerů, upraveno dle [34].

Biodegradabilita je závislá na chemických a fyzikálních vlastnostech konkrétního PHA. Velmi důležitým faktorem je teplota tání PHA, s rostoucí teplotou tání klesá biologická rozložitelnost, dále bylo zjištěno, že čím vyšší má PHA molekulární hmotnost tím hůře degraduje. Chemická struktura PHA také velmi ovlivňuje biodegradaci, důležité jsou funkční skupiny a jejich povaha a krystalinita. Vysoce krystalinické materiály mají nižší biologickou rozložitelnost [26].

Mezi bakterie, které PHA rozkládají se řadí např. rody *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, a mnoho dalších, všechny bakterie, které jsou PHA schopné degradovat, jsou také schopné je vytvářet. Rozkladu schopné jsou i některé houby např. rody *Sporotrichum* a *Talaromyces* [35, 37].

## 2.6.7 Využití PHA

PHA mají díky svým vlastnostem široké spektrum využití, prvními komerčními produkty vyrobenými z PHA byly v dubnu roku 1990 obaly na šampon značky Wella, obaly byly vyrobeny firmou Biopol. Nyní se bioplasty využívají průmyslu, medicíně, zemědělství a jako obalové materiály [26].

### 2.6.7.1 Průmyslové aplikace

Využití PHA v průmyslu je poměrně široké. Používá se PHA latex k pokrytí kartonu pro výrobu voděodolných povrchů, nahrazuje tím kombinaci kartonu s hliníkem, která se běžně využívá a není biologicky odbouratelná. Toto využití je ekonomicky efektivní, protože k výrobě těchto povrchů je potřeba pouze malé množství PHA. Dále se z PHA vyrábí folie, nápojové lahve, a potahové filmy [26].

### 2.6.7.1 Medicínské aplikace

V medicíně nacházejí PHA uplatnění v tkáňovém inženýrství, důležitou roli hraje schopnost určitého materiálu interagovat s určitou tkání. PHA jsou široce používány jako kostní dlahy, chirurgické stehy, kloubní náhrady, zubní náhrady, umělé srdeční chlopně, umělé tepny a nitrooční čočky. Dále jsou PHA používány při pomalém řízeném uvolňování léků a hormonů v těle, použití PHB je však v těchto aplikacích omezeno svou nízkou rychlostí rozkladu a vysokou odolností vůči hydrolýze ve sterilních tkáních. Z PHA vláken se vyrábějí výtěrové materiály a obvazové materiály pro chirurgii [26,36].

### 2.6.7.1 Zemědělské aplikace

PHA se v zemědělství využívají jako mulčovací folie, umožňují používat folie k podpoře růstu rostlin, následně degradují fotochemickou reakcí přímo na polích, čímž se eliminují náklady na odstraňování folie [26].

Dále PHA můžeme využít v aplikacích zahrnujících řízené uvolňování pesticidů a živin. Biopolymer slouží hlavně k řízení rychlosti dodávání látky, mobility a doby účinnosti chemické látky. Hlavní výhodou řízeného uvolňování je využití menšího množství chemikálií za dané časové období, tím se eliminuje dopad na necílové druhy a omezí se tékání a vyluhování účinných látek [36].

### 3 PRAKTICKÁ ČÁST

Tato práce se zabývá vlivem biodegradabilního polymeru P3HB (poly-3-hydroxybutyrátu) na 4 generace vodního organismu *D. magna*. Multigenerační test byl založen na semi-statických reprodukčních testech s tímto organismem (dle OECD 211) [9]. Ve vědeckých publikacích se uvádí, že koncentrace testované látky v multigeneračním testu je environmentálně relevantní, tato koncentrace však u PHB není známá, proto byla využita koncentraci subletální, která byla na základě již provedených akutních testů stanovena na 1 mg/L. Pro vyloučení negativního vlivu samotných částic v suspenzi bylo využito ošetření s přírodními částicemi kaolinu ve stejné koncentraci jako mikroplasty PHB [10, 11].

V multigeneračním testu byly sledovány 3 až 4 generace, je to kompromis mezi proveditelností testu a maximalizací počtu generací. Každá generace je exponována testovanou látkou po dobu 21 dní (dle OECD 211) [9]. Roztoky s testovanou látkou jsou stejně jako u chronického testu měněny třikrát týdně, organismy jsou krmeny minimálně třikrát týdně společně s obměnou roztoků. Sleduje se mortalita a reprodukční aktivita dospělých jedinců. Při každé obměně roztoků jsou odebírání nově narození jedinci (neonata), neonata ze třetího vrhu jsou využita k nasazení dalšího testu jako matky pro další generaci. Narození jedinci z předchozích vrhů nejsou k nasazení dalšího testu využíváni z důvodu jejich nestability, která by mohla negativně ovlivnit výsledek testu. Jedinci využití k nasazení nového testu jsou vybráni náhodně. Testování všech generací probíhá za stejných podmínek jako testování generace F0 [10, 11].

