Molekulárně biologická analýza mikroorganismů v půdách kontaminovaných mikroplasty

Nikola Stloukalová

Bakalářská práce
2024

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Nikola Stloukalová**
Osobní číslo:	**T21190**
Studijní program:	**B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**
Specializace:	**Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie**
Forma studia:	**Prezenční**
Téma práce:	**Molekulárně biologická analýza mikroorganismů v půdách kontaminovaných mikroplasty**

Zásady pro vypracování

V rámci teoretické práce bude zpracována literární rešerže se zaměřením na mikroplasty vznikající z biodegradabilních polymerů. Předmětem praktické části bakalářské práce bude především analýza mikrobiálních konsorcií v zemědělských půdách kontaminovaných mikroplasty pomocí molekulárně biologických metod. Dále bude sledována biodegradace mikroplastů.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

Kumar KR, Cowley MJ, Davis RL. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. Semin Thromb Hemost. 2019
R. Muthuraj, M. Misra, A.K. Mohanty, Hydrolytic degradation of biodegradable polyesters under simulated environmental conditions, *J Appl Polym* Sci 132 (27) (2015).
Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Jana Šerá, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 6. února 2024

PROHLÁŠENÍ AUTORKY
BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

……..
podpis studentky

ABSTRAKT

Teoretická část se věnuje především mikroplastům pocházejícím z konvenčních i biodegradabilních polymerů, jejich rozdělení, zdrojům a interakcím s půdou. V rámci praktické části byla provedena analýza vlivu obsahu vody ve třech druzích zemědělské půdy na míru biodegradace biodegradabilních polymerů a formování biofilmu na jejich povrchu. Byly připraveny inkubace biodegradabilních polymerů v půdách s různým obsahem vody. Dále byla pomocí hmotnostního spektrometru měřena míra biodegradace vybraných biodegradabilních polymerů reprezentujících mikroplasty v průběhu inkubace v půdě. Byla provedena mikroskopická analýza mikrobiálního biofilmu, který vznikal na povrchu inkubovaných vzorků. Ze vzorků půd byla v rámci molekulárně biologické analýzy izolována DNA.

Klíčová slova: mikroplasty, biofilm, zemědělská půda, biodegradace, fluorescenční mikroskopie

ABSTRACT

The theoretical part focuses mainly on microplastics derived from conventional and biodegradable polymers, their distribution, sources and interactions with soil. In the practical part, the influence of water content in three types of agricultural soils on the rate of biodegradation of biodegradable polymers and biofilm formation on their surface was analysed. Incubations of biodegradable polymers in soils with different water contents were prepared. Furthermore, the rate of biodegradation of selected biodegradable polymers representing microplastics during incubation in soil was measured using a mass spectrometer. Microscopic analysis of microbial biofilm formed on the surface of incubated samples was performed. DNA was isolated from the soil samples as part of the molecular biological analysis.

Keywords: microplastics, biofilm, agricultural soil, biodegradation, fluorescence microscopy

Největší poděkování patří zejména paní Ing. Janě Šeré, Ph.D. za vedení bakalářské práce, trpělivost, cenné rady, ochotu a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat všem paním laborantkám za pomoc při práci v laboratoři.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

ÚVOD **9**

I. TEORETICKÁ ČÁST **10**

1 MIKROPLASTY **11**

1.1 ROZDĚLENÍ MIKROPLASTŮ 11
1.2 VLIV MIKROPLASTŮ NA ZDRAVÍ 12
1.3 ZDROJE MIKROPLASTŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ 14
1.3.1 Zdroje mikroplastů v ovzduší *15*
1.3.2 Zdroje mikroplastů ve vodě *16*
1.3.3 Zdroje mikroplastů v půdě *16*

2 BIODEGRADABILNÍ PLASTY **18**

2.1 PROCES BIODEGRADACE BIODEGRADABILNÍCH PLASTŮ 20
2.2 MIKROPLASTY VZNIKAJÍCÍ Z BIODEGRADABILNÍCH PLASTŮ 21

3 VLIV MIKROPLASTŮ VZNIKAJÍCÍCH Z KONVENČNÍCH A BIODEGRADABILNÍCH POLYMERŮ NA PŮDNÍ PROSTŘEDÍ **23**

3.1 VLIV VLASTNOSTÍ PŮDY NA VZNIK MIKROPLASTŮ 23
3.2 VLIV MIKROPLASTŮ NA ABIOTICKÉ VLASTNOSTI PŮDY 24
3.3 VLIV MIKROPLASTŮ NA MIKROORGANISMY 24
3.4 VLIV MIKROPLASTŮ NA ZEMĚDĚLSKÉ PLODINY A MAKROEDAFON 25

II. PRAKTICKÁ ČÁST **27**

4 MATERIÁLY A METODY **28**

POUŽITÉ PŘÍSTROJE 28
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE 28
4.2 POUŽITÉ KITY 28
4.3 POUŽITÉ POLYMERNÍ MATERIÁLY 29
4.4 INKUBACE MIKROPLASTŮ V PŮDĚ 29
4.4.1 Použité půdy *29*
4.4.2 Stanovení pH, sušiny a vlhkosti půdy *29*
4.4.3 Stanovení maximální vodní kapacity (WHC) *31*
4.4.4 Příprava inkubací *32*
4.5 STANOVENÍ MINERALIZACE MATERIÁLU POMOCÍ HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU 34
4.5.1 Zpracování a vyhodnocení dat naměřených pomocí hmotnostního spektrometru s membránovým vstupem *34*
4.6 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ A MIKROSKOPICKÉ METODY 36
4.6.1 Fluorescenční mikroskopie *36*
4.6.2 Izolace DNA *37*
4.6.3 Stanovení koncentrace DNA fluorometricky *38*

5 VÝSLEDKY **40**

5.1 VÝSLEDKY STANOVENÍ PH, SUŠINY A VLHKOSTI TESTOVANÝCH PŮD 40
5.2 MAXIMÁLNÍ VODNÍ KAPACITA TESTOVANÝCH PŮD 40
5.3 VLIV WHC PŮDY NA TVORBU MIKROBIÁLNÍHO BIOFILMU NA POVRCHU VZORKŮ A JEJICH BIODEGRADACI 40
5.4 POROVNÁNÍ KONCENTRACÍ DNA IZOLOVANÉ Z PŮDY PŘED INKUBACÍ 46
5.5 MÍRA BIODEGRADACE BIODEGRADABILNÍCH POLYMERŮ V PŮDĚ 47

ZÁVĚR **52**

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY **54**
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK **60**
SEZNAM OBRÁZKŮ **61**
SEZNAM TABULEK **62**

ÚVOD

Znečištění životního prostředí plasty se již roky věnuje velká pozornost [1]. I přes to, že plasty jsou poměrně nové materiály, které se začaly hojně využívat až v průběhu druhé světové války, zanedlouho se začalo s jejich nadměrnou výrobou, což vedlo k enormnímu zatížení životního prostředí [2]. Použití plastů má hned několik výhod oproti ostatním materiálům. Jednou z největších výhod je jejich vysoká stabilita, nízká cena, mezi další výhody lze zařadit tvárnost, dlouhá trvanlivost či nízká hmotnost. Dlouhá životnost a odolnost plastů však vedla k jejich hromadění v životním prostředí, a tudíž i ke zvýšení environmentálních rizik spojených s jejich výrobou, užíváním a likvidací [3]. Celosvětová výroba plastů trvale roste. Podle statistik OECD (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) se za posledních dvacet let celosvětová produkce plastového odpadu zdvojnásobila a tento trend se má v příštích desetiletích dále zvyšovat [4]. Vzhledem k vysokým nákladům na recyklaci a také díky chování některých spotřebitelů se plastový odpad dostává dál do prostředí, což způsobuje závažné znečištění plasty na celém světě. Důležitost je v současnosti přikládána zejména mikroplastům, Podle studie Mezinárodní unie pro ochranu přírody (IUCN) se do životního prostředí každoročně dostane 3,2 milionu tun mikroplastů [5]. Tyto částice se mohou dostávat do těla živých organismů, již byly postupně objeveny např. ve střevech, krvi či mateřském mléce [1].

Mimo mikroplasty vznikající z konvenčních plastů mohou do životního prostředí vstupovat také mikroplasty vznikající z rozložitelných (biodegradabilních) plastů. Pro rozklad biodegradabilních mikroplastů je třeba osídlení jejich povrchu mikroorganismy schopnými tyto plasty rozložit a následně tvořit biofilm. Na tvorbu biofilmu mají vliv také podmínky prostředí, například vlhkost či množství kyslíku [6], [7], [8].

Pokud se mikroplasty nachází v půdách, mohou mít tedy vliv také na zemědělskou produkci, jelikož kvalita půdy a přítomnost mikroorganismů je pro pěstování plodin zásadní [9].

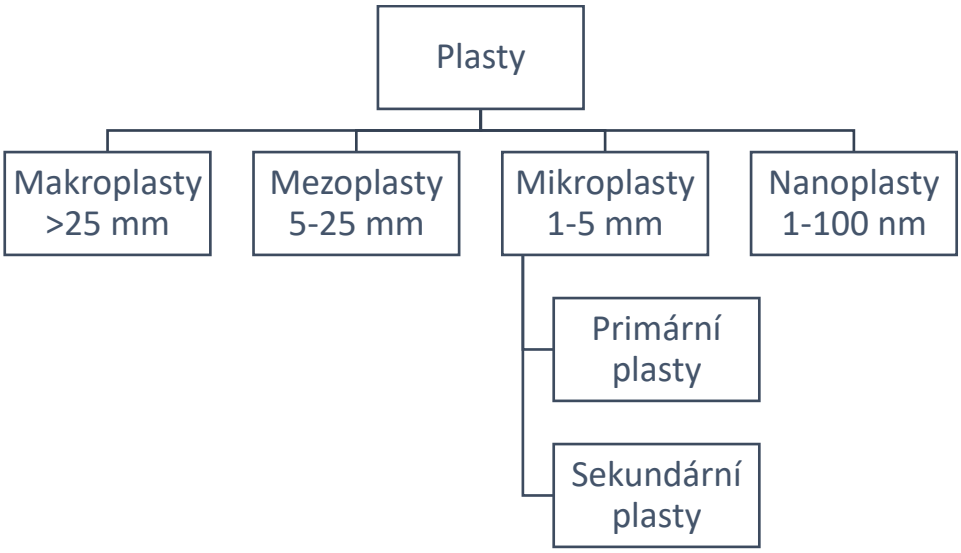
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROPLASTY

Mikroplasty jsou kontaminanty životního prostředí. Jedná se o drobné plastové částice. Jejich velikost se může značně lišit, ale obecně se jejich velikost udává mezi 1-5 mm. Důsledkem všestrannosti a rozšířeného průmyslového využití plastů existuje rozmanitá škála tvarů a velikostí těchto částic, i když se mikroplasty v prostředí vyskytují převážně jako vlákna či fragmenty. Není známo, kdy a jestli se částice mikroplastů plně rozloží, a jsou tedy považovány za perzistentní s potenciálem akumulace [10].

1.1 Rozdělení mikroplastů

V životním prostředí lze nalézt plasty s různou velikostí částic. Běžně se dělí do 4 kategorií – od největších makroplastů, přes mezoplastické částice, mikroplasty až k plastům s nejmenšími částicemi, nanoplastům [4] viz. Obrázek 1.

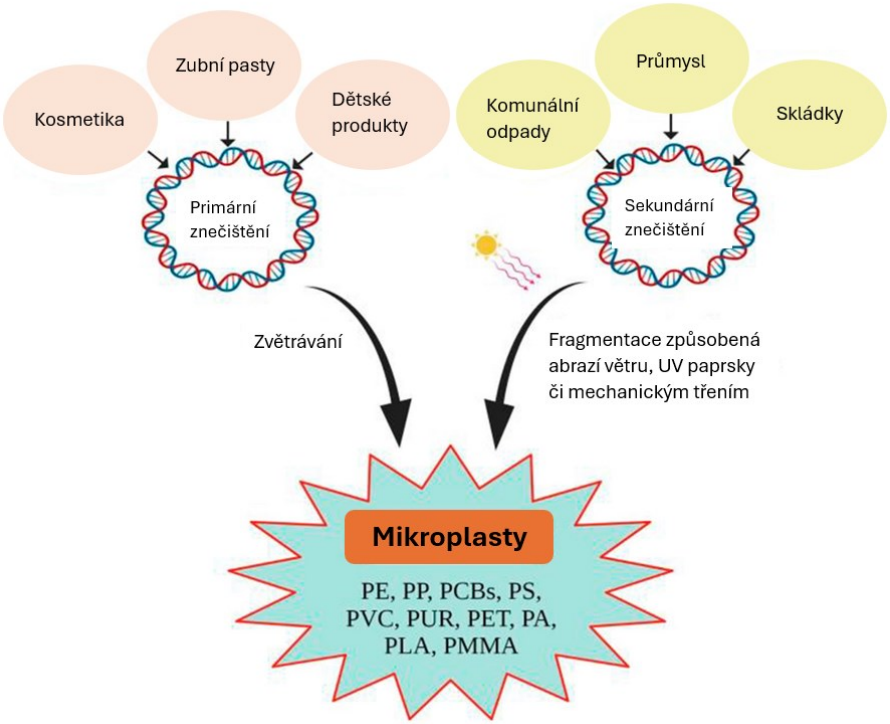


Obrázek 1: Klasifikace plastů dle velikosti částic [3]

Mikroplasty se dále dělí na primární a sekundární. Primární mikroplasty jsou záměrně vyráběny pro použití v různých technologických procesech. Jedná se o plastové částice a pelety. Jsou přidávány do mnoha spotřebních a komerčních produktů. Primární mikroplasty jsou používány např. v kosmetických výrobcích, výrobcích osobní péče, čistících prostředcích, léčivech, dětských produktech, zubních pastách, insekticidech. Přestup primárních mikroplastů z výrobků osobní péče do životního prostředí probíhá z důvodu jejich přímého splachování do odpadních vod, ze kterých poté unikají do životního prostředí. Mikroplasty pocházející z různých primárních zdrojů se také výrazně podílí na

znečišťování oceánů, kdy je odhadováno, že až 30 % plastového odpadu v oceánech tvoří primární mikroplasty, které vznikají zejména oděrem pneumatik vozidel o vozovku a uvolněním umělých textilních vláken v průběhu praní. [11].

Sekundární mikroplasty vznikají fragmentací větších kusů a úlomků plastů. Tato fragmentace je způsobena např. fotodegradací, mechanickou degradací, degradací teplem či degradaci pomocí biologických činitelů (makroedafon) [12]. Tento proces ovlivňuje velikost a tvar fragmentů, jejich složení a vlastnosti, dále pak koncentrace kyslíku, přítomnost vody nebo teplota [11]. Znečištění prostřednictvím sekundárních mikroplastů pochází hlavně z komunálního odpadu, plastových lahví, plastových sáčků a plastových nádob na potraviny či rybářských zařízení [13]. Dalším zdrojem jsou pak také elektronická zařízení, která jsou špatně likvidována [4].



Obrázek 2: Hlavní zdroje primárních a sekundárních mikroplastů [12].

1.2 Vliv mikroplastů na zdraví

Mikroplasty jsou kontaminanty všech environmentálních systémů [14]. Vlivem nepříznivých účinků mikroplastů na jakýkoli živý organismus se zabývá řada studií. Tyto studie jsou prováděny především *in vitro*, ale například u mořských živočichů či drobných hlodavců i *in vivo* [13].

Je dokázáno, že se mikroplasty staly součástí potravinového řetězce. Do organismů se dostávají například z potravin, jako je například koření pocházející převážně z asijských zemí [15] či pitné vody [16] a dalších nápojích [14]. Další hojný výskyt mikroplastů, které významně přechází do těl organismů byl zachycen ve vzduchu [14].

K dnešnímu dni chybí přesné údaje o zátěži a působení mikroplastů na lidské zdraví. Některé studie se pokusily odhadnout lidský příjem mikroplastů podle jejich obsahu v potravě a doporučené denní spotřeby potravy a dospěly k závěru, že roční průměrný příjem mikroplastů je přibližně 11 000 částic z mořských plodů, 0–73 000 částic ze soli, 4000 částic z vodovodní vody a 90 000 částic z balené vody. Záleží ale samozřejmě na stravovacích návycích a preferencích [14].

Mikroplasty se do těla dostávají především prostřednictvím gastrointestinálního traktu, ze kterého se poté mohou dostat dále do oběhového systému. Mikroplasty mohou v gastrointestinálním traktu způsobovat střevní záněty, oxidační stres, zvýšenou propustnost střev, poruchu střevní flóry a další zdravotní rizika [14], [17].

