

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Tereza Flohrová

Vliv mikroplastů na střevní mikrobiom žížal, jejich imunitní systém a metabolom
Effects of microplastics on earthworm gut microbiome, their immunity system and
metabolome

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D., DSc.

Praha, 2024

Abstrakt

Mikroplasty jsou velmi rozšířenými polutanty. Nachází se ve vodném, vzdušném i půdním prostředí. Mikroplasty se uvolňují přímo do půdy kupříkladu z mulčovacích fólií a textilií. V půdě se mikroplasty deponují a mohou mít negativní vliv na půdní mikrofaunu a makrofaunu. Žížaly jako ekosystémoví inženýři a půdní a střevní bakterie hrají významnou roli při biogeochemických cyklech biogenních prvků. Narušení funkce žížal, jejich střevních bakterií nebo bakterií půdních by mohlo mít dopad na celý ekosystém. V rámci této diplomové práce, byly žížaly *Apporectodea* sp. vystaveny mikroplastům z polypropylenové černé netkané textilie o koncentraci 1 g/kg půdy a 0,0265 g/kg půdy po dobu 14, 28 a 56 dní. Byla sekvenována DNA pro identifikaci bakterií ze střeva žížal, z obsahu žížalího střeva a z chovné půdy. Dále byla provedena necílená analýza metabolitů z žížalího těla a extrakce imunitních buněk z žížal pomocí tří rozdílných metod. Nebyly zjištěny žádné signifikantní změny způsobené přítomností mikroplastů v zastoupení bakterií ze střeva, obsahu střeva a půdy, ale byly detekovány statisticky významné změny v metabolomu. Ze žížal se nepodařilo izolovat dostatečný počet imunitních buněk na další analýzu. Z výsledků není možno jednoznačně prokázat, zda mají mikroplasty vliv na střevní mikrobiotu žížal a jaký konkrétní vliv mají na jejich metabolismus. Nicméně výsledky naznačují, že mikroplasty nepředstavují inertní částice pro žížaly a výsledky práce dále ukazují, že je třeba dalších výzkumů v této oblasti.

Klíčová slova: Mikroplasty, Mulčovací textilie, *Apporectodea*, Střevní mikrobiom, Metabolom, Imunitní buňky

Abstract

Microplastics are widespread pollutants found in aquatic, atmospheric, and soil environments. They are released directly into the soil, for example, from mulch films and textiles. Microplastics accumulate in the soil and can have a negative impact on soil microfauna and macrofauna. Earthworms, acting as ecosystem engineers, and soil and gut bacteria play a significant role in biogeochemical cycles of biogenic elements. Disruption of earthworm function, their gut bacteria, or soil bacteria could have an impact on the entire ecosystem. In the context of this thesis, earthworms of the species *Apporectodea* sp. were exposed to microplastics from polypropylene black nonwoven textile at concentrations of 1 g/kg soil and 0.0265 g/kg soil for 14, 28, and 56 days. DNA was sequenced to identify bacteria from the earthworm gut, gut contents, and rearing soil. Additionally, untargeted analysis of metabolites from the earthworm body and extraction of immune cells from earthworms using three different methods were conducted. No significant changes caused by the presence of microplastics were found in the representation of bacteria from the gut, gut contents, and soil, but statistically significant changes in the metabolome were detected. A sufficient number of immune cells could not be isolated from the earthworms for further analysis. The results do not unequivocally demonstrate whether microplastics have an impact on earthworm gut microbiota and what specific effect they have on their metabolism. However, the results suggest that microplastics are not inert particles for earthworms, and further research in this area is needed.