#### 3.1 Použité přístroje

Pro účely bakalářské práce bylo využíváno laboratorní sklo a dále:

- pH metr Lovibond Sensodirect pH110
- analytické váhy
- váhy
- ultrazvuková lázeň
- míchačka

## 3.2 Příprava média ASTM

### 3.2.1 Příprava média

Médium je připravováno podle normy ASTM [38]. Rekonstituovaná tvrdá voda obohacená o seaweed extract (Marinure, Glenside, Scotland), dále o směs vitamínů: thiamin hydrochlorid (750 mg/l), cyanokobalamin (10 mg/l) a biotin (7,5 mg/l), směs vitamínů byla připravena podle OECD guideline 211 [9]. Médium musí splňovat tyto parametry: pH ~ 8, vodivost ~550  $\mu\text{S/cm}$ , obsah kyslíku > 80% nasycení [38].

### 3.2.2 Použité chemikálie

- $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  čistoty p.a., PENTA s.r.o.
- $\text{NaHCO}_3$ , čistoty p.a., PENTA s.r.o.
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , čistoty p.a., PENTA s.r.o.
- $\text{KCl}$ , čistoty p.a., PENTA s.r.o.
- $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , čistoty p.a., PENTA s.r.o.
- vitamíny – připraveny dle OECD No. 211 (pro přípravu M4/M7 média)
- seaweed extract (Marinure, Glenside, Scotland)

## 3.3 Chov testovacích organismů

Testovací organismy *D. magna* z laboratorního chovu byly kultivovány v popsaném médiu. Medium bylo měněno 3x týdně, organismy byly krmeny zelenou řasou *Desmodesmus subspicatus* přibližně 200  $\mu\text{g}$  uhlíku na organismus na den. Chov je udržován ve  $20 \pm 1$  °C a ve světelném režimu 16 hodin světlo, 8 hodin tma.

### 3.1 Testovaná látka P3HB

Mikročástice PHB byly získány z laboratoře TianAn Biologic Material Co., Ltd. v Ningbo City v Číně, která je největším světovým producentem polyhydroxy-butyrát-co-valerátu (PHBV) a produkuje také poly-3-hydroxybutyrát (P3HB). Pro tento multigenerační test byly využity částice P3HB (ENMAT Y3000), 1 g P3HB obsahuje  $3,2 \cdot 10^{13}$  částic/ L.

Suspenze PHB mikroplastů v MilliQ vodě byla přesívána přes síťové síto s velikostí ok 63  $\mu\text{m}$  byly následně sušeny v digestoři ve skleněných kádinkách při laboratorní teplotě. Na analytických vahách byl navážen vždy 1 mg mikročastic PHB (velikost <63  $\mu\text{m}$ ) a 1 mg kaolinu a každá látka byla vpravena do 1 l média. Aby došlo k rovnoměrnému rozmístění částic v roztoku byly suspenze vloženy do ultrazvukové lázně.

### 3.2 Postup při testování

Multigenerační test probíhal za stejných podmínek jako kultivace organismů v chovu, zavedeného v laboratoři ekotoxikologie. První generace využitá v multigeneračním testu pocházela z tohoto chovu. V testu byly 3 druhy ošetření, v každém ošetření 10 organismů (tedy i opakování) pro každý typ ošetření. V prvním ošetření byly organismy v čistém mediu bez částic jako negativní kontrola. Ve druhém ošetření byly organismy v suspenzi přírodních částic kaolinu v koncentraci 1 mg/L. Třetí ošetření obsahovalo organismy v suspenzi P3HB v koncentraci 1 mg/L.

Test probíhal za světelného režimu 16:8, teploty  $20 \pm 1$  °C. Byla sledována úmrtnost, a především reprodukční aktivita mateřských organismů v testovaných látkách v porovnání s kontrolou. Testované suspenze byly vždy připravovány v den výměny média. Byly použity 150 ml kádinky, v každá obsahovala vždy 100 ml testovaného média. Do každé kádinky byl pomocí plastového kapátka vpraven jeden mateřský organismus, který byl krmen 0,2 mg C/den zelenou řasou *D. subspicatus*. Tříkrát týdně (režim Po/St/Pá) bylo vyměňováno médium, při výměně byly vždy spočítáni nově narození jedinci. Expoziční doba pro jednu generaci organismů byla dle metodiky OECD No. 211 21 dní [9]. Organismy z 3. vrhu dané generace byly využity pro nasazení dalšího testu (tj. jako matky další generace) za stejných podmínek (3 druhy ošetření). Testování probíhalo po 4 generace vždy stejným způsobem.