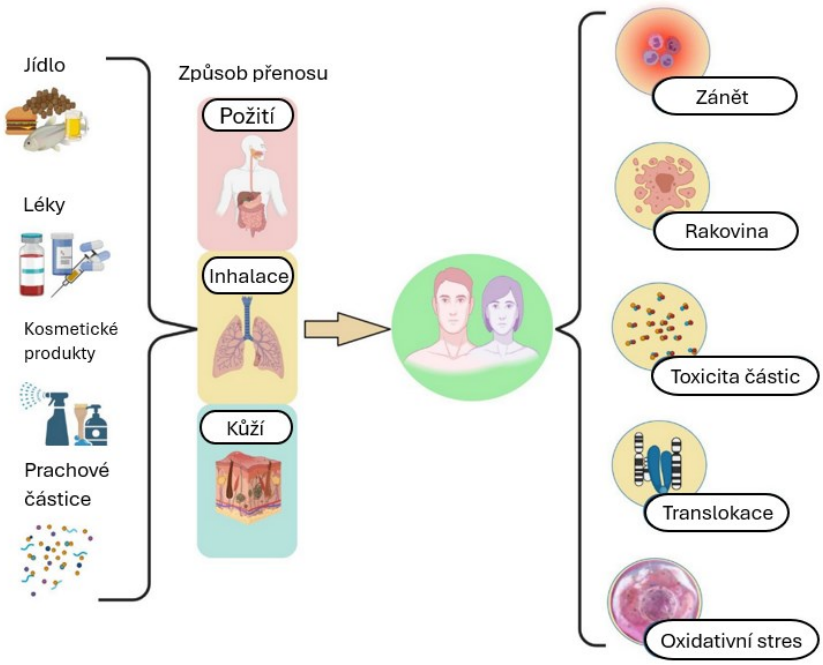
Studie z roku 2022 se zabývala hypotézou, že expozice mikroplasty zvyšuje potenciální rizika rakoviny žaludku. Testování proběhlo na myších, které po dobu 4 týdnů dostávaly zvýšené dávky mikroplastů polystyrenu. Po expozici mikroplasty polystyrenu byla zvýšena hladina exprese genu asialoglykoproteinového receptoru 2 (ASGR2). Poté zesílený ASGR2 indukoval typické znaky rakoviny, jak pro *in vitro*, tak pro *in vivo*. Po expozici mikroplasty polystyrenu byla také pozorována snížená míra přežití a zvýšený růst nádoru [18].

Ve studii z roku 2023, která se zabývala vystavením kojenců mikroplastů bylo zjištěno, že množství mikroplastů v sušeném kojeneckém mléce se pohybovalo od 1 ± 1 do 11 ± 1 položek/100 g a bylo významně vyšší v sušeném mléce v krabici než v sušeném mléce v konzervě, jelikož vnitřní obal kojeneckého mléka v krabici tvoří převážně hliníkové potahovací folie. Tato studie také zjistila, že mikroplasty pocházející z kojeneckých lahví a samotná příprava sušeného mléka by mohla ovlivnit výskyt mikroplastů více než samotné sušené mléko [17].

Studie z roku 2022 se zabývala možností, že vystavení mikroplastů koreluje s výskytem zánětlivých onemocnění střev (IBD), jako je Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida. I přes to, že přesná příčina IBD není známa, má se za to, že je způsobena kombinací environmentálních, imunitních a bakteriálních faktorů. V této studii byly mikroplasty

detekovány ze stolice účastníků. Bylo zjištěno, že mikroplasty mohou přispívat ke tvorbě reaktivních forem kyslíku a tím vyvolat zánět, nebo také mohou pronikat střevním epitelem a zvýšit propustnost střev, což nakonec vede ke střevní imunitní dysfunkci a zánětu. Ve stolici pacientů s IBD, bylo v této studii detekováno více mikroplastů než ve stolici zdravých lidí. Kromě toho se aditiva přidávaná do mikroplastů (např. estery ftalátu a bisfenol A) pravděpodobně uvolňují ve střevním prostředí a tyto chemikálie mohou vést ke střevním zánětům narušením střevní mikroflóry [14].

Vliv mikroplastů a jejich možný účinek na lidské zdraví shrnuje Obr. 3.



Obrázek 3: Potenciální ohrožení lidského zdraví v důsledku environmentální expozice mikroplastů [12].

1.3 Zdroje mikroplastů v životním prostředí

Fyzikálně-chemické vlastnosti konvenčních plastů způsobují jejich odolnost vůči degradaci, což umožňuje jejich hromadění v přírodních ekosystémech. Jejich vysoká molekulová hmotnost a absence funkčních skupin, které podporují oxidační reakční procesy, přispívají ke stabilitě plastů a další nakládání s plastovým odpadem je proto složité. Například při spalování různých syntetických plastů mohou vznikat toxické a těkavé odpadní materiály, jako jsou oxidy dusíku, těžké kovy, sulfidy a dioxiny, látky potenciálně karcinogenní. V některých zemích je stále nejvíce používaná metoda nakládání

s plasty skládkování, což je metoda vysoce neefektivní, a také zabírá mnoho půdy, přičemž vede k hromadění plastového odpadu [19], [20].

25. září 2023 přijala Evropská komise opatření omezující záměrné přidávání mikroplastů do produktů. Tímto omezením by se mělo zabránit uvolňování zhruba půl milionu tun mikroplastů do životního prostředí. Na výrobky neuvolňující mikroplasty se toto omezení nevztahuje. Odvětví, které toto omezení postihlo, je hned několik. Jedná se například o kosmetický průmysl, například peelingy nebo třpytky, zemědělský průmysl, například herbicidy a hnojiva a zdravotnický průmysl. Dále pak umělé materiály, které tvoří sportovní povrchy, jsou jedním z největších zdrojů záměrných mikroplastů v životním prostředí [21].

1.3.1 Zdroje mikroplastů v ovzduší

Mezi atmosférické prostředí lze zařadit okolní vzduch, usazeniny a prach, který je schopen opakované resuspenze do vzduchu. Okolní vzduch zahrnuje obecně jak částice velké, tak střední s průměrem do 10 μm a malé s průměrem do 2,5 μm [22].

Zdroje mikroplastů, které se vyskytují v ovzduší, zůstávají do značné míry neznámé, nicméně zahrnují mikroplasty přecházející mezi fázovým rozhraním vzduch/voda, přestup prostřednictvím mořské mlhy, otěr větrem, odvětrávané mechanické sušení syntetického materiálu, skládky, pohyb člověka při nošení syntetického oblečení či modeláže nehtů v kosmetických salonech [22], [23], [24].

Při zkoumání oceánu a prostředí bezprostředně poblíž oceánu bylo více než 30 % atmosférických částic identifikováno jako částice plastové. Ze zkoumání povrchu oceánu vyplynulo, že mikroplasty o velikosti 20 ± 13 μm jsou rozprašovány do prostředí, potenciálně prasknutím bublin mořské vody či v mořské pěně [24]. Toto by mohlo představovat až 11 % celkových emisí zdrojů mikroplastů do vzduchu. Jakmile se mikroplasty přenesou z povrchové mořské vody do ovzduší, stávají se dostupnými pro transport pomocí větru. Při laboratorním experimentu se ukázalo, že z rozhraní vzduch/voda se do vzduchu přenáší převážně nanoplasty menší 350 nm [22].

Opačným příkladem jsou nehtové salony, které jsou považovány za zdroj emisí mikroplastů do okolního vnitřního vzduchu. Tyto emise jsou zpravidla složeny z částic akrylu, pryže a polyuretanu menších než 50 μm. V tomto případě zůstává neznámé, jak a jak moc tyto salony a nabízené procedury mohou ovlivňovat celkové emise zdrojů mikroplastů do atmosféry [25].

1.3.2 Zdroje mikroplastů ve vodě

Vodní toky obsahují mikroplasty různých tvarů, velikostí, struktur, chemického složení i hustot. Vysoká produkce plastů, a tedy i částic mikroplastů, zapříčinila jejich zvýšený nárůst koncentrace při mořských pobřežích, kdy lze v některých oblastech mluvit až o tisících částic na 1 metr krychlový. A očekává se, že tento problém v budoucnosti poroste [11], [26].

Tyto částice ovlivňují vodní útvary tak, že se hromadí a dále se z nich uvolňují různé toxické organické a anorganické znečišťující látky, ať už těžké kovy či perzistentní organické látky, které mohou být na mikroplasty sorbovány [26].
Zdroj mikroplastů ve vodních tocích je nejvíce přisuzován uvolnění vláken při praní syntetického prádla a výrobkům osobní péče (barvy na vlasy, zubní pasty, mýdla) obsahující mikrokuličky, které se splachují do odpadních vod a do otevřených vodních systémů se dostávají mnoha cestami. Dále pak jsou to různá barviva, epoxidy či oděrky z pneumatik.

Mikroplasty se z pneumatik mohou uvolňovat během oděru, opravy či jejich recyklace ve formě částic, drtě a různých nečistot prováděných dle těchto procesů. Tyto mikroplastické částice se mohou dostávat buď do půdy nebo být splachovány do odpadních vod [26]. Vlákna mikroplastů se mohou uvolňovat do životního prostředí z textilních výrobních procesů, z praní a ze zvětrávání textilních odpadů. Chemické a mechanické namáhání, kterému jsou textilní materiály vystaveny během procesu praní v pračce, vede k uvolňování velkého množství mikrovláken z textilu [20]. Studie z roku 2019 na toto téma zmiňuje uvolnění 124 až 308 mg mikrovláken na 1 kg vyprané tkaniny. Tato vlákna částečně prochází čistírnami odpadních vod, ze kterých se dostávají dále do vodních toků, popř. oceánů [27].

Také rybářské vybavení významně přispívá k počtu mikroplastů v moři a odhaduje se, že asi 18 % všech plastových odpadků v oceánu pochází z rybářského průmyslu. Velká část tohoto plastu pochází z opuštěného, ztraceného a jinak vyřazeného rybářského vybavení [28].

1.3.3 Zdroje mikroplastů v půdě

I přes to, že půda hraje zásadní roli při regulaci koloběhu živin, udržování biodiverzity organismů a poskytování živin, byla ještě v nedávných letech často opomíjena a výzkumy ohledně mikroplastů se zaměřovaly spíše na vodní prostředí, zejména oceány. Studiem

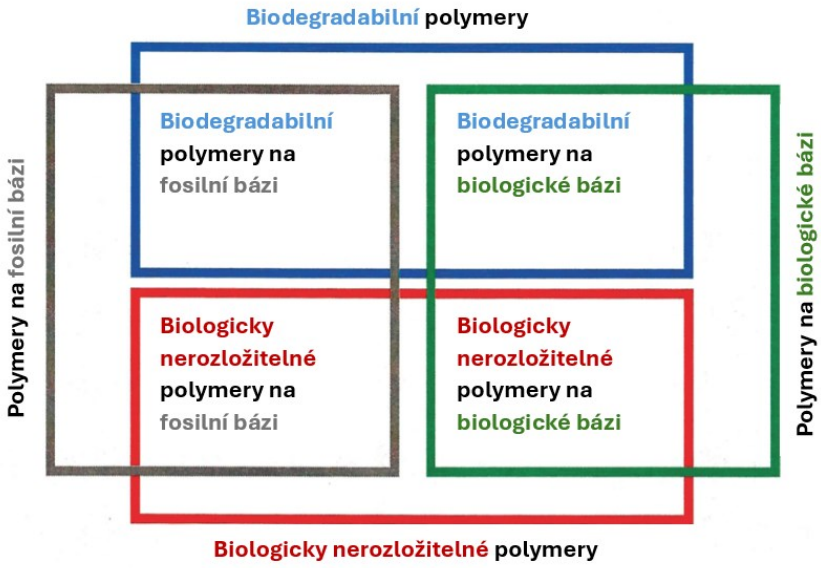
mikroplastů v půdě se ale již zabývá stále více vědců a studie ukázaly, že půdní prostředí přijímá také značnou část plastového odpadu [18].

Zemědělská půda představuje vhodné prostředí pro hromadění mikroplastů. Tyto mikroplasty mohou pocházet z různých zdrojů, a to ze zdrojů používaných záměrně, jako použití mulčovacích folií či potahovaných hnojiv a pesticidů, nebo mohou být zavedeny neúmyslně, a to spolu s materiály používanými ke zvýšení úrodnosti, jako jsou kaly a sedimenty z čištění odpadních vod či zavlažování nevhodnou vodou [29].

2 BIODEGRADABILNÍ PLASTY

V posledních letech se konvenční plasty začaly v některých aplikacích částečně nahrazovat plasty biodegradabilními, což by mohlo být jedno z možných řešení omezení výroby a použití konvenčních plastů [30]. Biodegradabilní plasty jsou druhy plastů, jejichž vlastnosti splňují požadavky pro použití, zůstávají nezměněny po celou dobu skladování a manipulace, ale po použití se mohou plně rozložit bez výrazné zátěže životního prostředí [6].

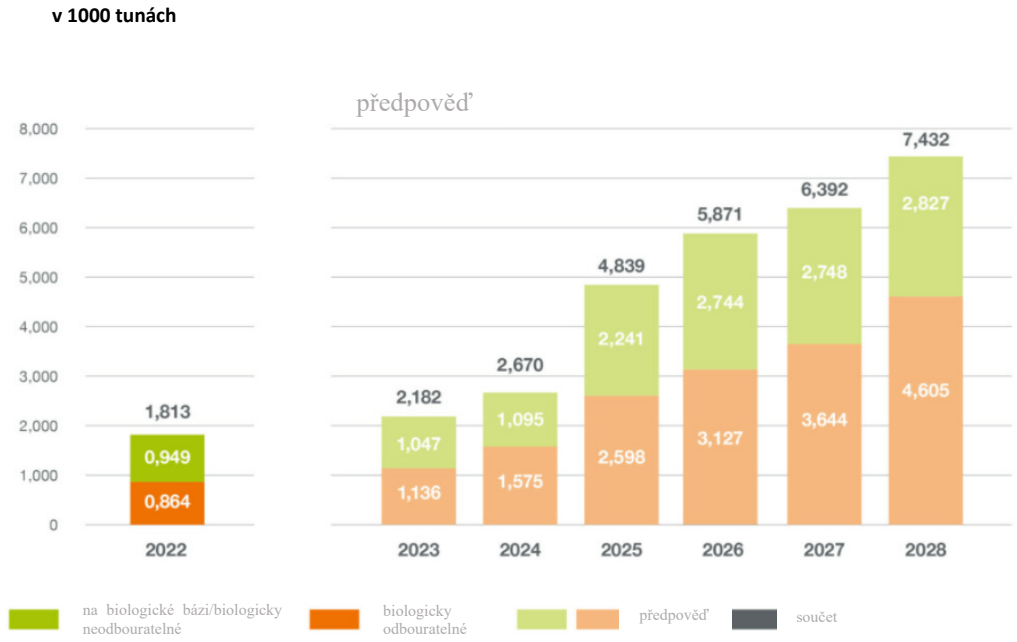
Biodegradabilních plastů je hned několik druhů. Na jedno z možných rozdělení poukazuje Obr. 4..



Obrázek 4: Možné rozdělení plastů z hlediska biodegradability [31].

Biodegradabilní plasty se mohou vyrábět např. z obnovitelných surovin, jako je celulóza, škrob, polyhydroxyalkanoáty (PHA), polyhydroxybutyrát (PHB) či kyselina polymléčná (PLA), ale také z ropy (PBAT) [6]. Dále jsou produkovány také plasty biologicky nerozložitelné, které jsou vyráběny z obnovitelných zdrojů (bioPVC, bioPET) [32].

Podle organizace European Bioplastic lze očekávat zvýšení produkce biodegradabilních polymerů z 2,18 milionu tun v roce 2023 až na 7,43 milionu tun v roce 2028, viz Obrázek 5 [33]. I přes to, že se míra použití biodegradabilních polymerů neustále zvyšuje, netvoří ani 1 procento z celkové výroby plastu ve světě [30].



Obrázek 5: Globální produkce bioplastů [33].

Biodegradabilní polymery se nejvíce používají jako obalové materiály, začaly být využívány také v zemědělství [34].

V roce 2018 zahájila Evropská Unie „Evropskou strategii pro plasty v oběhovém hospodářství“, kde také pojednává o využití biodegradabilních plastů, které s sebou nese i jistá rizika. Pokud tyto plasty nebudou správně označovány a zpracovávány, popř. konzumentem správně recyklovány, mohly by výrazně ztížit recyklaci konvenčních plastů. Například plasty, označené jako „kompostovatelné“, nemusí být vhodné pro domácí kompostování a při špatné recyklaci a promícháním se s plasty konvenčními mohou ovlivňovat výslednou kvalitu recyklovaných látek [35].

Velké rozdíly ve faktorech různých prostředí (teplota, vlhkost atd.) mají za následek složité hodnocení biodegradace polymerů. Rychlost biodegradace a velikost polymeru by měly být propojeny a posuzovány v kontextu s konkrétním prostředím, které tyto plasty přijímá. Také samotný přenos biodegradabilních polymerů do tohoto prostředí ovlivní rychlost samotné biodegradace a tím i koncentraci a životnost polymeru [31].

Stále ale existují značné mezery ve znalostech biodegradabilních polymerů. Účinky akumulace konvenčních plastů byly zdokumentovány, je však potřeba dokumentace i možné akumulace biodegradabilních polymerů. Pokud rychlost uvolňování biodegradabilních polymerů překročí rychlost jejich rozkladu, je zde riziko jejich

akumulace, což povede k podobným rizikům pro životní prostředí jako mají konvenční plasty [31].

2.1 Proces biodegradace biodegradabilních plastů

K degradaci dochází zvětráváním a biologickými aktivitami, zejména aktivitou mikroorganismů. Biodegradabilní polymery mohou fungovat jako zdroj uhlíku mikroorganismů, jako jsou bakterie, plísně a případně také některé řasy, které tyto plasty rozkládají na jednodušší sloučeniny a jednotlivé prvky, jako je oxid uhličitý, voda, v anaerobním prostředí pak methan [6].

Proces biodegradace lze rozdělit do čtyř kroků: biodeteriorace, depolymerizace, bioasimilace a mineralizace, viz Obrázek 6 [36].

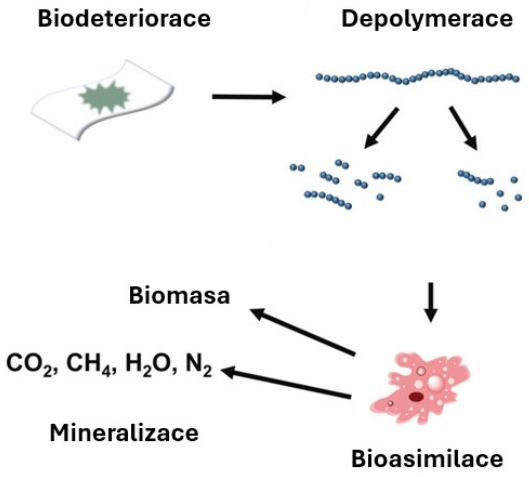
Při biodeterioraci dochází k tvorbě mikrobiálního biofilmu, kdy je materiál fragmentován na menší částice [36].