Key words: Microplastics, Mulching fabric, *Apporectodea*, Gut microbiota, Metabolome, Immune cells

Prohlášení

Tato diplomová práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Praze.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 30.4. 2024

Tereza Flohrová

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Cajthamlovi, Ph.D., DSc. za možnost pod jeho odborným vedením zpracovat téma diplomové práce, za rady a trpělivost. Dále bych též chtěla velmi poděkovat panu prof. Ing. Mgr. Janu Frouzovi, CSc. za cenné rady ohledně chovu žížal a za pomoc s určováním nasbíraných žížal. Děkuji také RNDr. Petře Procházkové, Ph.D a Natividad Isabel Navarro Pacheco, Ph.D a Mgr. Aleně Grasserové, Ph.D za předání zkušeností v oblasti pitvání žížal a extrakce imunitních buněk z žížal. Díky patří i RNDr. Jaroslavu Semerádovi, Ph.D za všechny cenné rady a konzultace. Ráda bych poděkovala Mgr. Kamile Šrédlové, PhD. za kvalitativní analýzu mikrovláken pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací a za fotky, které v průběhu měření pořídila. Za velkou pomoc v oblasti metabolické analýzy děkuji RNDr. Janě Boháčkové. Děkuji Ing. Aleně Filipové za trpělivost a za předání zkušeností v oboru izolace DNA a děkuji Mgr. Ivanu Titovovi a Mgr. Kateřině Markové za konzultace vedené ohledně použitelnosti statistických analýz a za pomoc s provedením analýz v programu R. Děkuji všem ostatním kolegům z laboratoře za rady a odpovědi na mé všetečné a nekončící otázky. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem kamarádům, a hlavně svému Vítkovi za podporu při psaní. Díky patří i mé rodině za zázemí a prostředí, ve kterém mi umožnili věnovat se studiu.

Obsah

Obsah	6
Seznam zkratek.....	8
1 Úvod	9
2 Literární přehled	10
2.1 Plasty	10
2.2 Mikroplasty.....	10
2.2.1 Primární mikroplasty.....	11
2.2.2 Sekundární mikroplasty.....	11
2.3 Plastové mulčovací textilie	12
2.4 Toxicita mikroplastů	13
2.5 Žížaly jako modelový organismus	13
2.5.1 O žížalách obecně	13
2.5.2 Žížaly rodu <i>Aporrectodea</i>	16
2.6 Žížalí mikrobiom.....	18
2.6.1 Bakterie	18
2.6.2 Střevní mikrobiom žížal	18
3 Metody a materiály.....	22
3.1 Materiály a roztoky	22
3.2 Metody	24
3.2.1 Příprava mikroplastů a analýza hmotnosti mikrovláken.....	24
3.2.2 Izolace mikroplastových vláken z půd.....	25
3.2.2.1 Homogenizace půd	26
3.2.2.2 Digesce	26
3.2.2.3 Flotace.....	27
3.2.2.4 Detekce vláken	27
3.2.3 Sběr a určování žížal, sběr půdy.....	28
3.2.4 Charakterizace chovné půdy	28
3.2.5 Experimentální design.....	28
3.2.6 Pitva žížal	30
3.2.7 Analýza bakteriálního mikrobiomu	30
3.2.7.1 Izolace DNA	30
3.2.7.2 Polymerázová řetězcová reakce (PCR).....	31
3.2.7.3 Přečištění vzorků	32
3.2.7.4 Qubit	32
3.2.7.5 Sekvence a zpracování sekvenačních dat.....	33

3.2.8	Extrakce žížalích imunitních buněk	35
3.2.8.1	Extrakce imunitních buněk extrakčním pufrem	35
3.2.8.2	Extrakce imunitních buněk Pasteurovou pipetou	35
3.2.8.3	Extrakce imunitních buněk elektrickým napětím	36
3.2.9	Mikroskopování imunitních buněk	37
3.2.10	Necílená metabolomická analýza	37
3.2.10.1	Homogenizace a extrakce	37
3.2.10.2	Příprava vzorků na měření	37
3.2.10.3	Analýza extrahovaných vzorků	38
3.2.10.4	Zpracování dat	38
4	Cíl práce	39
5	Výsledky	40
5.1	Příprava a charakterizace mikroplastů	40
5.2	Izolace mikroplastových vláken z půd a pyrolýza	40
5.3	Sběr a určování žížal	41
5.4	Charakterizace půdy	42
5.5	Hmotnost žížal v průběhu experimentu	43
5.6	Analýza bakteriálního mikrobiomu	44
5.7	Extrakce imunitních buněk	50
5.8	Necílená metabolomická analýza	51
6	Diskuse	52
6.1	Mikroplasty z mulčovací textilie	52
6.2	Sběr a určování žížal	53
6.3	Charakterizace půdy	54
6.4	Analýza bakteriálního mikrobiomu	55
6.5	Extrakce imunitních buněk	59
6.6	Necílená metabolomická analýza	60
7	Závěr	62
8	Bibliografie	64