Validita testu byla posuzována dle kritérií uvedené metodiky; test je považován za platný, pokud jsou v kontrole splněna následující kritéria: celková mortalita mateřských organismů na konci testu nepřesahuje 20 % a průměrný počet živých potomků na živý mateřský organismus v kontrole je 60 nebo více. [9]

## 4 VÝSLEDKY

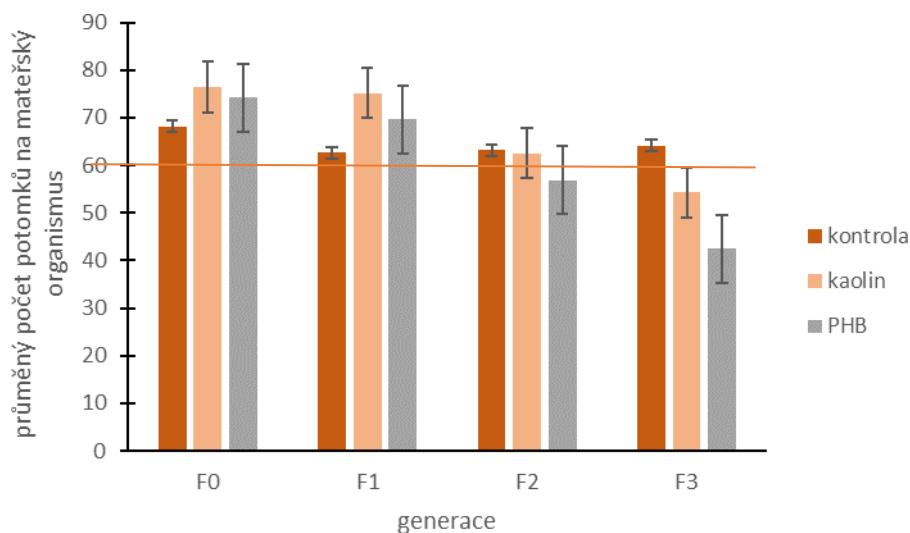
### 4.1 Reprodukční aktivita

Reprodukční aktivita jedinců v generacích F1 a F0 v suspenzi testovaného P3HB byla velmi podobná jako u organismů v suspenzi kaolinu (rozdíl méně než 5 %), přičemž reprodukční aktivita v obou suspenzích byla u těchto generací dokonce cca o 10 % vyšší než v kontrole. Tento trend se však s následujícími generacemi měnil; zatímco u organismů kontrolní v následujících generacích nedošlo k výraznému poklesu reprodukční aktivity, u organismů obou testovaných suspenzí byl pokles zaznamenán.

V generaci F2 došlo k poklesu reprodukční aktivity v suspenzi kaolinu o více než 20 % oproti předchozím generacím nicméně, reprodukční aktivita byla srovnatelná s kontrolou (nepatrný rozdíl cca 1 %). U suspenze P3HB v generaci F2 byl zaznamenán ještě větší pokles reprodukční aktivity než u suspenze kaolinu. Reprodukční aktivita poklesla o cca 20 % oproti předchozím generacím a byla o cca 20 % nižší než v suspenzi kaolinu i v kontrole. Reprodukční aktivita v jednotlivých generacích a ošetřeních je znázorněna v Graf 1.

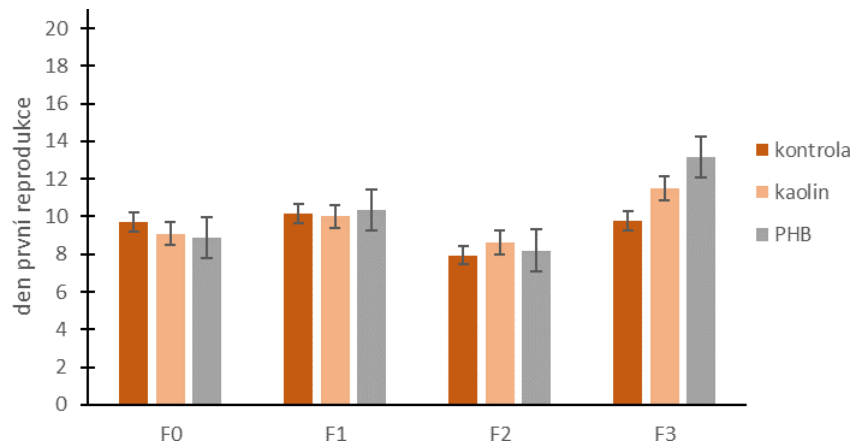
V generaci F3 dále pokračoval pokles reprodukční aktivity v obou suspenzích, zejména byl zaznamenán značný pokles u suspenze P3HB. U suspenze kaolinu došlo k poklesu reprodukční aktivity o cca 15 % oproti předchozí generaci. U suspenze kaolinu došlo k poklesu reprodukční aktivity o cca 15 % oproti předchozí generaci F2 a ve srovnání s kontrolou byla také nižší, a to o cca 15 % nižší než v kontrole. V suspenzi P3HB byl zaznamenán pokles reprodukční aktivity u F3 generace o více než 20 % oproti předchozí generaci F2. Reprodukční aktivita v suspenzi P3HB byla v generaci F3 o cca 15 % nižší než v suspenzi kaolinu a o více než 30 % nižší než v kontrole. Jak je z Graf 1 patrné, reprodukční aktivita v suspenzi P3HB poklesla v poslední testované generaci F3 o více než 40 % oproti generaci F0.