Při depolymerizaci mikroorganismy vylučují hydrolytické enzymy, které zahajují oxidaci, kdy se polymerní řetězce depolymerizují na oligomery, dimery a monomery [36], [37].

Při bioasimilaci mikrobiální buňka přijímá takto vytvořené malé molekuly. Ty následně metabolizuje na primární či sekundární metabolity [36].

V posledním kroku, proces mineralizace, jsou tyto metabolity mineralizovány na konečné anorganické produkty [36].

Celý tento proces je také ovlivněn abiotickými faktory, např. neenzymatická hydrolýza nebo UV záření [38].



Obrázek 6: Jednotlivé kroky biodegradace [36].

2.2 Mikroplasty vznikající z biodegradabilních plastů

Mikroplasty vznikající z biodegradabilních polymerů lze v současné době nalézt v každém ekosystému. Jejich koncentrace je sice výrazně nižší než mikroplasty vznikající z konvenčních plastů, ale dá se předpokládat, že jejich množství bude stoupat v dalších letech se vzrůstající výrobou biodegradabilních plastů. Odvětví, která přispívají k produkci mikroplastů z biodegradabilních polymerů jsou například zemědělství (mulčovací folie), potravinářský průmysl (obaly), lze sem také zařadit 3D tisk [6], [33].

Ne všechny biodegradabilní polymery mohou být v životním prostředí plně degradovány, často vyžadují řízený proces, aby se nastartoval samotný biologický rozklad, a v důsledku toho je téměř nemožné kontrolovat a zajistit úplnou biodegradaci dokonce i potenciálně rozložitelných plastových materiálů v životním prostředí. Bylo zjištěno, že právě tyto plasty se rozpadají na mikroplasty a nanoplasty, dle některých studií se s větší pravděpodobností hromadí v prostředí více tyto polymery než plasty konvenční, kde mohou mít podobné účinky jako mikroplasty konvenčních plastů [6],[39]. Také rychlost degradace (a potenciálně tak vznik sekundárních mikroplastů) biodegradabilních polymerů násobně převyšuje rychlost degradace konvenčních polymerů [6].

Zkoumané polymery se v ideálních podmínkách rozkládají zcela, v otevřeném prostředí jejich rozklad nemusí dosahovat požadované míry [31]. Ideálních podmínek pro biodegradaci lze dosáhnout v laboratořích a průmyslových kompostárnách, v samotném životním prostředí to ale může být velmi složité [40], [7].

V roce 2019 byla provedena studie zkoumající degradabilitu hned několika biodegradabilních, oxo-degradabilních, kompostovatelných a PE tašek a sáčků na potraviny. Dále byly zkoumány proužky ze všech uvedených materiálů. Oxo-degradabilní materiály obsahovaly prooxidanty pro urychlenín foto - a termo-oxidace. Studie probíhala po dobu 3 let. Degradabilita byla zkoumána v půdě, moři a venkovním prostředí. Mezi 9. a 27. měsícem se všechny zkoumané sáčky rozpadly na větší kusy a mikroplasty. Po 27 měsících bylo dosaženo rozpadu pouze kompostovatelné tašky, a to v mořském prostředí. Ostatní zkoumané tašky zůstaly neporušeny, popř. obsahovaly pouze malé trhliny. Po 3 letech byl prokázán rozpad malých částí oxo-degradabilních, biodegradabilních i PE tašek ve venkovním prostředí na mikroplasty, velká část zůstala neporušena. V půdě i v moři přetrvaly a zůstaly funkční tašky oxo-degradabilní, viz Obrázek 7, biodegradabilní i PE. Kompostovatelná taška zůstala v půdě neporušena, ve

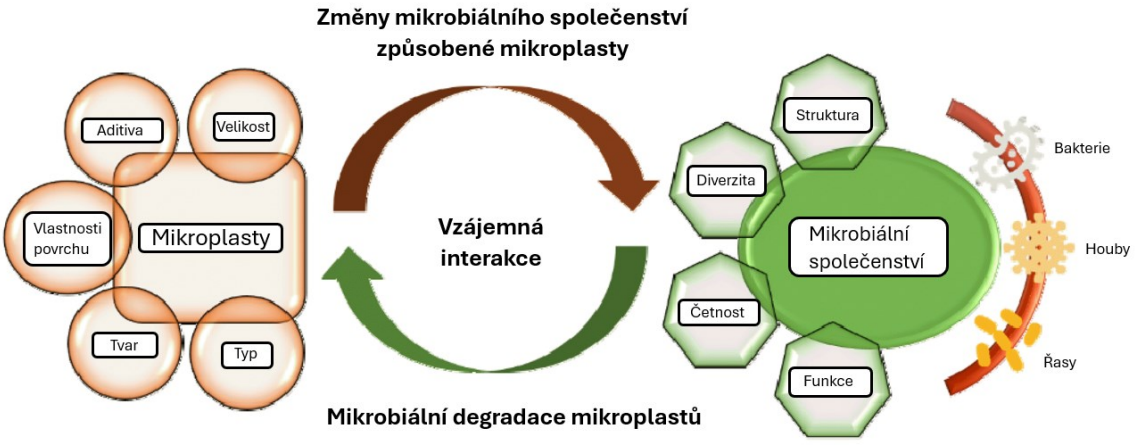
venkovním prostředí se degradovala s větší rychlostí než tašky z ostatních materiálů [31], [41].

Obrázek 7: Tašky vyrobeny z oxo-degradabilního materiálu po 3 letech. Vlevo taška vytažená z moře, vpravo taška pohřbená v půdě. Obě tašky byly schopny udržet 2,25 kg potravin [41].

3 VLIV MIKROPLASTŮ VZNIKAJÍCÍCH Z KONVENČNÍCH A BIODEGRADABILNÍCH POLYMERŮ NA PŮDNÍ PROSTŘEDÍ

Půda se stává jedním z hlavních úložišť mikroplastů. Toto zjištění je velkou hrozbou pro ekologické zemědělství, a také pro potravinovou bezpečnost [42]. Přítomnost mikroplastů v půdě zásadně ovlivňuje schopnost půdy zadržovat vodu [27]. Hlavní účinky mikroplastů v půdě se pravděpodobně vyskytují na rozhraní mezi půdními částicemi a plastovými polymery (tj. plastisférou). Podobně jako interakce v rhizosféře rostlin by fyzikálně-chemické vlastnosti mikroplastů mohly ovlivňovat diverzitu a aktivitu půdních mikrobiálních společenstev na rozhraní půda-plast, viz Obr. 4. Tyto interakce mohou podporovat hojné množení a aktivitu specifických mikrobiálních taxonů a vést k tvorbě oblastí, ve kterých je diverzita mikroorganismů významně ovlivněna přítomností mikroplastů. Se zvyšující se mírou kontaminace mikroplasty mají mikrobiální niky na rozhraní půda-mikroplast (tj. mikroplastisféra) stále větší ekologický význam [43].

Dosavadní výzkum naznačuje, že dopady mikroplastů z biodegradabilních polymerů na vlastnosti půdy mohou souviset s různými faktory. Důležité jsou samotné vlastnosti mikroplastu, jako je jeho velikost a tvar, hydrofobicita, hustota a rozdíly ve složení monomerů a prvků. Dále také vlastnostmi samotného polymeru, jako je molekulová hmotnost nebo funkční skupiny [40], [44].



Obrázek 8: Vliv mikroplastů na půdní společenstvo [43].

3.1 Vliv vlastností půdy na vznik mikroplastů

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2, je složité zajistit úplnou biodegradaci biodegradabilních polymerů v přírodě. Ne zcela degradované polymery tvoří mikroplasty,

které mohou mít dlouhou životnost. Jejich rozložitelnost je ovlivněna biotickými i abiotickými faktory prostředí, například hodnotou pH, teplotou, vlhkostí, biosurfaktanty a enzymy [40].

Pro příklad je zde uvedena teplota. Teplota je pravděpodobně jedním z nejdůležitějších faktorů řídících rychlost biodegradace v otevřeném prostředí. Má obrovský vliv na chemické a biochemické reakce, také silně ovlivňuje taxonomické složení a metabolické aktivity mikrobiálních společenstev. S narůstající teplotou se významně zvyšuje rychlost většiny abiotických i biotických reakcí (za předpokladu, že nedochází např. ke snížení vlhkosti či tepelné inaktivaci enzymů), ale také se mění zastoupení mikroorganismů [30], [8].

Biodegradace polymerů závisí na přítomnosti specifických mikroorganismů schopných vylučovat extracelulární enzymy, které mají schopnost katalyzovat rozpad polymeru na menší části. Enzymy působí jako biokatalyzátory těchto reakcí, snižují aktivační energii, která vede k degradaci polymeru [31].

3.2 Vliv mikroplastů na abiotické vlastnosti půdy

Voda má klíčový vliv na kvalitu i úrodnost půdy. Půda je schopna zadržovat vodu, která může být využita mikroorganismy či rostlinami. Funguje jako prostředek k transportu živin ve formě rozpuštěných iontů a umožňuje průběh chemických reakcí [45]. Obecně mohou mikroplasty ovlivňovat fyzikálně-chemické vlastnosti půdy, jako je stabilita půdy, schopnost zadržovat vodu, dále celkový obsah dusíku v půdě nebo celkový obsah fosforu. Tyto změny vlastností mohou postupně vést až ke změnám koloběhu uhlíku a jeho ukládání v půdě [29], [46]. Toto ovlivnění zásob uhlíku může mít poté dopad na půdní mikrobiální společenství [29].

3.3 Vliv mikroplastů na mikroorganismy

Již několik studií poukázalo na fakt, že složení polymeru je úzce spjaté se složením mikrobiálního společenství [47]. Přidání různých mikroplastů může shlukovat různé bakteriální skupiny zapojené do biodegradace mikroplastů z biodegradabilních polymerů, což významně mění půdní mikrobiální diverzitu. V blízkosti plastisféry se mohou ve srovnání s půdou nezatíženou mikroplasty více vyskytovat mikrobiální skupiny s odolností a potenciální degradační schopností, mění se tak složení mikrobiální komunity vedoucí k specifickému obohacení půdy určitými mikrobiálními skupinami. Také dopad

mikroplastů z biodegradabilních polymerů na diverzitu hub může vést ke změnám v charakteristikách ekosystému, jako je ukládání uhlíku v půdě, které je ve velké míře ovlivněno právě houbami [48].

Ve studii z roku 2022, zabývající se účinkem mikroplastů z konvenčních a biodegradabilních polymerů na mikrořasy *Chlorella vulgaris* byl prokázán inhibiční účinek. Byly testovány 4 polymery – mikro-PE (m-PE), mikro-PA (m-PA), mikro-PLA (m-PLA) a mikro-PBS (m-PBS). Bylo zjištěno, že všechny 4 vzorky měly inhibiční účinek na buněčný růst těchto mikrořas. Zatímco mPE měl nejvyšší míru inhibice při 1000 mg/l, ostatní zástupci měli nejvyšší míru inhibice při 100 mg/l. Obsah pigmentů byl ale oproti negativní kontrole vyšší. Obecně lze říci, že vyšší obsah mikroplastů podporoval tvorbu pigmentů. Je tedy možné, že pigmenty mohou působit jako obranný systém pro mikrořasy [49].

3.4 Vliv mikroplastů na zemědělské plodiny a makroedafon

Je mnoho studií zkoumajících vliv biodegradabilních mikroplastů a mikroplastů z konvenčních polymerů na růst rostlin i životnost organismů, kde se výsledky znatelně liší.

Podle studie z roku 2023, zabývající se aktivitou enzymů a odezvou kořenů plodin v půdě kontaminovanou mikroplasty z biodegradabilních polymerů (PBAT), bylo zjištěno, že akumulace biodegradabilních mikroplastů výrazně ovlivňuje kořenový systém. Kořenový systém sóji byl ovlivněn méně než kukuřice. Biomasa kořenů sóji byla snížena o 25-40 % ve stádiu sklizně, zatímco biomasa kořenů kukuřice klesla o 24-64 %. Snížila se také aktivita enzymů. Výsledky naznačují, že výskyt mikroplastů z biodegradabilních polymerů mohou mít nepříznivý vliv na kořenový systém rostlin a aktivitu enzymů, což může vést ke změnám cyklu dusíku a uhlíku v systému půda-rostlina [50].

Studie z roku 2021 se zabývala růstem fazole obecné v půdě kontaminované mikroplasty. Testovanými polymery byl nízkohustotní polyethylen (LDPE-MP) a kyselina mléčná (PLA + PBAT) ve směsi s PBAT (Bio-MPs). Vyšší koncentrace LDPE-MP nevykazovaly žádný výrazný vliv na biomasu výhonků ani na počet lusků, avšak obsah chlorofylu v listech byl nižší než u negativní kontroly. Délka kořenů v půdě s LDPE-MP dokonce převyšovala délku kořenů negativní kontroly. Vyšší koncentrace Bio-MPs vykazovaly negativní vliv na biomasu výhonků i biomasu kořenů, i přes to, že samotná délka kořenů

přesahovala délku negativní kontroly. Výsledky poukazují na fakt, že výskyt mikroplastů v půdě ovlivňuje růst rostlin [51].

Další studie z roku 2023 představila návrh, že mikroplasty biodegradabilních polymerů vyskytující se v půdě po krátký časový úsek (5 měsíců), nemají vliv na zdraví rostlin a půdy. Byla provedena terénní studie zkoumající účinek PLA na růst ovse a sóji. Bylo zjištěno, že mikroplasty PLA nemají významný vliv na aktivitu půdních enzymů, fyzikálně-chemické vlastnosti půdy, vlastnosti kořenů, rostlinnou biomasu ani na výnos plodin [52].

Studie z roku 2023 se zabývala dopadem mikroplastů na žížaly. Byly použity 2 různé druhy polymerů, které byly fragmentovány na mikroplasty. Jmenovitě mikroplasty z biodegradabilního polymeru PBAT a mikroplasty z konvenčního polymeru LDPE. Celá studie probíhala 20 dnů v mezokosmech naplněnými přírodní půdou. Mikroplasty byly vloženy pouze na povrch půdy. Výsledky odhalily, že žížaly nevykazovaly makroskopické zhoršení zdravotního stavu (úbytek hmotnosti, vitalita). PBAT ve střevech do určité míry zdegradoval, LDPE zůstal nezměněn. Ve střevech žížal nebyla zjištěna akumulace mikroplastů. To byl případ LDPE i PBAT mikroplastů, což naznačuje, že mikroplasty biodegradabilních polymerů se při průchodu trávícím systémem žížal částečně rozkládají, ale nemusí mít škodlivé účinky. Studie ukázala, že mikroplasty, pokud jsou přítomny v koncentracích relevantních pro životní prostředí, nemusí mít nutně negativní dopad na žížaly [53].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁLY A METODY

Použité přístroje

Automatické pipety Nicciipet, Eppendorf AG;

Předvážky KERN WEW 1500-2M, KERN, Německo;

Analyzátor vlhkosti MB25, OHAUS Corporation, USA;

Analytické váhy KERN 440-47; KERN, Německo

Hmotnostní spektrometr s membránovým vstupem (MSS), Hiden Analytical HPR-40 DSA, Velká Británie;

Provzdušňovací aparatura;

Fluorescenční mikroskop Olympus BX53M, OLYMPUS, Japonsko;

Homogenizér Bead Ruptor Elite, Omni International, USA;

Vortex Mixer PV-1, Thermo Fisher Scientific, USA;

Centifuga MiniSpin plus, Eppendorf AG;

Fluorometr DeNovix QFX, DeNovix Inc., USA;

Tecan Infinite M1000Pro Plate Reader, Tecan Trading AG, Švýcarsko;

Chladnička Whirlpool kombi WBE 34162, Whirlpool Corporation, USA;

Sterilní vzorkovnice o objemu 250 ml, 500 ml;

Laboratorní sklo běžné.

4.1 Použité chemikálie

KCl, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika;
$KHCO_3$, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika;
HCl, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika.

4.2 Použité kity

LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kit, Thermo Fisher Scientific, USA;

DNeasy PowerSoil Pro Kit, QUIAGEN, Německo;

dsDNA High Sensitivity Assay Kit, DeNovix Inc., USA.

4.3 Použité polymerní materiály

TianAn biopolymer, Tianan Biologic Material Co., China, typ the ENMAT Y1000 brand;
Ecoflex Basf, Germany, typ FT 2341 EV/AH;
BioPBS, Mitsubishi Chemical Group, Velká Británie, typ BioPBS: FD92 [PM/PB].

Z materiálů byly vylisovány fólie ve spolupráci s Mgr. Adélou Baťovou.

4.4 Inkubace mikroplastů v půdě

4.4.1 Použité půdy

Testy probíhaly ve 3 zemědělských půdách, které byly odebrány v lokalitách na území ČR. Půda P1 byla použita čistě pro screeningovou studii, kde byla pomocí fluorescenční mikroskopie sledována tvorba biofilmu na povrchu testovaných biodegradabilních plastů (TianAn biopolymer, BioPBS a Ecoflex). Pro inkubace mikroplastů v půdě byly následně vybrány 2 zemědělské půdy z České republiky s označením P2 a P3. V těchto půdách byla sledována biodegradace 2 biodegradabilních plastů, tedy TianAn biopolymeru a Ecoflexu. Půda P2 byla odebrána v rámci bakalářské práce. Půdy P1 a P3 byly dodány externě. Půda P1 představovala půdní druh hlinitý, Půda P2 jílovitý a půda P3 písčitý.