Seznam zkratek

ACN acetonitril

bp páry bazí (z angl. base pair)

BSA hovězí sérový albumin

Cox oxidovatený uhlík

CTAB cetyltrimethylamoniumbromid

dH₂O destilovaná voda

DNA deoxyribonukleová kyselina

dNTP deoxyribonukleotid

EtOH ethanol

FCH míra velikosti účinku (z angl. fold change)

FeSO₄ · 7H₂O heptahydrát síranu železnatého

FTIR infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

HILIC chromatografie s hydrofilní interakcí (z angl. hydrophilic interaction chromatography)

HNO₃ kyselina dusičná

H₂O₂ peroxid vodíku

HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)

H₂SO₄ kyselina sírová

CHCl₃ chloroform

LC-MS kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (z angl. liquid chromatography–mass spectrometry)

MeOH methanol

MPP z angl. Mass Profiler Professional

MTEX mulčovací textilie

NaCl chlorid sodný, sůl

NC negativní kontrola

N₂O oxid dusný

OTU operační taxonomická jednotka (z angl. operation taxonomic unit)

PBS fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)

PCoA analýza hlavních souřadnic (z angl. Principal Coordinates Analysis)

PCR polymerázová řetězcová reakce

PE polyethylen

PET polyethylentereftalát

PP polypropylen

PS polystyren

PVC polyvinylchlorid

QC kontrola kvality (z angl. quality control)

RPM otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)

TiO₂ oxid titaničitý

TOC celkový organický uhlík (z angl. total organic carbon)

UV ultrafialové světlo (z angl. ultraviolet)

WHC schopnost půdy zadržet vodu (z angl. water holding capacity)

1 Úvod

Mikroplasty, částice plastů o velikosti menší než 5 mm (NOAA, 2008), jsou dnes neoddělitelnou součástí životního prostředí (Pandey *et al.*, 2022; Rafique *et al.*, 2020; Olesen *et al.*, 2019; Beriot *et al.*, 2021; Chubarenko a Stepanova 2017). Mikroplasty mohou do životního prostředí vstupovat již v mikroskopickém měřítku, takové mikroplasty jsou nazývané primární. Nebo mohou vznikat rozpadem plastového odpadu, hraček či různých pracovních pomůcek v životním prostředí působením vnějších vlivů. Takové mikroplasty jsou nazývány sekundární (Cole *et al.*, 2011).

Mikroplasty přítomné ve vodě nebo ve vzduchu by bylo možno z tohoto prostředí aspoň částečně oddělit (Bannick *et al.*, 2019; Dong *et al.*, 2023), ovšem časem se mohou dostávat do půdy (Allen *et al.*, 2019; Corradini *et al.*, 2019), kde dochází k jejich depozici. Tyto pak izolovat z pevné matrice jako je půda, lze jen stěží.

Je pravděpodobné, že se půdní fauna postupem času dostane do kontaktu s čím dál tím vyššími koncentracemi mikroplastů. O tom, že mikroplasty mají vliv na životní funkce a životaschopnost organismů, je publikováno mnoho článků (Lu *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2017; Rodríguez-Seijo *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020). Žížaly jako klíčový druh terestrického ekosystému jsou v půdě mikroplastům vystaveny a pomáhají i jejich transferu do hlubších vrstev (Rillig *et al.*, 2017). U žížal *Eisenia andrei* vystavených mikroplastům byla kupříkladu detekována imunitní odpověď a poškození střeva (Rodríguez-Seijo *et al.*, 2017). Byla zaznamenána i změna ve střevním mikrobiomu žížal (Li *et al.*, 2022; Chan *et al.*, 2023).