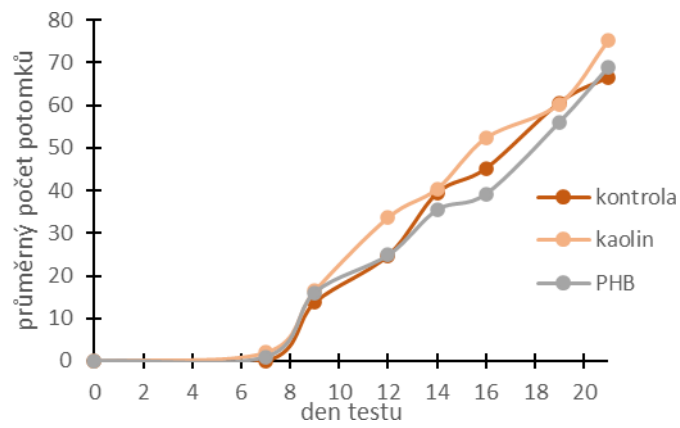


*Graf 1: Průměrné celkové počty potomků na mateřský organismus v jednotlivých ošetřeních ve všech testovaných generacích. Rovnoběžná přímka s osou x značí počet potomků mateřských organismů v kontrole, potřebných pro validitu testu.*

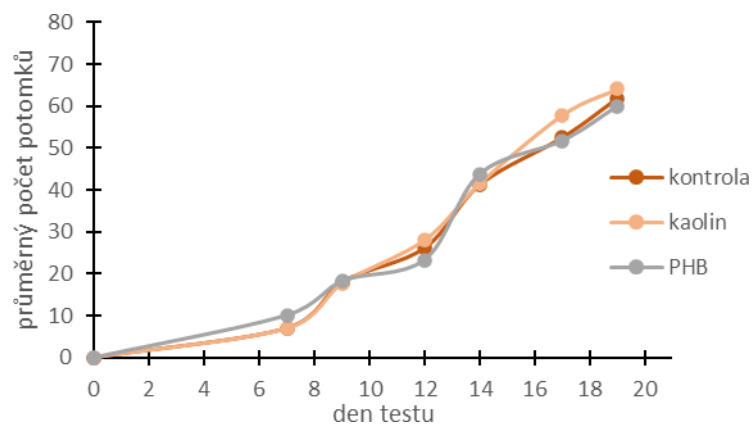
Následující grafy znázorňují reprodukční aktivitu v průběhu celého testu. Graf 2 znázorňuje dny první reprodukce. K první reprodukci docházelo nejčastěji 7. - 9. den testu. V generacích F0, F1 a F2 byl den první reprodukce u všech testovaných ošetření stejný. V generaci F3 došlo v suspenzi P3HB k první reprodukci později v průměru až ve 13. dni testu, zatímco v kontrole byla průměrná první reprodukce v 9. dni. Graf 3, Graf 4 Graf 5 a Graf 6 znázorňují průměrnou kumulativní reprodukci ve všech generacích.



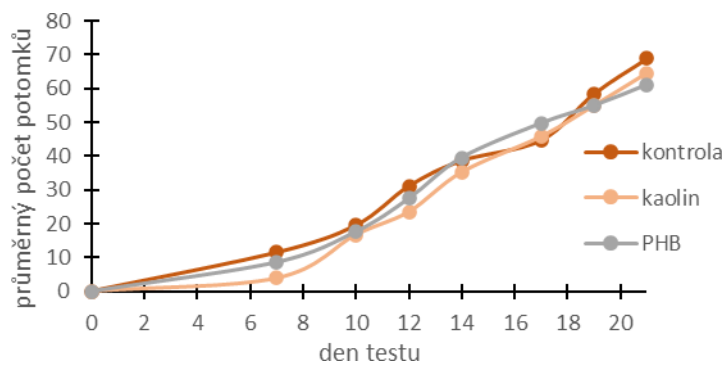
Graf 2: Průměrný den první reprodukce pro jednotlivá ošetření ve všech testovaných generacích.