Půda P2 byla odebrána dle normy ISO 18400-103:2017 - Kvalita půdy-Odběr vzorků [54].

4.4.2 Stanovení pH, sušiny a vlhkosti půdy

Principem stanovení sušiny je zahřátí na takovou teplotu, při níž se voda odpaří. Z rozdílu hmotnosti se pak stanoví obsah sušiny v procentech [55].

Vlhkost půdy je množství vody, včetně vodní páry, obsažena v půdě. Je definována jako poměr hmotnosti vody obsažené ve vzorku půdy k hmotnosti vysušeného vzorku půdy [56].

Pro stanovení sušiny i vlhkosti půdy pro všechny 3 půdy byl použit Analyzátor vlhkosti MB25 OHAUS.

Na hliníkovou destičku bylo naváženo množství půdy odpovídající 2–3 gramům, viz Obrázek 9. Přístroj byl uzavřen a zapnut. Po několika minutách byly známy hodnoty sušiny i vlhkosti půdy.

Obrázek 9: Vzorek půdy připravený k analýze

pH půdy P1, P2 i P3 bylo stanoveno dle normy ČSN EN ISO 10390 (836221) - Půdy, upravený bioodpad a kaly - stanovení pH [57].

Jako první byl připraven roztok KCl o koncentraci 1 mol/l. Do 500 ml odměrné baňky bylo naváženo 37,28 g KCl a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Hmotnost navažovaného KCl byla vypočítána dle vzorce:

$$m_{KCl} = V * c * M_{KCl}$$

kde:

m_{KCl}	*hmotnost navažovaného KCl [g];*
V	*celkový objem roztoku [l];*
c	*celková koncentrace roztoku [mol/l];*
M_{KCl}	*molární hmotnost KCl [g/mol].*

Vzorky byly připraveny v poměru 5:2, na 50 ml roztoku KCl náleželo 20 g sušiny půdy P1. Do 2 Erlenmayerových baněk bylo naváženo 21,7 g půdy P1, což odpovídá 20 g sušiny půdy P1. Hmotnost navažované půdy P1 byla zjištěna dle vzorce:

$$m_{půda} = \frac{m_s}{v}$$

kde:

$m_{půda}$ *hmotnost navažované půdy [g];*
m_s *hmotnost sušiny [g];*
v *celková sušina půdy P1 [%].*

Do Erlenmayerových baněk s naváženou půdou P1 bylo přilito 50 ml připraveného roztoku KCl. Obsah baněk se nechal 2 hodiny louhovat. Poté se obsah baněk přefiltroval přes filtrační papír a získaný filtrát byl použit k měření pH. pH bylo měřeno pomocí skleněné elektrody.

Stejný postup měření byl použit i pro půdy P2 a P3.

4.4.3 Stanovení maximální vodní kapacity (WHC)

Maximální vodní kapacita (WHC – Water Holding Capacity) je stav, kdy je půda schopna v přirozeném stavu udržet v pórech co největší množství vody. Vyjadřuje se v jednotkách objemu na gram suché zeminy. Principem stanovení je nasycení vzorku vodou a následná přirozená ztráta vody do ustanovení rovnováhy. Z rozdílu hmotností se při znalosti obsahu sušiny spočítá WHC [58].

Pro stanovení WHC všech půd byly použity pro každou půdu vždy 2 vzorky s naváženou půdou a 2 vzorky kontrolní, které půdu neobsahovaly.

Do předem nachystaných 4 Erlenmayerových baněk byly vloženy odpovídající nálevky s předem zváženými filtračními papíry. Do 2 vybraných Erlenmayerových baněk bylo poté přidáno 20 g půdy. Všechny vzorky byly prolity 100 ml destilované vody a obaleny alobalem. Vzorky byly ponechány k filtraci při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin.

Vzorky byly zváženy a byla vypočítána maximální vodní kapacita dle vzorce:

$$WHC_{max} = \left(M_{vz} - M_k - \frac{Suš}{100 * N}\right)\left(\frac{Suš}{100 * N}\right)$$

kde:

M_{vz} *hmotnost filtračního papíru s nasycenou půdou [g];*
M_k *hmotnost filtračního papíru v kontrole [g];*
$Suš$ *obsah sušiny půdy [%];*
N *počáteční navážka přirozeně vlhké půdy v nálevce.*

4.4.4 Příprava inkubací

Pro půdy P1, P2 i P3 byly připraveny inkubace s 30 g sušiny půdy. Poté byla přidávána voda dle vybraných koncentrací WHC.

Pro půdu P1 bylo vybráno 20 sterilních vzorkovnic o objemu 250 ml. Nejprve byla stanovena sušina, ze které bylo následně přepočítáno skutečné množství navažované půdy, v tomto případě 32,5 g. Přepočet skutečného množství navažované půdy byl u všech půd stejný, pouze se měnilo procento sušiny:

$$30\ g \ldots\ldots\ldots 92{,}22\ \%$$
$$\underline{x\ g \ldots\ldots\ldots 100\ \%}$$
$$x = \frac{30 * 100}{92{,}22} = 32{,}5\ g$$

Poté byla k půdě přidávána voda dle zvoleného procentuálního obsahu WHC. Bylo vybráno celkem 5 různých WHC – WHC 20 %, WHC 40 %, WHC 60 %, WHC 80 % a WHC 100 %. Každému WHC byly přiděleny 4 sterilní vzorkovnice. K vzorkovnicím s WHC 20 % bylo přidáváno celkem 5,3 ml vody, k WHC 40 % bylo přidáno 13 ml vody, k WHC 60 % bylo přidáno 21 ml vody, k WHC 80 % bylo přidáno 28,5 ml vody a k WHC 100 % bylo přidáno 36,5 ml, viz Obrázek 10.

Po stanovení maximální vodní kapacity byla tato hodnota přepočítána pro různá WHC v ml/g. Po získání této hodnoty byla ihned vynásobena navážkou půdy (30 g). Z této hodnoty byla následně odečtena hodnota vody, která již v půdě byla (skutečná navážka půdy – teoretická navážka půdy).

$$1{,}3\ ml/g \ldots\ldots\ldots 100\ \%$$
$$\underline{x\ ml/g \ldots\ldots\ldots 20\ \%}$$
$$x_{20} = \frac{1{,}3 * 20}{100} = 0{,}26\ ml/g$$
$$V_{20} = (x_{20} * navážka\ sušiny\ půdy) - voda\ již\ v\ půdě\ obsažena$$
$$V_{20} = (0{,}26\ ml/g * 30g) - 2{,}5\ g = 5{,}3\ ml$$

Vzorkovnice byly uzavřeny a inkubovány při 25 °C. V průběhu inkubace byly odebírány vzorky pro analýzu pomocí fluorescenční mikroskopie.

Pro půdu P2 bylo vybráno 48 sterilních vzorkovnic o objemu 500 ml. Nejprve byla stanovena sušina, ze které bylo následně přepočítáno skutečné množství navažované půdy,

také 32,5 g. Poté byla k půdě přidávána voda dle zvoleného procentuálního obsahu WHC. Byly vybrány 3 různé WHC – WHC 10 %, WHC 40 % a WHC 60 %. Každému WHC bylo přiděleno 16 sterilních vzorkovnic. K vzorkovnicím s WHC 10 % bylo přidáváno celkem 1,9 ml vody, k WHC 40 % bylo přidáno 15 ml vody a k WHC 60 % bylo přidáno 23 ml vody. Vzorkovnice byly uzavřeny a inkubovány při 25 °C po dobu 14 dnů. Po 7 a 14 dnech byla měřena mineralizace v půdě bez přidaných vzorků a probíhala tzv. předinkubace. Poté byly přidány vzorky polymerů. Mineralizace byla měřena každých 7 dní po dobu 35 dní.

Pro půdu P3 bylo také vybráno 48 sterilních vzorkovnic o objemu 500 ml. Sušina, ze které bylo následně přepočítáno skutečné množství navažované půdy, byla tentokrát stanovena na 31,4 g. Poté byla k půdě přidávána voda dle zvoleného procentuálního obsahu WHC. Byly vybrány 3 různé WHC – WHC 10 %, WHC 40 % a WHC 60 %. Každému WHC bylo přiděleno 16 sterilních vzorkovnic. K vzorkovnicím s WHC 10 % bylo přidáváno celkem 3,5 ml vody, k WHC 40 % bylo přidáno 18 ml vody a k WHC 60 % bylo přidáno 28 ml vody. Vzorkovnice byly uzavřeny a inkubovány při 25 °C po dobu 14 dnů. Po 7 a 14 dnech byla měřena mineralizace v půdě bez přidaných vzorků polymerů a probíhala tzv. předinkubace. Poté byly přidány vzorky polymerů. Mineralizace byla měřena každých 7 dní po dobu 35 dní.

V rámci práce byla sledována mineralizace v první fázi biodegradace materiálů, v experimentu je pokračováno v rámci dalšího výzkumu.

Obrázek 10: Vzorkovnice připravené k inkubaci, půda P1

4.5 Stanovení mineralizace materiálu pomocí hmotnostního spektrometru

Hmotnostní spektrometr byl zapnut a ponechán k ustálení signálu po dobu přibližně 30 minut. Během této doby byly nachystány vzorkovnice ke změření kalibrační křivky.
Bylo naváženo 1,1010 g standardu $KHCO_3$. Ve 100 ml odměrné baňce byl hydrogenuhličitan rozpuštěn a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku a celý roztok byl promíchán. Tento roztok byl poté pipetován do 7 vzorkovnic o objemu 500 ml. V každé vzorkovnici bylo obsaženo 0,2; 0,45; 1; 1,5; 2; 3 a 8 % $KHCO_3$. Do vzorkovnice s 0,2 % $KHCO_3$ bylo pipetováno 0,43 ml připraveného roztoku $KHCO_3$. Do vzorkovnice s 0,45 % $KHCO_3$ bylo pipetováno 0,96 ml připraveného roztoku $KHCO_3$. Do vzorkovnice s 1 % $KHCO_3$ bylo pipetováno 2,14 ml připraveného roztoku $KHCO_3$. Do vzorkovnice s 1,5 % $KHCO_3$ bylo pipetováno 3,21 ml připraveného roztoku $KHCO_3$. Do vzorkovnice s 2 % $KHCO_3$ bylo pipetováno 4,28 ml připraveného roztoku $KHCO_3$. Do vzorkovnice s 3 % $KHCO_3$ bylo pipetováno 6,41 ml připraveného roztoku $KHCO_3$ a do poslední vzorkovnice s 8 % $KHCO_3$ bylo pipetováno 17,1 ml připraveného roztoku $KHCO_3$. Do všech vzorkovnic byly následně vloženy zkumavky obsahující 10 ml 1M HCl a vzorkovnice byly řádně uzavřeny. Po uzavření vzorkovnic se zkumavky obsahující 1M HCl a roztok $KHCO_3$ smíchaly a byly ponechány stát po dobu 3 hodin.
Po přípravě vzorkovnic pro kalibrační křivku a ustálení signálu přístroje byly změřeny vlastní vzorky. Tenká kapilára přístroje byla zavedena přes septum vzorkovnice s vlastním vzorkem. Po ustálení signálu byly zapsány 2 hodnoty – CO_2 a argon. První hodnota vyjadřuje produkci CO_2, což je produkt aerobní biodegradace. Argon slouží jako standard měření. Tímto způsobem byly následně změřeny všechny zbývající vzorky, poté i vzorkovnice kalibrační křivky.
Po změření hodnot byly vlastní vzorkovnice provzdušněny pomocí provzdušňovací aparatury, která jímá vzduch dovnitř vzorkovnic. Každá vzorkovnice byla provzdušňována po dobu 4 minut.

4.5.1 Zpracování a vyhodnocení dat naměřených pomocí hmotnostního spektrometru s membránovým vstupem

Půdy P2 a P3 byly inkubovány po dobu 14 dnů, poté byly přidány polymerní folie. Inkubace byla provedena za účelem adaptace mikroorganismů na vnitřní podmínky

vzorkovnic, což je důležité z důvodu převedení výsledků na podmínky vnějšího prostředí, kde by se tyto materiály mohly hromadit.

Mineralizace materiálu byla stanovena dle vzorců:

Denní produkce uhlíku vyjádřena ve formě CO_2:

$$m_{(d)C} = \frac{p \cdot (s_{vz} - q).V_g}{100 \cdot k \cdot R \cdot T} \cdot M_C$$

kde:

$m_{(d)C}$ množství vyprodukovaného uhlíku ve formě CO_2 [mg];

p atmosférický tlak v okamžiku provzdušňování [kPa];

s_{vz} poměr odezvy detektoru pro CO_2 a Ar [-];

q absolutní člen získaný z lineární regrese pro kalibraci [-];

V_g plynný objem biometrické láhve [ml];

k směrnice přímky získaná z lineární regrese pro kalibraci [-];

R molární plynová konstanta; $R = 8{,}314\ [J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}]$;

T termodynamická teplota v okamžiku provzdušňování $[K^{-1}]$;

M_C atomární hmotnost uhlíku; $M_C = 12{,}0107\ [g \cdot mol^{-1}]$.

Kumulativní produkce uhlíku ve formě CO_2:

$$m_{(k)C(2)} = m_{(k)C(1)} + m_{(d)C(2)}$$

kde:

$m_{(k)C(2)}$ kumulativní produkce uhlíku z aktuálního měření [mg];

$m_{(k)C(1)}$ kumulativní produkce uhlíku z předchozího měření [mg];

$m_{(d)C(2)}$ denní produkce uhlíku z aktuálního měření [mg].

Substrátová produkce uhlíku:

Denní produkce uhlíku vyjádřená jako kumulativní produkce uhlíku v bioreaktorech snížená o produkci uhlíku ze slepých pokusů:

$$n_{(s)C} = m_{(k)CV_z} + m_{(k)CS_l}$$

kde:

$n_{(s)C}$ substrátová produkce uhlíku ve formě CO_2 [mg];

$m_{(k)CV_z}$ kumulativní produkce uhlíku z láhve se vzorkem [mg];

$m_{(k)CS_l}$ denní produkce uhlíku z láhve bez vzorku [mg].

Procentuální mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO_2:

$$D_C = \frac{n_{(s)C}}{m_C \cdot TC}$$

kde:

D_C procentuální mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO_2 [%];

$n_{(s)C}$ substrátová produkce uhlíku ve formě CO_2 [mg];

m_C hmotnost testovaného materiálu [mg];

TC obsah celkového uhlíku v testovaném materiálu [%].

4.6 Molekulárně biologické a mikroskopické metody

Bylo prováděno několik testů. Izolace DNA a následné stanovení DNA bylo provedeno u všech zkoumaných půd. Pro analýzu tvorby biofilmu pomocí fluorescenční mikroskopie v rámci screeningu byla vybrána pouze půda P1.

4.6.1 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční metody lze použít pro zviditelnění určité látky či struktury uvnitř buňky [11]. Fluorescenci lze definovat jako jev, při kterém molekuly některých látek absorbují světelné záření určité vlnové délky (excitace) a část energie, kterou tímto způsobem získá ve velmi krátkém čase, opět vyzáří [59]. Přímá fluorescence využívá jevu, kdy se některé fluorofory, například propidium jodid, ethidium bromid, DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol), FITC (fluorescein-5-isothiokyanát), váží na určité molekuly (DNA) a po ozáření zviditelňují jejich struktury [60]. Nepřímá fluorescence se vyskytuje pouze v některých buňkách (rostlinné buňky, pletiva) a její intenzita nebývá příliš silná [11].

Fluorescenční mikroskop je optický mikroskop, který využívá fluorescenci k zobrazení organických i anorganických struktur. V průběhu fluorescence dochází k oddělení emitovaného světla (tlumené) od excitačního světla (jasné). Dochází k ozáření atomu, kde za normálních podmínek obíhají elektrony kolem jádra ve vrstvách (orbitalech) s určitou energetickou hladinou. Při UV záření elektrony absorbují energii a jsou excitovány do vyšší energetické hladiny, kde jsou nestabilní a vrací se zpět do základního stavu. Přesun elektronu z vyšší hladiny do základního stavu je poté doprovázen vyzářením fotonu. Jako zdroj záření se často používá rtuťová nebo xenonová výbojka. Největší množství energie vydá v intervalu od 356 nm do 546 nm. Excitační záření projde nejdříve

excitačním filtrem, který dovolí prostupu světla jen o výše zmíněné vlnové délce. Dále dopadá na dichroické zrcadlo, což je filtr odrážející excitační vlnovou délku a propouštějící emisní vlnovou délku [61].

LIVE – DEAD kit je používán pro monitorování životaschopnosti bakteriálních populací na základě integrity membrány buňky. Obsahuje dvoubarevný fluorescenční test životaschopnosti bakterií pro rozmanitou řadu bakteriálních rodů. Buňky s narušenou membránou, které jsou mrtvé nebo umírající, se obarví červeně propidium jodidem, zatímco buňky s neporušenou membránou se barví zeleně pomocí SYTO 9. Pokud se používá samostatně, SYTO 9 obecně označí všechny bakterie v populaci - ty s neporušenými membránami i ty s poškozenými membránami. Naproti tomu propidium jodid proniká pouze bakteriemi s poškozenými membránami, což způsobuje snížení fluorescence barvení SYTO 9, když jsou přítomna obě barviva [62], [63].