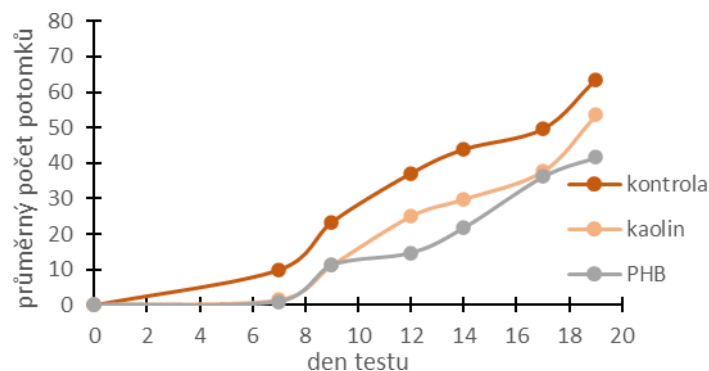
Graf 3: Průměrná kumulativní reprodukce pro generaci F0.



Graf 4: Průměrná kumulativní reprodukce pro generaci F1.



Graf 5: Průměrná kumulativní reprodukce pro generaci F2.



Graf 6: Průměrná kumulativní reprodukce pro generaci F3.

## 4.2 Mortalita

Dalším endpointem, který byl v testech sledován byla také mortalita organismů. Tabulka 2 uvádí uvedena průměrnou mortalitu ve všech generacích a ošetřeních. A = kontrolní organismy, B = organismy v suspenzi kaolinu, C = organismy v suspenzi P3HB. K úhynu organismů vlivem testované látky v testované koncentraci nedocházelo. Jak je z výsledků patrné mortalita nepřesahovala 20 %, test je validní.

Tabulka 2: Průměrná mortalita organismů v jednotlivých ošetřeních pro všechny generace.

Průměrná mortalita (%)				
	F0	F1	F2	F3
A	10	5	15	10
B	10	15	5	10
C	10	15	0	10

## 5 DISKUSE

V této bakalářské práci byl proveden multigenerační test na organismu *D. magna*. Multigenerační test zatím není tak často využíván jako testy chronické a akutní, vědci se však domnívají, že pro hodnocení environmentálních rizik by mohl být realističtější nástrojem než běžně využívané krátkodobější testy. Látka je podávána v environmentálně relevantní koncentraci a je sledován dopad na vícero generací (toxicita látky se může projevit až na potomcích exponovaného organismu) a takto může být predikován dopad testované látky na prosperitu populace testovacího jedince. Jelikož pro P3HB není zatím environmentálně relevantní koncentrace známá, byly v rámci tohoto testu testovány částice P3HB v koncentraci, která byla na základě již provedených akutních testů označena jako subletální – 1 mg/L. Ve stejné koncentraci byly testovány i přírodně se vyskytujícími částice kaolinu. Porovnání vlivu částic mikroplasty P3HB a přírodních mikročástic je důležité pro zkoumání, zda mají částice P3HB skutečně negativnější vliv na organismy než částice přirozeně se vyskytující ve vodním prostředí. Pro potřeby multigeneračních testů se využívá environmentálně relevantní koncentrace částic testovaného materiálu, výsledky tohoto testu mohou být porovnány s testy s jinými mikroplasty [10, 11].

Tento multigenerační test byl koncipován velmi podobným způsobem jako již úspěšně realizovaný multigenerační test s mikročásticemi polystyrenu o velikosti (<63 μm), tedy o stejné velikosti, jakou měly částice v našem testu. Jako přídatný stresor byla ve zmíněném testu podávána testovacím organismům nižší dávka potravy [11]. Na rozdíl od testu provedeného s polystyrenovými částicemi nebyla v našem testu v žádné generaci zaznamenána zvýšená mortalita vlivem mikročástic P3HB. Výsledky testů se však shodují v trendech reprodukční aktivity, obou testech byl zaznamenán pokles reprodukční aktivity jedinců exponovaných mikroplasty vyšší než u jedinců exponovaných přírodními částicemi i v porovnání s kontrolou. I když mikročástice polystyrenu byly testovány v nižších koncentracích než mikročástice P3HB v našem testu, měly výraznější dopad na testovací organismy. Nejvyšší testovaná koncentrace polystyrenu byla  $1 \cdot 10^4$  částic/ mL, zatímco koncentrace P3HB byla  $3,2 \cdot 10^7$  částic/ mL.

V multigeneračním testu provedeném v rámci této práce došlo v generaci F3 k poklesu reprodukční aktivity i u organismů v suspenzi kaolinu, tento výsledek se neshoduje s výsledkem multigeneračního testu s mikročásticemi polystyrenu, ve kterém kaolin reprodukční aktivitu nijak neovlivnil. Zatímco v našem multigeneračním testu poklesla v generaci F3 reprodukční aktivita jak u organismů exponovaných částicemi P3HB,

tak u organismů exponovaných přírodním kaolinem, u suspenze P3HB byl však tento pokles mnohem výraznější.

Jelikož mohou nerozpuštěné pevné látky poškozovat organismus mechanicky nebo mohou být organismy pozřeny, mohou mít vliv na akvatické organismy bez ohledu na původ [39]. Přestože není mnoho dostupných důkazů, mikročástice plastů se podle výsledků tohoto testu i podle výsledku studie zabývající se částicemi polystyrenu zdají být nebezpečnější než přírodní mikročástice [11].

Výsledky provedeného multigeneračního testu je možné porovnat také s výsledky multigenerační studie zkoumající vliv nanočástic polystyrenu po dobu 3 generací. Dosažené výsledky byly v obou testech velmi podobné. Dlouhodobá expozice nijak neovlivnila mortalitu, v generacích F0 a F1 nebyla ovlivněna ani reprodukční aktivita, v generaci F2 došlo k výraznému poklesu reprodukční aktivity. Ve studii s nanočásticemi polystyrenu nebyl využit organismus *D. magna* ale příbuzný druh *D. pulex*. Organismy byly exponovány nižší koncentrací testované látky 1 µg/L, zatímco v našem multigeneračním testu byly organismy exponovány koncentrací 1 mg/L. Podle těchto výsledků měly nanočástice polystyrenu v 1000krát nižší koncentraci než mikročástice P3HB velmi podobný toxický účinek jako tyto mikročástice [10].

## 6 ZÁVĚR

V multigeneračním testu provedeném v rámci této bakalářské práce byly organismy *D. magna* exponovány mikročásticemi biodegradabilního plastu P3HB a přírodními mikročásticemi kaolinu po 4 generace. Mikročástice P3HB negativně ovlivnily reprodukční aktivitu u organismů ve třetí a čtvrté generaci. U přírodních mikročástic došlo také k poklesu reprodukční aktivity, tento pokles však byl méně zřetelný než u částic P3HB. Ve srovnání s multigeneračními testy provedenými s mikročásticemi konvenčního plastu polystyrenu, výsledky tohoto testu prováděného s biodegradabilním plastem P3HB prokázaly mírnější multigenerační účinek na organismus *D. magna* navzdory vyššímu počtu částic v testované suspenzi.

Multigenerační test by mohl být velmi důležitým nástrojem pro posouzení dlouhodobých efektů látek dostávajících se do životního prostředí. Jeho velkou výhodou je mnohem realističtější pohled na dlouhodobé účinky látek než u testů chronických nebo akutních, nevýhodou je časová náročnost testování a práce s velmi malými hmotnostmi či objemy testovaných látek, proto jsou kladeny vysoké nároky na preciznost práce.

Aby bylo možné s jistotou prohlásit, že mikročástice biodegradabilního polymeru P3HB jsou pro akvatické prostředí méně toxické než mikročástice konvenčních plastů, bylo by třeba multigenerační test ještě zopakovat, výsledky mohou být ovlivněny genetickou variabilitou testovacích organismů. Multigenerační test je časově velmi náročný, pro predikci účinku testované látky na ekosystém však velmi cenný. Je třeba mít na paměti, že i biodegradabilní plasty se v životním prostředí rozkládají pouze za určitých podmínek, proto je třeba s nimi správně nakládat.

## 7 BIBLIOGRAFIE

- [1] KOČÍ, Vladimír a Klára MOCOŮVÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2009. ISBN 978-80--7080-699-9.
- [2] ZHANG, Xiaowei, Pu XIA, Pingping WANG, Jianghu YANG a Donald BAIRD. Omics Advances in Ecotoxicology. *Environmental science & technology* [online]. WASHINGTON: American Chemical Society, 2018, **52**(7), 3842-3851 [cit. 2023-02-18]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.7b06494
- [3] KOPP, Radovan, Klára HILSCEROVÁ a Eva POŠTULKOVÁ. *Základy vodní ekotoxikologie* [online]. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015 [cit. 2023-04-18]. ISBN 978-80-7509-334-9.
- [4] DIETER, Ebert. *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia* [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information in Bethesda, 2005 [cit. 2022-11-10]. ISBN 1-932811-06-0. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2040/>
- [5] AGARWAL, Seema. Biodegradable Polymers: Present Opportunities and Challenges in Providing a Microplastic-Free Environment. *Macromolecular chemistry and physics* [online]. Weinheim: Wiley Subscription Services, Inc, 2020, **221**(6), 2000017- [cit. 2023-04-26]. ISSN 1022-1352. Dostupné z: doi:10.1002/macp.202000017
- [6] LASKAR, Nirban a Upendra KUMAR. Plastics and microplastics: A threat to environment. *Environmental technology & innovation* [online]. 2019, **14**, 100352 [cit. 2023-04-26]. ISSN 2352-1864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2019.100352
- [7] PRATA, Joana, João DA COSTA, Isabel LOPES, Armando DUARTE a Teresa ROCHA-SANTOS. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *The Science of the total environment* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2020, **702**, 134455 [cit. 2023-04-27]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134455