Pro zviditelnění struktur bylo namícháno barvící činidlo, které se skládalo z 1,5 µl barvícího roztoku SYTO 9, 1,5 µl barvícího roztoku propidium jodidu a 1 ml destilované vody. Vzorek folie byl vložen do tohoto roztoku na 10 sekund, následně do destilované vody, pro odstranění přebytečného roztoku. Vzorek folie byl položen na krycí sklo a pozorován fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 200x či 400x. Fotografie povrchu byly pořízeny minimálně na 3 místech každého sledovaného vzorku, aby byla zajištěna reprezentativnost a dostatečná úroveň informací pro následnou analýzu a vyhodnocení. Pro účely bakalářské práce byla vybrána vždy 1 fotografie, viz. kap. 5.3 Výsledky.

4.6.2 Izolace DNA

DNA byla izolována ze všech 3 testovaných půd. Pro izolaci všech 3 půd byl použit DNeasy PowerSoil Pro Kit. Kit obsahuje roztoky CD1, CD2, CD3, EA, CD5 a CD6, u kterých není poskytnuto přesné složení. Samotný kit také obsahuje všechny použité mikrozkumavky a kolonky. Izolace probíhala dle návodu výrobce.

Do rozbíjecích mikrozkumavek obsahující mikrokuličky pro rozbití částic izolovaného materiálu bylo přidáno přibližně 0,25 g izolované půdy. Poté se ke směsi přidalo 800 µl roztoku CD1. Tato směs byla rozmíchána na vortexu. Zvortexované mikrozkumavky byly vloženy do homogenizéru, kde byly homogenizovány 3x za sebou po dobu 30 vteřin. Po homogenizaci byly mikrozkumavky centrifugovány na 14 500 otáček po dobu jedné minuty.

Získaný supernatant byl přenesen do nové mikrozkumavky. Bylo přidáno 200 µl roztoku CD2 a zvortexováno. Směs byla dále centrifugována na 14 500 otáček po dobu jedné minuty.

Nově získaný supernatant byl přenesen do nové mikrozkumavky, do které bylo následně pipetováno 600 µl roztoku CD3. Směs byla opět zvortexována.

Do nové mikrozkumavky s kolonkou byl přenesen veškerý roztok vzniklý v předešlém kroku. Na kolonku bylo pipetováno 650 µl roztoku, dále byla centrifugována na 14 500 otáček po dobu jedné minuty. Přefiltrovaná kapalina byla vylita a tento krok byl proveden ještě jednou.

Byla použita nová mikrozkumavka, do které byla vložena stávající kolonka. Na tuto kolonku bylo přidáno 500 µl roztoku EA a zcentrifugováno na 14 500 otáček po dobu jedné minuty. Přefiltrovaná kapalina v mikrozkumavce byla vylita a tato mikrozkumavka byla použita ještě jednou v dalším kroku.

Na kolonku bylo pipetováno 500 µl roztoku C5 a byla provedena centrifugace na 14 500 otáček po dobu jedné minuty. Mikrozkumavka obsahující přefitrovanou kapalinu byla vyměněna za novou.

Byla provedena cetrifugace na 14 500 otáček po dobu jedné minuty. Poté byla kolonka vložena do nové eluční mikrozkumavky.

Doprostřed kolonky bylo pipetováno 50 µl roztoku C6 a ponecháno k inkubaci po dobu 5 minut. Po uplynulé době byla provedena poslední centrifugace na 14 500 otáček po dobu jedné minuty, kolonka byla odstraněna a vzniklá směs v eluční mikrozkumavce obsahovala vyizolovanou DNA.

4.6.3 Stanovení koncentrace DNA fluorometricky

Před samotným měřením bylo provedeno ředění vyizolované DNA a také byl připraven barvící roztok.

DNA byla s PCR vodou naředěna 10x, tudíž 2 µl původní vyizolované DNA a 18 µl PCR vody. Pro měření koncentrace DNA byl použit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (DeNovix), koncentrace byla měřena na fluorimetru.

Příprava barvícího roztoku byla provedena dle pokynů výrobce, který uvádí, že na 1 ml pufru obsaženého v kitu připadá 10 µl barvy. Barvící roztok byl připraven smícháním 5 µl barvy a 500 µl pufru.

Pro samotné měření byl použit roztok obsahující 198 µl barvícího roztoku a 2 µl již naředěné DNA.

5 VÝSLEDKY

5.1 Výsledky stanovení pH, sušiny a vlhkosti testovaných půd

Po odpaření veškeré vody ze vzorků půd byla sušina stanovena následovně:

výsledná hodnota sušiny půdy P1 tvořila 92,22 % objemu původního vzorku půdy,

vlhkost byla stanovena na 7,78 %.

Výsledná hodnota sušiny půdy P2 tvořila 92,20 % objemu původního vzorku půdy, vlhkost byla stanovena na 7,8 %.

Výsledná hodnota sušiny půdy P3 tvořila 95,56 % objemu původního vzorku půdy, vlhkost byla stanovena na 4,4 %.

Změřená hodnota pH půdy P1 byla vypočítána na 6,00.

Změřená hodnota pH půdy P2 byla vypočítána na 6,53.

Změřená hodnota pH půdy P3 byla vypočítána na 6,51.

5.2 Maximální vodní kapacita testovaných půd

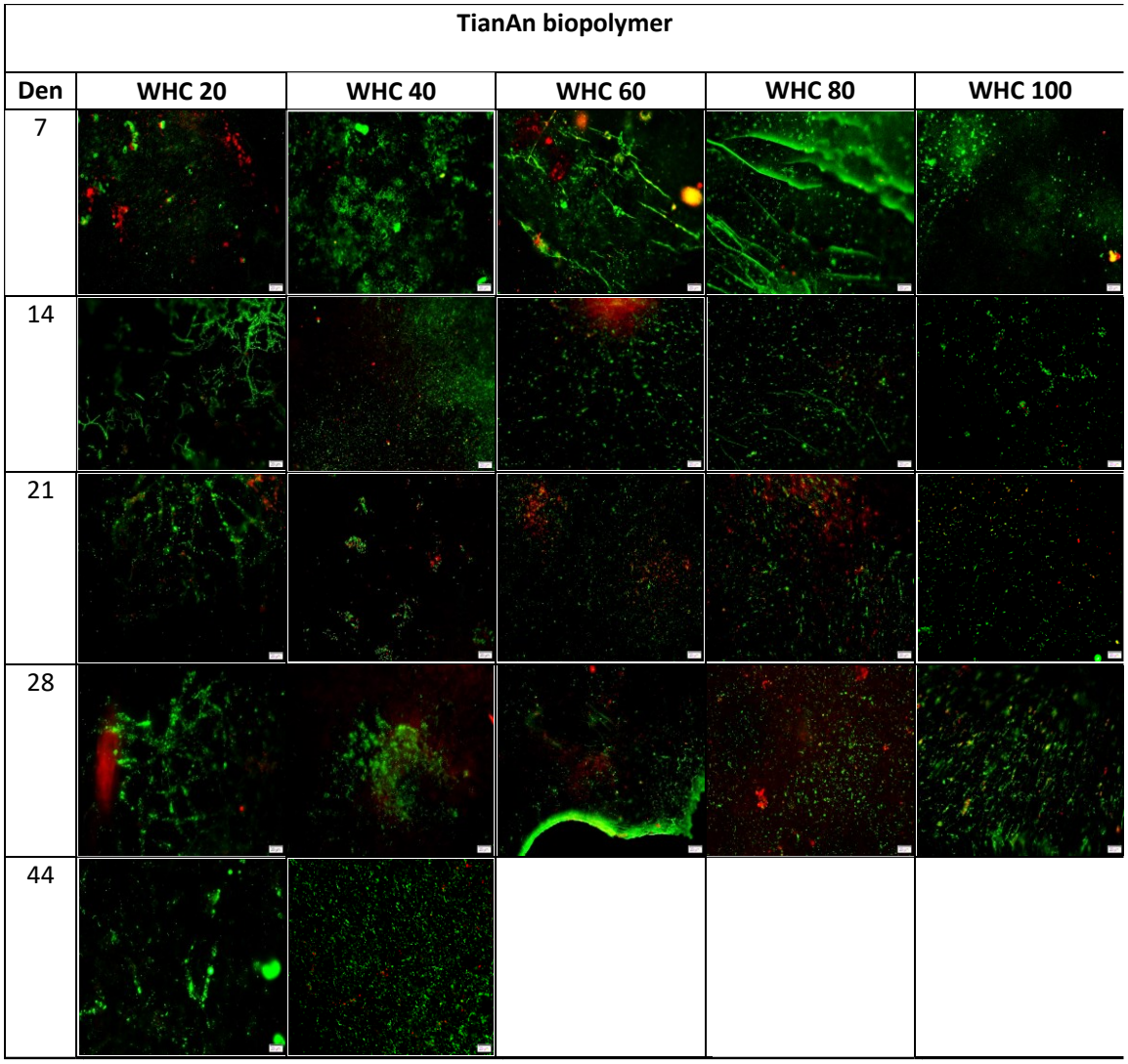
Maximální množství vody, které dokáže půda P1 pojmout, bylo po zaokrouhlení stanoveno na 1,3 ml/g.

Maximální množství vody, které dokáže půda P2 pojmout, bylo po zaokrouhlení stanoveno na 1,5 ml/g.

Maximální množství vody, které dokáže půda P3 pojmout, bylo po zaokrouhlení stanoveno na 1,6 ml/g.

5.3 Vliv WHC půdy na tvorbu mikrobiálního biofilmu na povrchu vzorků a jejich biodegradaci

Pomocí fluorescenční mikroskopie byla v první části praktického provedení studie sledována kolonizace povrchu biodegradabilních biopolymerů vložených v půdě P1, v závislosti na % WHC. Mikroskopie byla provedena celkem pětkrát v rozmezí od 7. do 44. dne po přidání vzorků folií. Nárůst biofilmu byl sledován na všech 3 vzorcích biodegradabilních polymerů: TianAn biopolymer, Ecoflex a bioPBS.



Obrázek 11: Sledování nárůstu biofilm u v čase na foliích polymeru TianAn biopolymer při různých koncentracích WHC, zvětšeno 200x.

V prvních 7 dnech nedošlo k významnému nárůstu biofilmu u vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na 20 % a 40 % WHC, na fotografiích je spíše patrný samotný povrchy biopolymeru a fragmenty půdy. U vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 60 % a 80 % je nárůst mikroorganismů při 7. dni od inkubace již pozorovatelný, je zde patrná absence mrtvých mikroorganismů. Na foliích vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 100 % je rozvoj mikroorganismů také viditelný, ale spíše v menším množství, a ne po celém povrchu.

Po 14 dnech od začátku inkubace se nárůst mikroorganismů projevil více. Výskyt mrtvých mikroorganismů nebyl téměř žádný. Na povrchu vzorků odebraných z půdy zvlhčené na 20 % WHC byly pozorovány vláknité struktury (zřejmě filamenta mikroskopických hub, případně kolonie aktinomycet). U vzorků inkubovaných v půdě zvlhčené na

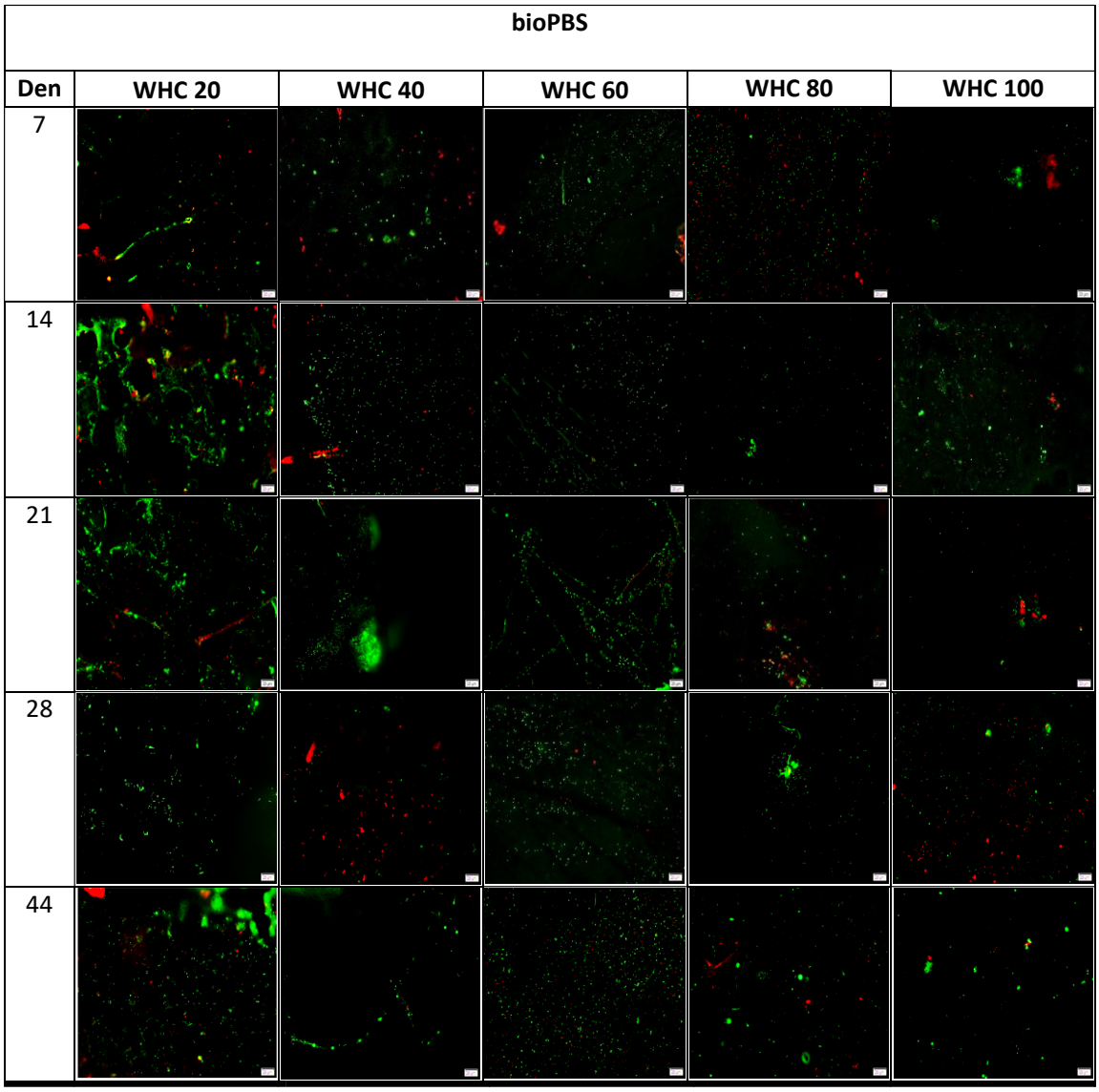
WHC 40 %, WHC 60 % a WHC 80 % lze pozorovat značný nárůst mikroorganismů, u vzorků inkubovaných v půdě zvlhčené na WHC 60 % a WHC 80 % na celém povrchu folie. U vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 100 % se nárůst mikroorganismů projevil také, ale spíše v menším množství.

Po 21 dnech od začátku inkubace byl biofilm výrazně viditelný u vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 60 %, WHC 80 % a WHC 100 %. U vzorků půdy zvlhčené na WHC 60 % a 80 % byly pozorovány také mrtvé mikroorganismy. Na foliích u vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 40 % byl výskyt mikroorganismů patrný hlavně okolo nedokonale očištěných fragmentů půdy. U vzorků z půdy zvlhčené na WHC 20 % byly mikroorganismy patrné hlavně okolo povrchu polymeru a neodstraněných fragmentů půdy.

Po 28 dnech od začátku inkubace se u půdy ovlhčené na WHC 20 % nárůst mikroorganismů nijak výrazně nelišil od dne 21. U vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 40 % byl nárůst mikroorganismů zřejmý hlavně kolem neodstraněných fragmentů půdy. U vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 60 % byl již na první pohled zřejmý rozklad folie, biofilm se vyskytoval po celé délce, byly pozorovány také mrtvé mikroorganismy. U vzorků z půdy zvlhčené na WHC 80 % se biofilm i mrtvé mikroorganismy objevily po celém polymeru. U vzorků folie z půdy zvlhčené na WHC 100 % tvořily největší část fotografie povrch polymeru a fragmenty půdy, oproti dni 21 bylo možno pozorovat úbytek mikroorganismů.

Po 44 dnech od začátku inkubace se u inkubace vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 20 % objevily mikroorganismy hlavně v okolí fragmentů půdy. Folie inkubované v půdě ovlhčené na WHC 40 % byly kolonizovány mikroorganismy v celém povrchu. Bylo zde nalezeno minimum mrtvých mikroorganismů. U vzorků z půdy ovlhčené na WHC 60 %, WHC 80 % a WHC 100 % byly vzorky folie TianAn biopolymer zčásti degradovány, a jelikož se nacházely v půdě, kterou byly obaleny, nebyly již dohledatelné.

Co se týče vlivu koncentrace WHC na samotný nárůst mikroorganismů, je zřejmé, že byl patrný vliv WHC na kolonizaci povrchu polymerů. Biofilm byl formován rychleji (po 7 dnech) na povrchu vzorků inkubovaných v půdě s vyšším obsahem WHC než 20 %.