- [8] *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*. Dostupné z: doi:10.1787/9789264069947-en
- [9] *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*. Dostupné z: doi:10.1787/9789264185203-en
- [10] LIU, Zhiquan, Mingqi CAI, Donglei WU, Ping YU, Yang JIAO, Qichen JIANG a Yunlong ZHAO. Effects of nanoplastics at predicted environmental concentration on *Daphnia pulex* after exposure through multiple generations. *Environmental Pollution*. 2020, **256**. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.113506
- [11] SCHÜR, Christoph, Sebastian ZIPP, Tobias THALAU a Martin WAGNER. Microplastics but not natural particles induce multigenerational effects in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*. 2020, **260**. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.113904
- [12] WEISS, James. *The hidden beauty of the Microscopic world*. 1. London: Watkins, 2021. ISBN 978-1-78678-449-0.
- [13] SURIYAMONGKOL, Pornpa, Randall WESELAKE, Suresh NARINE, Maurice MOLONEY a Saleh SHAH. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review. *Biotechnology Advances*. 2007, **25**(2), 148-175. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2006.11.007
- [14] ŠRÁMEK-HRUŠEK, Rudolf, Milan STRAŠKRABA a Ján BRTEK. *Fauna ČSSR.: Lupenonožci - Branchiopoda*. Praha: Československá akademie věd - ČSAV, 1962, 470 s.
- [15] FORRÓ, L., N. KOROVCHINSKY, A. KOTOV a A. PETRUSEK. Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008, **595**(1), 177-184 [cit. 2022-11-10]. ISSN 0018-8158. Dostupné z: doi:10.1007/s10750-007-9013-5
- [16] SCHUYTEMA, G.S., A.V. NEBEKER a T.W. STUTZMAN. Salinity tolerance of *Daphnia magna* and potential use for estuarine sediment toxicity tests. *Archives of environmental contamination and toxicology* [online]. NEW YORK: Springer Nature,

1997, **33**(2), 194-198 [cit. 2022-11-10]. ISSN 0090-4341. Dostupné z: doi:10.1007/s002449900242

- [17] TSUI, Martin a Wen-xiong WANG. Multigenerational acclimation of *Daphnia magna* to mercury: Relationships between biokinetics and toxicity. *Environmental toxicology and chemistry* [online]. Hoboken: Wiley Periodicals, Inc, 2005, **24**(11), 2927-2933 [cit. 2023-02-18]. ISSN 0730-7268. Dostupné z: doi:10.1897/05-085R.1
- [18] JEONG, Tae-yong, Min-su YUK, Junho JEON a Sang KIM. Multigenerational effect of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on the individual fitness and population growth of *Daphnia magna*. *The Science of the total environment* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, 2016, **569-570**, 1553-1560 [cit. 2022-11-15]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2016.06.249
- [19] NEDERSTIGT, Tom, Willie PEIJNENBURG, Rody BLOM a Martina VIJVER. Correlation analysis of single- and multigenerational endpoints in *Daphnia magna* toxicity tests: A case-study using TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Ecotoxicology and environmental safety* [online]. Elsevier Inc, 2022, **241**, 113792-113792 [cit. 2022-11-15]. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113792
- [20] STREMMEL, Helmut, Linda WEISS, Gema PARRA, Eloísa RAMOS-RODRÍGUEZ a Cristiano ARAÚJO. Ecotoxicological assessment of the effects of fluoxetine on *Daphnia magna* based on acute toxicity, multigenerational reproduction effects, and attraction-repellence responses. *Chemosphere (Oxford)* [online]. 2022, 137028-137028 [cit. 2022-11-15]. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2022.137028
- [21] NOGUEIRA, Diego, Aline SILVA, Marlon DA SILVA, Denice VICENTINI a William MATIAS. Individual and combined multigenerational effects induced by polystyrene nanoplastic and glyphosate in *Daphnia magna* (Strauss, 1820). *The Science of the total environment* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 2022, **811**, 151360-151360 [cit. 2023-02-18]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.151360
- [22] SCHÜR, Christoph, Carolin WEIL, Marlene BAUM, Jonas WALLRAFF, Michael SCHREIER, Jörg OEHLMANN a Martin WAGNER. Incubation in Wastewater Reduces the Multigenerational Effects of Microplastics in *Daphnia magna*.

*Environmental science & technology* [online]. United States: American Chemical Society, 2021, **55**(4), 2491-2499 [cit. 2023-02-21]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.0c07911

- [23] JEONG, Tae-yong, Tae-hun KIM a Sang KIM. Bioaccumulation and biotransformation of the beta-blocker propranolol in multigenerational exposure to *Daphnia magna*. *Environmental pollution (1987)* [online]. OXFORD: Elsevier Ltd, 2016, **216**, 811-818 [cit. 2023-02-23]. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2016.06.051
- [24] DIETRICH, Sabine, Florian PLOESSL, Franz BRACHER a Christian LAFORSCH. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study. *Chemosphere (Oxford)* [online]. OXFORD: Elsevier Ltd, 2010, **79**(1), 60-66 [cit. 2023-02-18]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2009.12.069
- [25] SILVA, Ana, Cátia SANTOS, Nuno FERREIRA et al. Multigenerational effects of carbendazim in *Daphnia magna*: From a subcellular to a population level. *Environmental toxicology and chemistry* [online]. HOBOKEN: Wiley, 2019, **38**(2), 412-422 [cit. 2023-02-18]. ISSN 0730-7268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.4307
- [26] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. *Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications*. 2007, **82**(3), 233-247. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.1667
- [27] GAHLAWAT, Geeta a Sanjeev SONI. Valorization of waste glycerol for the production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in a sustainable manner. *Bioresource Technology*. 2017, **243**, 492-501. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2017.06.139
- [28] ZAPLETAL, Martin a Jiří TREJBAL. IZOLACE POLYHYDROXYALKANOÁTŮ Z MIKROBIÁLNÍ BIOMASY. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2016, **2016**(110), 860-867. ISSN 1213-7103.
- [29] GARCÍA, A., D. SEGURA, G. ESPÍN, E. GALINDO, T. CASTILLO a C. PEÑA. High production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii*

- mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical engineering journal* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, 2014, **82**, 117-123 [cit. 2022-11-21]. ISSN 1369-703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2013.10.020
- [30] CARPINE, Roberta, Giuseppe OLIVIERI, Klaas HELLINGWERF, Antonino POLLIO a Antonio MARZOCHELLA. Industrial Production of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from CO<sub>2</sub>: Can Cyanobacteria Meet this Challenge?. *Processes*. 2020, **8**(3). ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr8030323
- [31] BASTIOLI, Catia. *Handbook of Biodegradable Polymers*. Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, SY4 4NR, UK: Rapra Technology Limited, 2005. ISBN 978-1-85957-389-1. P. 219-256.
- [32] TANIGUCHI, Ikuo, Kumi KAGOTANI a Yoshiharu KIMURA. Microbial production of poly(hydroxyalkanoate)s from waste edible oils. *Green Chem.* 2003, **5**(5), 545-548. ISSN 1463-9262. Dostupné z: doi:10.1039/B304800B
- [33] KUNASUNDARI, B. a K. SUDESH. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express polymer letters* [online]. BUDAPEST: Budapest Univ Technol & Econ, 2011, **5**(7), 620-634 [cit. 2023-01-31]. ISSN 1788-618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2011.60
- [34] HAIDER, Tobias, Carolin VÖLKER, Johanna KRAMM, Katharina LANDFESTER a Frederik WURM. Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. *Angewandte Chemie (International ed.)* [online]. International ed. in English. WEINHEIM: Wiley, 2019, **58**(1), 50-62 [cit. 2023-04-25]. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201805766
- [35] ZAHEER, Mohd a Mohammed KUDDUS. PHB (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate) and its enzymatic degradation. *Polymers for advanced technologies* [online]. HOBOKEN: Wiley, 2018, **29**(1), 30-40 [cit. 2023-02-06]. ISSN 1042-7147. Dostupné z: doi:10.1002/pat.4126
- [36] REDDY, C.S.K, R GHAI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. OXFORD: Elsevier Ltd, 2003, **87**(2), 137-146 [cit. 2023-02-07]. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(02)00212-2

- [37] JENDROSSEK, Dieter. Microbial Degradation of Polyesters. *Biopolyesters*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001, 293-325. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. ISBN 978-3-540-41141-3. Dostupné z: doi:10.1007/3-540-40021-4\_10
- [38] *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians: ASTM E729 – 96 (2007)*. 3. USA: ASTM, 2007.
- [39] BILOTTA, G.S. a R.E. BRAZIER. Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water research (Oxford)* [online]. OXFORD: Elsevier Ltd, 2008, **42**(12), 2849-2861 [cit. 2023-05-01]. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2008.03.018

## SEZNAM ZKRATEK

<b>LC-MS/MS</b>	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
<b>LOEC</b>	nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky (lowest observed effect concentration)
<b>NOEC</b>	nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky (no observed effect concentration)
<b>OECD</b>	Organizace pro rozvoj ekonomické spolupráce (Organization for Economic Cooperation of Development)
<b>PHA</b>	polyhydroxyalkanoáty
<b>P3HB</b>	polyhydroxybutyrát