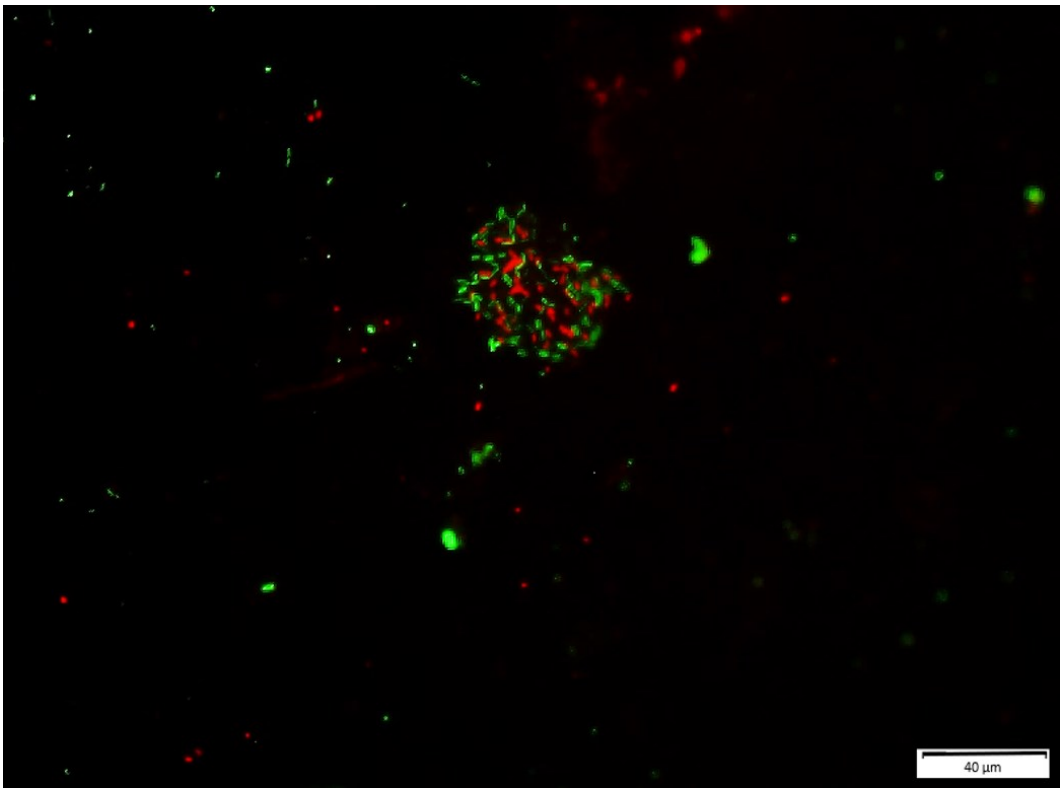


Obrázek 12: Sledování nárůstu biofilmu v čase na foliích polymeru bioPBS při různých koncentracích WHC, zvětšeno 200x.

Slabý nárůst biofilmu bylo možno pozorovat již v prvních dnech od inkubace. Největší nárůst biofilmu byl u vzorků s koncentrací WHC 60 %. Na ostatních vzorcích se biofilm tvořil spíše v menším množství, s výjimkou vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 100 % při dnu 14, kdy byla velikost biofilmu srovnatelná se vzorky polymeru z půdy zvlhčené na WHC 60 %.

V prvních 7 dnech nedošlo k žádnému významnému nárůstu mikroorganismů u vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 20 %, WHC 40 %, WHC 60 %, WHC 80 % ani WHC 100 %, kde byly spíše patrné fragmenty půdy. U vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 80 % byl nárůst mikroorganismů při 7. dni od inkubace nízký, byl zde

viditelný výskyt mrtvých mikroorganismů. U vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 100 % byla pořízena fotografie zachycující tvar bakterií, viz Obrázek 13.



Obrázek 13: Tvar bakterií u 10% WHC po 7 dnech od inkubace, zvětšeno 400x.

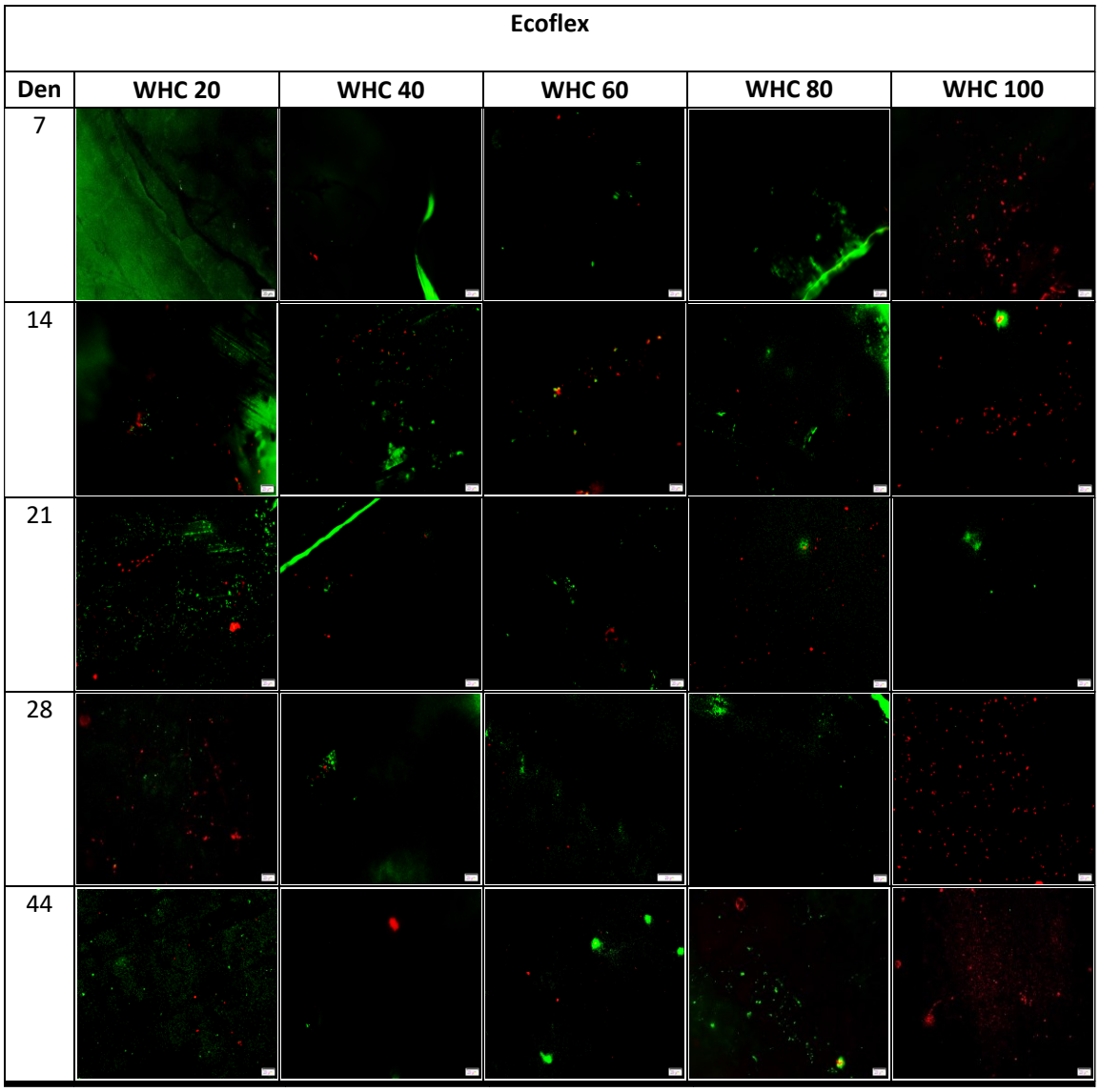
Po 14 dnech od začátku inkubace se nárůst mikroorganismů projevil hlavně u vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 20 % a WHC 100 %, kde byly mikroorganismy patrné hlavně kolem fragmentů půdy a samotného povrchu polymeru. Také výskyt mrtvých mikroorganismů nebyl téměř žádný. Na fotografiích, které zachycují vývin biofilmu na vzorcích byly pozorovány spíše fragmenty půdy než mikroorganismy.

Po 21 dnech od začátku inkubace byl zpozorován nárůst mikroorganismů převážně u vzorků z půdy zvlhčené na WHC 60 %, u ostatních koncentrací WHC v půdě byly patrné fragmenty půdy, pozadí polymeru a nárůst mikroorganismů nebyl žádný nebo byl nevýznamný.

Po 28 dnech od začátku inkubace byl nárůst patrný u vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 60 %, menší nárůst se objevil i u vzorků z půdy zvlhčené na WHC 100 %. U vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 20 %, WHC 40 % i WHC 80 % byl nárůst mikroorganismů minimální, většinu tvořily částice půdy. Na foliích vzorků

inkubovaných v půdě zvlhčené na WHC 100 % byly mrtvé i živé mikroorganismy srovnatelné v poměru cca 1:1.

Po 44 dnech od začátku inkubace byly mikroorganismy dobře viditelné u vzorků z půdy zvlhčené na WHC 60 % a WHC 20 %. U vzorků z půdy zvlhčených na WHC 20 % došlo k nárůstu mikroorganismů převážně okolo půdních částic, a to v menším rozsahu. U vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 60 % byl nárůst mikroorganismů největší za celou dobu od začátku inkubace. Objevilo se zde i menší množství mrtvých mikroorganismů. U vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na WHC 40 %, WHC 80 % a WHC 100 % nedošlo k tvorbě biofilmu, nárůst mikroorganismů byl buď velmi malý nebo žádný, byla zde také absence mrtvých mikroorganismů.



Obrázek 14: Sledování nárůstu biofilmu v čase na foliích polymeru Ecoflex při různých koncentracích WHC, zvětšeno 200x.

U vzorků folií polymeru Ecoflex nebyl zaznamenám výrazný nárůst biofilmu po celou dobu inkubace.

Na většině fotografií je patrné pozadí, dále pak částice půdy, které nebyly dokonale očištěny. Nárůst mikroorganismů byl naprosto zanedbatelný i po 44 dnech od začátku inkubace.

Na povrchu filmů inkubovaných v půdě se 100% koncentrací WHC byly pozorovány mrtvé mikroorganismy již po prvních dnech inkubace. Rozklad Ecoflexu v půdě je ve srovnání s rozkladem TianAn biopolymeru a bioPBS pomalejší, nárůst biofilmu byl proto v prvních týdnech experimentu omezený [29].

Pozorování a vyhodnocení rychlosti tvorby biofilmu bylo provedeno v rámci screeningu před samotným časově a materiálově náročným biodegradačním experimentem. Pomocí fluorescenční mikroskopie byly pozorovány rozdíly v rychlosti a intenzitě kolonizace povrchu biodegradabilních polymerů v závislosti na WHC půdy.

5.4 Porovnání koncentrací DNA izolované z půdy před inkubací

Z půd před samotnou inkubací byla izolována DNA. Tato DNA bude sloužit pro další molekulárně-biologické analýzy v rámci širší studie vlivu WHC na mikroorganismy vyskytující se v plastisféře studovaných vzorků biodegradabilních polymerů.

Koncentrace izolované DNA vzorku půdy P1 byla pomocí fluorimetru vyhodnocena na 64,5 ng/µl.

Koncentrace izolované DNA vzorku půdy P2 byla pomocí fluorimetru vyhodnocena na 47,6ng/µl.

Koncentrace izolované DNA vzorku půdy P3 byla pomocí fluorimetru vyhodnocena na 96,2 ng/µl.

Množství DNA v půdách (potažmo mikroorganismů) je proměnlivé a závislé na podmínkách prostředí. Koncentrace DNA byly ve všech třech půdách velmi podobné. Nejvyšší koncentrace DNA byla změřena v půdě P3. V publikaci, která se věnovala analýze různých vzorků půd, se koncentrace DNA pohybovaly v rozmezí od 3 do 196 ng/µl [64]. Množství DNA izolované z půd v rámci bakalářské práce bylo v tomto rozmezí.

5.5 Míra biodegradace biodegradabilních polymerů v půdě

Během aerobní biodegradace mikroorganismy využívají polymer jako zdroj uhlíku pro svůj růst a jejich metabolické procesy produkují CO_2 [46].

Účelem biodegradačních testů bylo měření biodegradace, studium a ověření biologické rozložitelnosti plastového materiálu. Neoptimální podmínky (nedostatek živin, nedostatečná vlhkost, nízká teplota, snížený obsah kyslíku) mohou omezit správný vývoj mikroorganismů, a tím by zpomalily biodegradaci [65]. Aby byla půda připravená pro samotný biodegradační test, byla provedena předinkubace půdy.

Produkce uhlíku v půdách před inkubací polymerů byly stanoveny na základě měření CO_2. Průměrná kumulativní produkce uhlíku po 7 dnech byla stanovena pomocí průměru denní produkce uhlíku. Průměrná kumulativní produkce uhlíku po 14 dnech byla stanovena jako součet denní produkce uhlíku a kumulativní produkce uhlíku po 7 dnech, z těchto hodnot byl poté vypočítán průměr.

Tabulka 1: Výsledky předinkubace pro půdu P2.

WHC [%]	Inkubace [dny]	Prům. kumulativní produkce C [mg]	Odchylka
WHC 10	7	1,51	0,42
	14	2,39	0,71
WHC 40	7	2,77	0,88
	14	5,18	1,88
WHC 60	7	2,20	0,93
	14	4,41	1,48

Z Tabulky 1 vyplývá, že nejvyšších hodnot průměrné kumulativní produkce uhlíku v jílovité půdě P3 bylo dosaženo u vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na 40 % WHC, poté u vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na 60 % WHC. Poměr půdy a obsahu vody byl pro mikroorganismy optimální, kdy měly vhodné podmínky pro růst i množení, čemuž odpovídá i narůstající průměrná produkce uhlíku.

Nejnižší produkce uhlíku byla zaznamenána u vzorků inkubovaných v půdě ovlhčené na 10 % WHC. Poměr vody a půdy byl v tomto případě nedostatečný, a i přes to, že ostatní

podmínky byly zvoleny vhodně, nedostatek vody zapříčinil všeobecně horší podmínky pro růst i množení mikroorganismů.

Tabulka 2: Výsledky předinkubace pro půdu P3.

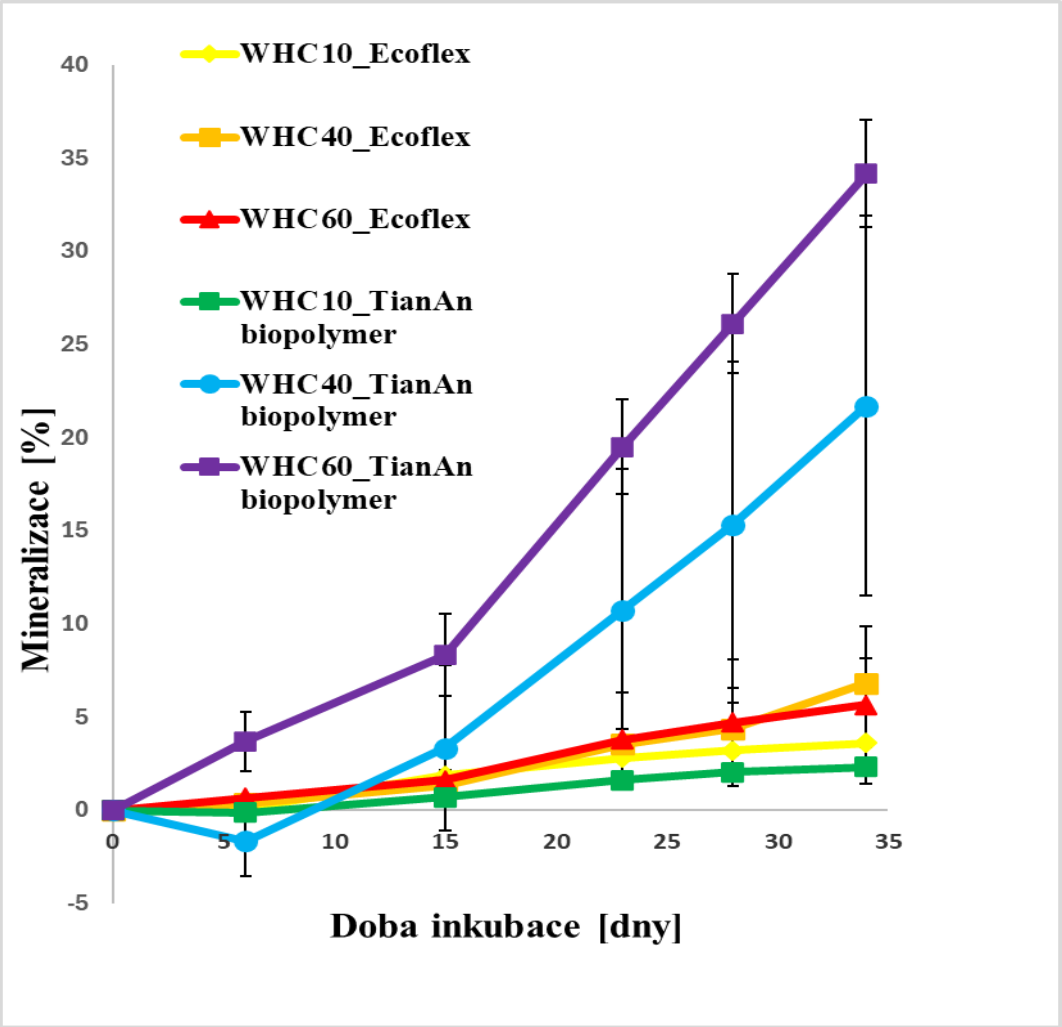
WHC [%]	Inkubace [dny]	Prům. kumulativní produkce C [mg]	Odchylka
WHC 10	7	3,89	0,99
	14	5,80	1,80
WHC 40	7	7,31	1,27
	14	12,60	3,43
WHC 60	7	6,45	1,80
	14	10,90	2,91

Z Tabulky 2 vyplývá, že nejvyšší průměrné kumulativní produkce uhlíku v písčité půdě P3 bylo dosaženo při 40% WHC.

V písčité půdě byla produkce uhlíku vyšší než v jílovité. Tento výsledek koreluje také s hodnotami koncentrací DNA v obou půdách, kdy z půdy P3 bylo izolováno více DNA než z půdy P2. Lze tedy předpokládat, že půda P3 byla bohatší na množství mikroorganismů.

Dle normy ISO 17556:2019, která specifikuje metodu pro stanovení konečné aerobní biologické rozložitelnosti plastových materiálů v půdě měřením spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru nebo množství uvolněného oxidu uhličitého, je doporučený obsah vody v půdě mezi 40 % a 60 % [66]. Při tomto obsahu vody by měly mít mikroorganismy nejlepší podmínky pro růst i množení, což se projevilo i ve výsledcích bakalářské práce.

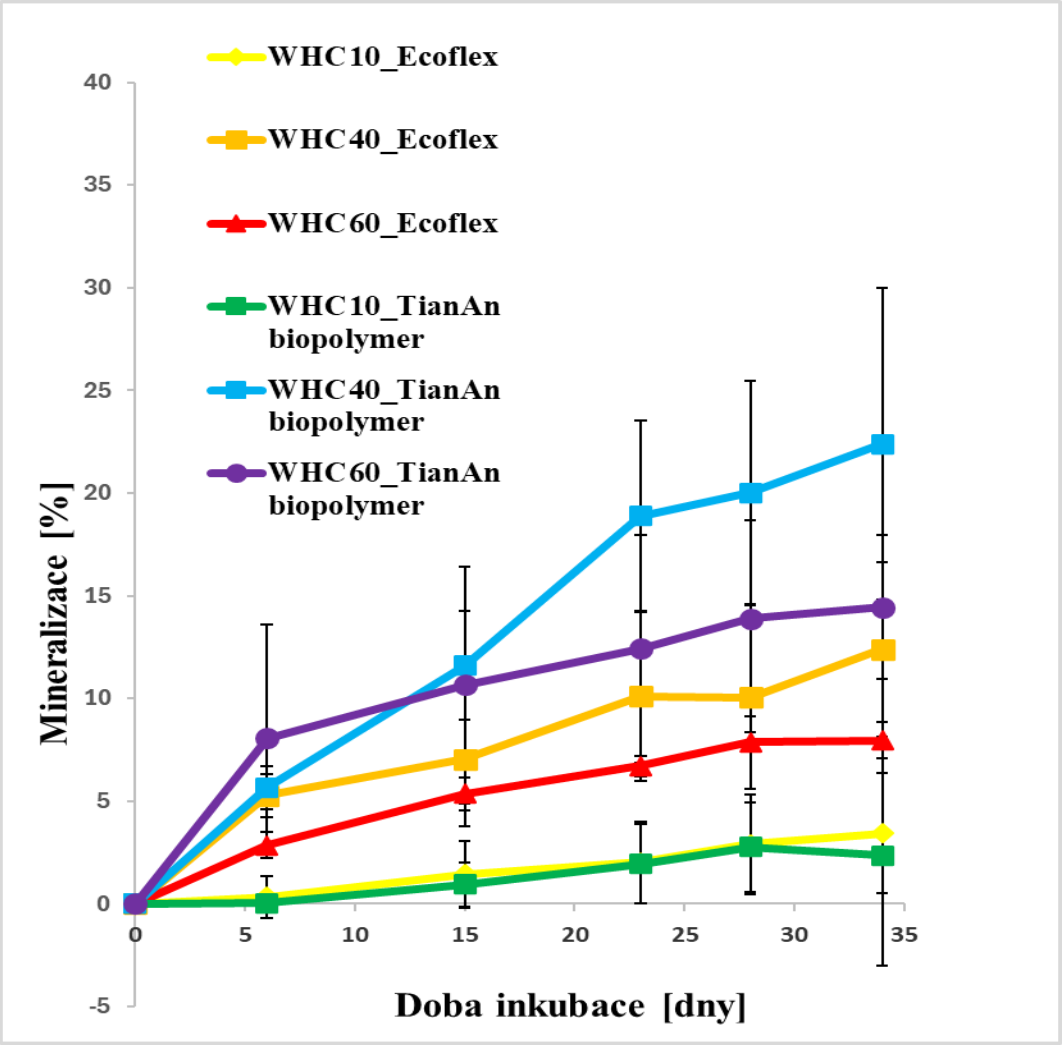
Po předinkubaci byly přidány vzorky polymerů Ecoflex a TianAn biopolymer (30 mg do každé lahve) o průměru 0,5 x 0,5 cm. Vzorkovnice s polymery byly ponechány k inkubaci po dobu 7 dnů a po 7 dnech byla změřena rychlost biodegradace. Rychlost biodegradace byla následně měřena po dobu 5 týdnů.



Obrázek 15: Průběh biodegradace polymerů TianAn biopolymer a Ecoflex v půdě P2 (jílovitá půda). Půda obsahovala 10, 40 a 60 % WHC.

Nejvyššího stupně biodegradace v půdě P2 dosáhl biopolymer TianAn při 60% WHC, jehož degradace byla již v prvních dnech nejrychlejší. Při posledním měření, tj. 34 den od počátku měření, byla biodegradace vyhodnocena na 34,2 %. Biodegradace polymeru TianAn biopolymer, který byl inkubovaný v půdě ovlhčené na 40 % WHC, dosáhla 21,7 %. V inkubaci ovlhčené na 10 % WHC byl tento polymer mineralizován z 3,6 %. Mineralizace tohoto polymeru začala v inkubacích ovlhčených na 40 % WHC po 5 dnech inkubace, v půdě zvlhčené na 60 % WHC začala mineralizace již v prvním týdnu experimentu. Mineralizace v půdě ovlhčené na 10 % WHC byla pozvolná a dosáhla nižších hodnot (pod 3 %).

Mineralizace polymeru Ecoflex byla výrazně pomalejší ve všech testovaných % WHC. Mineralizace v půdě ovlhčené na 40 % WHC dosáhla 6,8 %, v půdě ovlhčené na 60 % dosáhla 5,7 % a v půdě ovlhčené na 10 % WHC dosáhla 3,6 %. [29].



Obrázek 16: Průběh biodegradace polymerů TianAn biopolymer a Ecoflex v půdě P3 (písčitá půda). Půda obsahovala 10, 40 a 60 % WHC.

Největšího stupně mineralizace dosáhl v půdě P3 biopolymer TianAn při 40% WHC, jehož míra biodegradace se již od 2. měření značně lišila od ostatních zkoumaných polymerů. Při posledním měření, tj. 34 den od počátku měření, byl stupeň mineralizace vyhodnocen na 22,4 %. TianAn biopolymer inkubovaný v půdě ovlhčené na 60 % WHC dosáhl druhé nejvyšší mineralizace, která byla vyhodnocena na 14,44 %. Mineralizace tohoto polymeru v půdě ovlhčené na 10 % WHC byla 3,4 %. Mineralizace vzorků Ecoflexu byla nejvyšší v půdě ovlhčené na 40 % (12,4 %), v půdě ovlhčené na 60 % WHC dosáhla mineralizace tohoto polymeru na konci experimentu 8,0 % a půdě ovlhčené na 10 % WHC byla mineralizace 3,4 %.

Mineralizace vzorků polymeru Ecoflex byla v různých inkubacích s testovaným procentem WHC velmi podobná. Biodegradace polymeru Ecoflex je obecně pomalejší než

biodegradace polymeru TianAn, na což ukazují i výsledky bakalářské práce [29]. Je pravděpodobné, že rychlost mineralizace tohoto polymeru se v pozdější fázi inkubace zvýší a bude patrný rozdíl mezi inkubacemi ovlhčenými na rozdílné % WHC. Zvyšující se rychlost mineralizace Ecoflexu byla v některých studiích zaznamenána až v pozdějších fázích inkubace (např. po 2 měsících) [29].

Výsledky mineralizace Ecoflexu se shodují také s výsledky fluorescenční mikroskopie, kdy ani po 44 dnech inkubace nebyl pozorován rozvoj růstu mikroorganismů na povrchu vzorků. Naopak na vzorcích biopolymeru TianAn byl pomocí fluorescenční mikroskopie pozorován rozvoj biofilmu již v prvních dnech experimentu.

Mineralizace vzorků v půdě P3 se projevila, narozdíl od vzorků v půdě P2, již v prvním týdnu měření. Při dalších měření byla mineralizace pomalejší, bez výraznějších skoků. Rozdíly mezi WHC 40 % a 60 % nebyly v prvních týdnech měření velké. V půdě P2 byla míra mineralizace biopolymeru TianAn spíše vyšší než v půdě P3. U pomaleji se degradujícícho Ecoflexu byl mezi dvěma testovanými druhy půd patrný rozdíl v mineralizaci především v inkubacích obsahujících 40 % WHC, kdy byl stupeň mineralizace vyšší v inkubaci s půdou P3. Mezi půdou jílovitou a písčitou nebyl tedy pozorován jasný rozdíl ve stupni mineralizace.

Poměrně vysoké směrodatné odchylky jsou pravděpodobně dané tím, že na začátku experimentu je mikrobiální aktivita poměrně velká a může se v jednotlivých inkubačních lahvích lišit.

Studie na téma biodegradace polymerů v půdě se zaměřením na obsah vody vyvodila závěry, že se mineralizace polymerů za použití nižšího obsahu vody zastaví na nižších hodnotách, kde přetrvává do doby, dokud se množství vody nezvýší. Snížená produkce CO_2 v půdě s takto sníženým obsahem vody může být způsobena tvorbou spor, které mají velmi nízkou metabolickou aktivitu, což znamená, že část uhlíku z původních substrátů zůstává zachycena v těchto sporách a není znovu emitována jako CO_2. Dále také dochází ke zpomalení působení mikrobiálních enzymů. Naopak rychlost mineralizace rostla s vyššími koncentracemi vody, jelikož zvyšující se obsah vody přímo ovlivňoval rychlost biologického rozkladu polymerů. Nejvyššího stupně dosáhla při vzorcích zvlhčených na WHC 55 % a WHC 80 %, kdy byl polymer zmineralizován na více, než 90 % [65].

ZÁVĚR

Mikroplasty jsou kontaminanty prostředí o velikosti 1-5 mm pocházející z konvenčních i biodegradabilních polymerů. Biodegradabilní polymery jsou velkým trendem posledních let, ale i tyto polymery se za neoptimálních podmínek rozkládají na mikroplasty, které mohou ve volné přírodě přetrvávat po dlouhý čas.

Cílem práce bylo posouzení vlivu WHC půdy na tvorbu mikrobiálního biofilmu na povrchu 3 různých biodegradabilních polymerů v zemědělské půdě a zjištění rychlosti biodegradace 2 vybraných polymerních materiálů ve 2 různých zemědělských půdách.

Fluorescenční mikroskopie odhalila, že v případě biopolymeru TianAn různé koncentrace WHC tvorbu mikrobiálního biofilmu výrazně neovlivnily. V případě bioPBS došlo k tvorbě konstantního biofilmu pouze u 60% WHC. Při ostatních koncentracích k tvorbě biofilmu nedošlo. V případě Ecoflexu nedošlo k výraznému rozvoji biofilmu po celou dobu inkubace, Bylo zjištěno, že vysoká koncentrace vody měla spíše inhibiční účinek na mikroorganismy.

Měření míry biodegradace ve dvou různých zemědělských půdách pomocí hmotnostního spektrometru ukázalo, že se stupeň mineralizace zvětšoval s navyšující se procentuální koncentrací vody, kdy všechny vzorky z půdy zvlhčené na WHC 10 dosahovaly stupně mineralizace pod 5 %, vzorky s vyšší koncentrací WHC (vyjma vzorků Ecoflex ovlhčených na WHC 60 %) dosahovaly vyšších hodnot mineralizace. V půdě P3, půdě písčité, bylo dosaženo nejvyšší biodegradace u obou testovaných polymerů v půdě zvlhčené na 40 % WHC. V půdě P2, půdě jílovité, bylo vyšších hodnot mineralizace dosaženo pouze u 1 polymeru, TianAn biopolymeru, u vzorků v půdě ovlhčené na 40 % a 60 % WHC. Mineralizace ostatních vzorků se po 5 týdnech měření nijak výrazně neprojevila.

V rámci práce bylo pozorováno, že množství vody v zemědělské půdě má vliv jednak na produkci CO_2 (potažmo tedy na mikrobiální aktivitu), jednak na degradační potenciál mikroorganismů. Vliv množství vody v půdě na schopnost půdních mikroorganismů kolonizovat povrch mikroplastů nebyl jednoznačně prokázán. V této fázi inkubací nebyl pozorován významný vliv půdního druhu na stupeň biodegradace testovaných polymerů. Množství DNA izolované ze 3 půd bylo podobné, což značí, že v půdách byly přítomny mikroorganismy v požadovaném množství.

Množství vody dostupné pro rostliny je klíčovým faktorem v zemědělství, jelikož ovlivňuje růst, výnos a celkové prospívání zemědělských plodin. Vzhledem k tomu, že se v půdě stále více vyskytují mikroplasty, je důležité se zabývat také tím, jak různé množství vody v půdním prostředí ovlivňuje jejich biodegradaci. Tento výzkum může přinést informace pro optimalizaci zavlažovacích praktik a management půdy s ohledem na chování mikroplastů, které vznikají z konvenčních i biodegradabilních polymerů, což je důležité pro zavádění udržitelnějších zemědělských postupů a minimalizaci negativních dopadů mikroplastů na životní prostředí.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] YU, Ren-Shou a Sher SINGH. Microplastic Pollution: Threats and Impacts on Global Marine Ecosystems. *Sustainability* [online]. 2023, **15**(17) [cit. 2024-02-23]. ISSN 2071-1050. Dostupné z: doi:10.3390/su151713252

[2] MÖHRKE, Anne Christel Franka, Arne HAEGERBAEUMER, Walter TRAUNSPURGER a Sebastian HÖSS. Underestimated and ignored? The impacts of microplastic on soil invertebrates—Current scientific knowledge and research needs. *Frontiers in Environmental Science* [online]. 2022, **10** [cit. 2023-10-17]. ISSN 2296-665X. Dostupné z: doi:10.3389/fenvs.2022.975904

[3] SHARMA, Umesh, Sunny SHARMA, Vishal Singh RANA, et al. Assessment of Microplastics Pollution on Soil Health and Eco-toxicological Risk in Horticulture. *Soil Systems* [online]. 2023, **7**(1) [cit. 2023-10-17]. ISSN 2571-8789. Dostupné z: doi:10.3390/soilsystems7010007

[4] ABBASI, Sajjad a Andrew TURNER. Human exposure to microplastics: A study in Iran. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2021, **403** [cit. 2023-10-17]. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123799

[5] REPLASTUJ. Vše, co jste chtěli vědět o mikroplastech, ale báli jste se zeptat…. *Replastuj* [online]. 2024 [cit. 2024-05-03]. Dostupné z: https://www.replastuj.cz/blog/vse-co-jste-chteli-vedet-o-mikroplastech-ale-bali-jste-se-zeptat

[6] SHEN, Maocai, Biao SONG, Guangming ZENG, Yaxin ZHANG, Wei HUANG, Xiaofeng WEN a Wangwang TANG. Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution? *Environmental Pollution* [online]. 2020, **263** [cit. 2024-04-20]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2020.114469

[7] TAO, Shiyu, Tianhao LI, Mingyu LI, Shengxin YANG, Maocai SHEN a Hui LIU. Research advances on the toxicity of biodegradable plastics derived micro/nanoplastics in the environment: A review. *Science of The Total Environment* [online]. 2024, **916**(170299) [cit. 2024-05-02]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2024.170299

[8] PISCHEDDA, Alessandro, Maurizio TOSIN a Francesco DEGLI-INNOCENTI. Biodegradation of plastics in soil: The effect of temperature. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2019, **170**, 109017 [cit. 2024-05-02]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2019.109017

[9] MUKHERJEE, Swapna. *Current Topics in Soil Science* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2022 [cit. 2024-05-08]. ISBN 978-3-030-92668-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-92669-4

[10] STEPHANIE WRIGHT, Joseph Levermore. Application of Infrared and Near-Infrared Microspectroscopy to Microplastic Human Exposure Measurements. *Applied Spectroscopy* [online]. 2023, **77**(10) [cit. 2024-02-25]. ISSN 1105-1128. Dostupné z: doi:10.1177/00037028231199772

[11] AN, Lihui, Qing LIU, Yixiang DENG, Wennan WU, Yiyao GAO a Wei LING. Sources of Microplastic in the Environment. In: HE, Defu a Yongming LUO, ed. *Microplastics in Terrestrial Environments* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, s. 143-159 [cit. 2023-10-30]. The Handbook of Environmental Chemistry. ISBN 978-3-030-56270-0. Dostupné z: doi:10.1007/698_2020_449

[12] LAMICHHANE, G., A. ACHARYA, R. MARAHATHA, R. PAUDEL, A. ADHIKARI, B. K. RAUT, S. ARYAL a N. PARAJULI. Microplastics in environment: global concern, challenges, and controlling measures. *International Journal of Environmental Science and Technology* [online]. 2022, **20**, 4673–4694 [cit. 2024-02-23]. Dostupné z: doi:10.1007/s13762-022-04261-1

[13] ABBASI, Sajjad a Andrew TURNER. Human exposure to microplastics: A study in Iran. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2021, **403** [cit. 2023-10-23]. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123799

[14] YAN, Zehua, Yafei LIU, Ting ZHANG, Faming ZHANG, Hongqiang REN a Yan ZHANG. Analysis of Microplastics in Human Feces Reveals a Correlation between Fecal Microplastics and Inflammatory Bowel Disease Status. *International Journal of Environmental Science and Technology* [online]. 2022, **56**, 414–421 [cit. 2024-02-23]. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.1c03924

[15] KIM, Ji-Su, Hee-Jee LEE, Seung-Kyu KIM a Hyun-Jung KIM. Global Pattern of Microplastics (MPs) in Commercial Food-Grade Salts: Sea Salt as an Indicator of Seawater MP Pollution. *Environmental Science & Technology* [online]. 2018, **52**(21), 12819-12828 [cit. 2024-02-23]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.8b04180

[16] KOELMANS, Albert A., Nur Hazimah MOHAMED NOR, Enya HERMSEN, Merel KOOI, Svenja M. MINTENIG a Jennifer DE FRANCE. Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water Research* [online]. 2019, **155**, 410-422 [cit. 2024-02-23]. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2019.02.054

[17] P. BAKER, K. Russ, P.C.H. Hollman H. BOUWMEESTER, W. O'Connor M. CARBERY, et al. Microplastics in infant milk powder. *Environmental Pollution* [online]. 2023, **323**(121225) [cit. 2024-02-25]. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2023.121225

[18] KIM, Hyeongi, Javeria ZAHEER, Eui-Ju CHOI a Jin Su KIM. Enhanced ASGR2 by microplastic exposure leads to resistance to therapy in gastric cancer. *Theranostics* [online]. 2022, **12**(7), 3217-3236 [cit. 2024-05-08]. ISSN 1838-7640. Dostupné z: doi:10.7150/thno.73226

[19] MÖHRKE, Anne Christel Franka, Arne HAEGERBAEUMER, Walter TRAUNSPURGER a Sebastian HÖSS. Underestimated and ignored? The impacts of microplastic on soil invertebrates—Current scientific knowledge and research needs. *Frontiers in Environmental Science* [online]. 2022, **10** [cit. 2023-10-17]. ISSN 2296-665X. Dostupné z: doi:10.3389/fenvs.2022.975904

[20] SHARMA, Swati, Aprajita BHARDWAJ, Monika THAKUR a Anita SAINI. Understanding microplastic pollution of marine ecosystem: a review. *Marine Pollution and Ecological Degradation* [online]. 2023 [cit. 2024-02-26]. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-023-28314-1

[21] EUROPEAN COMMISSION. Protecting environment and health: Commission adopts measures to restrict intentionally added microplastics. *European Commission - European Commission* [online]. 2023 [cit. 2024-05-02]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/ip_23_4581

[22] O'BRIEN, Stacey, Cassandra RAUERT, Francisca RIBEIRO, et al. There's something in the air: A review of sources, prevalence and behaviour of microplastics in the atmosphere. *Science of The Total Environment* [online]. 2023, **874** [cit. 2023-10-23]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2023.162193

[23] MATHEW, John Tsado et al. General Introduction of Microplastic: Uses, Types, and Generation. In: *General Introduction of Microplastic: Uses, Types, and Generation*. Springer, Singapore, 2024, s. 3-21. ISBN 978-981-99-8357-5. Dostupné také z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-99-8357-5_1

[24] FERRERO, Luca, Lorenzo SCIBETTA, Piotr MARKUSZEWSKI, et al. Airborne and marine microplastics from an oceanographic survey at the Baltic Sea: An emerging role of air-sea interaction? *Science of The Total Environment* [online]. 2022, **824**(153709) [cit. 2024-05-03]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.153709

[25] CHEN, En-Yu, Kuan-Ting LIN, Chien-Cheng JUNG, Chia-Ling CHANG a Chung-Yu CHEN. Characteristics and influencing factors of airborne microplastics in nail salons. *Science of The Total Environment* [online]. 2022, **806**(151472) [cit. 2024-05-03]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.151472

[26] YU, Ren-Shou a Sher SINGH. Microplastic Pollution: Threats and Impacts on Global Marine Ecosystems. *Sustainability* [online]. 2023, **15**(17) [cit. 2023-10-17]. ISSN 2071-1050. Dostupné z: doi:10.3390/su151713252

[27] DE FALCO, Francesca, Emilia DI PACE, Mariacristina COCCA a Maurizio AVELLA. The contribution of washing processes of synthetic clothes to microplastic pollution. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(6633) [cit. 2024-02-26]. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-43023-x

[28] SYVERSEN, Tore, Grethe LILLENG, Jørgen VOLLSTAD, Bård Johan HANSSEN a Signe A. SØNVISEN. Oceanic plastic pollution caused by Danish seine fishing in Norway. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 2022, **179**(113711) [cit. 2024-05-08]. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2022.113711

[29] ŠERÁ, Jana, Florence HUYNH, Faith LY, et al. Biodegradable Polyesters and Low Molecular Weight Polyethylene in Soil: Interrelations of Material Properties, Soil Organic Matter Substances, and Microbial Community. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(15976) [cit. 2024-02-29]. Dostupné z: doi:10.3390/ ijms232415976

[30] COLWELL, John, , Paul LANT, Bronwyn LAYCOCK a Steven PRATT. Hazardous state lifetimes of biodegradable plastics in natural environments. *Science of The Total Environment* [online]. 2023, **894**(165025) [cit. 2024-04-19]. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2023.165025

[31] SAPEA, SCIENCE ADVICE FOR POLICY BY EUROPEAN ACADEMIES. *Biodegradability of plastics in the open environment*. Berlín, 2020, 228 s. ISBN 978-3-9820301-8-0. DOI 10.26356/biodegradabilityplastics.

[32] TŘÍDĚNÍ ODPADU. Bioplasty. *Trideniodpadu* [online]. 2019 [cit. 2024-05-01]. Dostupné z: https://www.trideniodpadu.cz/bioplasty

[33] EUROPEAN BIOPLASTICS. Aktualizace vývoje trhu s bioplasty 2023 . *European Bioplastics e.V* [online]. 2023 [cit. 2024-04-19]. Dostupné z: https://www.european-bioplastics.org/market/

[34] *European Bioplastics e.V* [online]. 2023. Dostupné také z: https://www.european-bioplastics.org/market/

[35] EVROPSKÁ KOMISE. *SDĚLENÍ KOMISE EVROPSKÉMU PARLAMENTU, RADĚ, EVROPSKÉMU HOSPODÁŘSKÉMU A SOCIÁLNÍMU VÝBORU A VÝBORU REGIONŮ: Evropská strategie pro plasty v oběhovém hospodářství*. In: . 2018. Dostupné také z: https://eur-lex.europa.eu/legal-

content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:52018DC0028#footnoteref50

[36] HAIDER, Tobias P., Carolin VÖLKER, Johanna KRAMM, Katharina LANDFESTER a Frederik R. WURM. Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2019, **58**(1), 50-62 [cit. 2024-04-19]. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201805766

[37] FENG, Shanshan, Haodong WANG, Yan WANG a Quanguo CHENG. A review of the occurrence and degradation of biodegradable microplastics in soil environments. *Science of The Total Environment* [online]. 2023, **904**(166855) [cit. 2024-04-19]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2023.166855

[38] LAYCOCK, Bronwyn, Melissa NIKOLIĆ, John M. COLWELL, Emilie GAUTHIER, Peter HALLEY, Steven BOTTLE a Graeme GEORGE. Lifetime prediction of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science* [online]. 2017, **71**, 144-189 [cit. 2024-04-20]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2017.02.004

[39] SHRUTI, V.C. a Gurusamy KUTRALAM-MUNIASAMY. Bioplastics: Missing link in the era of Microplastics. *Science of The Total Environment* [online]. 2019, **697**(134139) [cit. 2024-04-20]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134139

[40] WEI, Xin-Feng, Martin BOHLÉN, Catrin LINDBLAD, Mikael HEDENQVIST a Aron HAKONEN. Microplastics generated from a biodegradable plastic in freshwater and seawater. *Water Research* [online]. 2021, **198** [cit. 2024-05-01]. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2021.117123

[41] NAPPER, Imogen E. a Richard C. THOMPSON. Environmental Deterioration of Biodegradable, Oxo-biodegradable, Compostable, and Conventional Plastic Carrier Bags in the Sea, Soil, and Open-Air Over a 3-Year Period. *Environmental Science & Technology* [online]. 2019, **53**(9), 4775-4783 [cit. 2024-05-02]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.8b06984

[42] QI, Yueling, Nicolas BERIOT, Gerrit GORT, Esperanza HUERTA LWANGA, Harm GOOREN, Xiaomei YANG a Violette GEISSEN. Impact of plastic mulch film debris on soil physicochemical and hydrological properties. *Environmental Pollution* [online]. 2020, **266**(3) [cit. 2024-02-29]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2020.115097

[43] OMIDOYIN, Kehinde Caleb a Eun Hea JHO. Effect of microplastics on soil microbial community and microbial degradation of microplastics in soil: A review. *Environmental Engineering Research* [online]. 2023, **28**(6) [cit. 2024-02-26]. Dostupné z: doi:10.4491/eer.2022.716

[44] RILLIG, Matthias C., Rosolino INGRAFFIA a Anderson A. DE SOUZA MACHADO. Microplastic Incorporation into Soil in Agroecosystems. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2017, **8** [cit. 2024-05-02]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2017.01805

[45] FARMÍTO LISTY. FARMÍTO. Voda jako živina půdy. In: FARMÍTO. *Farmíto.cz* [online]. [cit. 2024-05-08]. Dostupné z: https://www.farmito.cz/slovnik-pojmu/3

[46] CASTRO-AGUIRRE, E., R. AURAS, S. SELKE, M. RUBINO a T. MARSH. Insights on the aerobic biodegradation of polymers by analysis of evolved carbon dioxide in simulated composting conditions. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2017, **137**, 251-271 [cit. 2024-05-16]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2017.01.017

[47] PINNELL, Lee J. a Jeffrey W. TURNER. Shotgun Metagenomics Reveals the Benthic Microbial Community Response to Plastic and Bioplastic in a Coastal Marine Environment. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2019, **10**(1252) [cit. 2024-05-02]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.01252

[48] HUANG, Fuxin, Qiyu ZHANG, Lei WANG, Congyu ZHANG a Ying ZHANG. Are biodegradable mulch films a sustainable solution to microplastic mulch film pollution? A biogeochemical perspective. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2023, **459** [cit. 2024-05-02]. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2023.132024

[49] 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) [cit. 2024-05-02]. ISSN 0166445X. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquatox.2022.106097

[50] YU, Yao, Yanhua CHEN, Yan WANG, Sha XUE, Mengjuan LIU, Darrell W.S. TANG, Xiaomei YANG a Violette GEISSEN. Response of soybean and maize roots and soil enzyme activities to biodegradable microplastics contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2023, **262**(115129) [cit. 2024-05-02]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2023.115129

[51] MENG, Fanrong, Xiaomei YANG, Michel RIKSEN, Minggang XU a Violette GEISSEN. Response of common bean (Phaseolus vulgaris L.) growth to soil contaminated with microplastics. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, **755**(142516) [cit. 2024-05-02]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142516

[52] CHU, Juncong, Jie ZHOU, Yue WANG, et al. Field application of biodegradable microplastics has no significant effect on plant and soil health in the short term. *Environmental Pollution* [online]. 2023, **316**(120556) [cit. 2024-05-02]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2022.120556

[53] ADHIKARI, Kaushik, Anton F. ASTNER, Jennifer M. DEBRUYN, Yingxue YU, Douglas G. HAYES, Brian T. O'CALLAHAN a Markus FLURY. Earthworms Exposed to Polyethylene and Biodegradable Microplastics in Soil: Microplastic Characterization and Microbial Community Analysis. *ACS Agricultural Science & Technology* [online]. 2023, **3**(4), 340-349 [cit. 2024-05-02]. ISSN 2692-1952. Dostupné z: doi:10.1021/acsagscitech.2c00333

[54] TECHNICKÉ NORMY. ISO 18400-103:2017-Soil quality-Sampling: 2017. *European Standards: //www.technickenormy.cz* [online]. 2017 [cit. 2024-05-08]. Dostupné z: https://www.technickenormy.cz/en/iso-18400-103-soil-quality-sampling-part-103-safety/

[55] ČESKÝ NORMALIZAČNÍ INSTITUT. *Kvalita půdy – Stanovení hmotnostního podílu sušiny a hmotnostní vlhkosti půdy – Gravimetrická metoda*. 1998.

[56] ČESKÁ METEOROLOGICKÁ SPOLEČNOST. Vlhkost půdy. *Elektronický meteorologický slovník* [online]. 2017, 2017 [cit. 2024-03-07]. Dostupné z: http://slovnik.cmes.cz/heslo/4339

[57] ČESKÝ NORMALIZAČNÍ INSTITUT. *ČSN EN ISO 10390 (836221) - Půdy, upravený bioodpad a kaly – stanovení pH*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2022, 16 s. Třídící znak: 836221.

[58] *Elektronický meteorologický slovník* [online]. 2017 [cit. 2024-03-07]. Dostupné z: http://slovnik.cmes.cz/heslo/4339

[59] LEVENHUK, Mikroskopy. Fluorescenční mikroskop MAGUS Lum 400L. *Mikroskopy-levenhuk.cz* [online]. [cit. 2024-05-08]. Dostupné z: https://www.mikroskopy-levenhuk.cz/fluorescencni-mikroskop-magus-lum-400l

[60] KAPUSCINSKI, Jan. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic & Histochemistry* [online]. 2009, **70**(5), 220-233 [cit. 2024-05-08]. Dostupné z: doi:10.3109/10520299509108199

[61] SANDERSON, Michael J., Ian SMITH, Ian PARKER a Martin D. BOOTMAN. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2014, **2014**(10) [cit. 2024-05-08]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top071795

[62] JOHNSON-WHITE, Brandy, Baochuan LIN a Frances S. LIGLER. Combination of Immunosensor Detection with Viability Testing and Confirmation Using the Polymerase Chain Reaction and Culture. *Analytical Chemistry* [online]. 2007, **79**(1), 140-146 [cit. 2024-05-08]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac061229l

[63] THERMO FISHER SCIENTIFIC. THERMO FISHER SCIENTIFIC. EVOS Cell Imaging Systems. *Thermo Fisher Scientific - CZ* [online]. C2006-2024 [cit. 2024-05-09]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-analysis/cellular-imaging/evos-cell-imaging-systems.html

[64] SMENDEROVAC, Emily, Caroline EMILSON, Karelle RHEAULT, Élodie BRAZEAU, Marie-Josée MORENCY, Patrick GAGNÉ, Lisa VENIER a Christine MARTINEAU. Drying as an effective method to store soil samples for DNA-based microbial community analyses: a comparative study. *Scientific Reports* [online]. 2024, **14**(1) [cit. 2024-05-17]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-023-50541-2

[65] CHINAGLIA, Selene, Ermes ESPOSITO, Maurizio TOSIN, Marco PECCHIARI a Francesco DEGLI INNOCENTI. Biodegradation of plastics in soil: The effect of water content. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2024, **222**(110691) [cit. 2024-05-08]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2024.110691

[66] ISO: THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 17556:2019 — Plastics: Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in soil by measuring the oxygen demand in a respirometer or the amount of carbon dioxide evolved*. 3. 2019, 26 s. Dostupné také z: https://www.iso.org/standard/74993.html

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
IUCN	Mezinárodní unie pro ochranu přírody
ASGR2	asialoglykoproteinový receptor 2
IBD	zánětlivé onemocnění střev
PLA	kyselina polymléčná
PHA	polyhydroxyalkanoáty
bioPBS	polybutylensukcinát
mikro-PBS	mikroplasty polybutylensukcinátu
TianAn biopolymer	polyhydroxybutyrát
PHB	polyhydroxybutyrát
PE	polyethylen
PBAT	polybutylen adipát tereftalát
LDPE	polyethylen s nízkou hustotou
KCl	chlorid draselný
WHC	maximální vodní kapacita
$KHCO_3$	hydrogenuhličitan draselný
HCl	kyselina chlorovodíková
CO_2	oxid uhličitý
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
UV záření	ultrafialové záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Klasifikace plastů dle velikosti částic [3]..... 11

Obrázek 2: Hlavní zdroje primárních a sekundárních mikroplastů [12]. 12

Obrázek 3: Potenciální ohrožení lidského zdraví v důsledku environmentální expozice mikroplastů [12]..... 14

Obrázek 4: Možné rozdělení plastů z hlediska biodegradability [31]. 18

Obrázek 5: Globální produkce bioplastů [33]..... 19

Obrázek 6: Jednotlivé kroky biodegradace [36]. 20

Obrázek 7: Tašky vyrobeny z oxo-degradabilního materiálu po 3 letech. Vlevo taška vytažená z moře, vpravo taška pohřbená v půdě. Obě tašky byly schopny udržet 2,25 kg potravin [41]. 22

Obrázek 8: Vliv mikroplastů na půdní společenstvo [43]. 23

Obrázek 9: Vzorek půdy připravený k analýze 30

Obrázek 10: Vzorkovnice připravené k inkubaci, půda P1 33

Obrázek 11: Sledování nárůstu biofilm u v čase na foliích polymeru TianAn biopolymer při různých koncentracích WHC, zvětšeno 200x. 41

Obrázek 12: Sledování nárůstu biofilmu v čase na foliích polymeru bioPBS při různých koncentracích WHC, zvětšeno 200x..... 43

Obrázek 13: Tvar bakterií u 10% WHC po 7 dnech od inkubace, zvětšeno 400x. 44

Obrázek 14: Sledování nárůstu biofilmu v čase na foliích polymeru Ecoflex při různých koncentracích WHC, zvětšeno 200x..... 45

Obrázek 15: Průběh biodegradace polymerů TianAn biopolymer a Ecoflex v půdě P2 (jílovitá půda). Půda obsahovala 10, 40 a 60 % WHC. 49

Obrázek 16: Průběh biodegradace polymerů TianAn biopolymer a Ecoflex v půdě P3 (písčitá půda). Půda obsahovala 10, 40 a 60 % WHC. 50

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Výsledky předinkubace pro půdu P2. 47
Tabulka 2: Výsledky předinkubace pro půdu P3. 48