Bakterie se svými metabolickými procesy podílejí na globálních biogeochemických cyklech prvků. V půdě pomocí svých enzymů dokáží rozložit složité organické látky jako je celulóza na jednodušší cukry a tím zvýšit dostupnost uhlíku pro vyšší organismy (Crawford a Sutherland, 1979; Bao *et al.*, 2019). Střevní mikrobiom žížal je velmi důležitou součástí půdního koloběhu prvků a živin. Průchodem půdy s mikroorganismy střevem žížaly dochází k namnožení určitých půdních bakterií a k podpoře a zesílení některých biochemických dějů (Zhou G. *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2015).

Pokud by vlivem mikroplastů docházelo k negativnímu ovlivnění žížal, ke změně střevního mikrobiomu či dysmikrobii, mohlo by to mít dopad na celý ekosystém (Blouin *et al.*, 2013).

2 Literární přehled

2.1 Plasty

Prvním plastovým syntetickým materiálem, který byl roku 1907 objeven belgickým rodákem Leo Hendrikem Baekelandem, je bakelit (Shashoua, 2012). Od té doby došlo k vývoji mnoha dalších typů plastů, které lidstvu usnadňují každodenní život. K nejrozšířenějším patří polyethylen (PE), polypropylen (PP), polystyren (PS), polyethylentereftalát (PET), polyvinylchlorid (PVC).

Díky svým vlastnostem jako je například nízká tepelná a elektrická vodivost, rozpustnost a hustota, vysoká odolnost vůči korozi a nízká cena se plast stal oblíbeným materiálem ve všech odvětvích průmyslu. V roce 1950 činila globální produkce 1,5 milionu tun plastu ročně (PlasticsEurope, 2010), v roce 2021 390,7 milionu tun plastu ročně (PlasticsEurope, 2022a) a v roce 2060 se předpokládá roční produkce plastu 1 014 milionu tun (OECD, 2022).

Desítky let tak dochází k rapidnímu nárůstu produkce plastů. Záznamy z roku 2019 říkají, že z 29,5 milionu tun obalového materiálu bylo jen 10,2 milionu tun posláno k recyklaci a pouhých 4,6 milionu tun plastu bylo zrecyklováno a vráceno do oběhu. Zbýlý plast byl buď skládkován, spálen, nebo došlo ke ztrátám při recyklaci (PlasticsEurope, 2022b). Toto dokumentuje, že se plasty, nejen z odpadového hospodářství, dostávají do životního prostředí, kde se hromadí a dochází k jejich pomalému rozpadu na mikroplasty.

2.2 Mikroplasty

Termín „mikroplasty“ se dostal do povědomí roku 2004, kdy ho poprvé zavedl britský mořský biolog, profesor Richard C. Thompson (Thompson *et al.*, 2004). Termín mikroplasty používal pro mikroskopické částice plastu, dále mikroplasty nedefinoval. Ovšem ani dnes není zavedena jednotná definice mikroplastů (Frias a Nash, 2019). Mikroplasty jsou nejčastěji definovány dle NOAA (2008) jako částice plastů menších než 5 mm. Verschoor (2015) se ve své zprávě pustil hlouběji do definice mikroplastů a doporučil pro popis mikroplastů použít 5 kritérií: chemické složení, skupenství, velikost částice, rozpustnost ve vodě a degradovatelnost. Definice by pak zněla následovně. Mikroplasty jsou nedegradovatelné, ve vodě nerozpustné pevné syntetické polymerní částice menší než 5 mm.

Mikroplasty jsou dnes všudypřítomné a byly nalezeny v celé zemské biosféře (Wang Ch. *et al.*, 2021). Jako příklady míst, kde všude byly mikroplasty nalezeny tak budou použita spíše místa neočekávaná. Mikroplasty byly detekovány v ledu Severního ledového oceánu (Obbard *et al.*, 2014; Peeken *et al.*, 2018), ve sněhu v Alpách a na Severním pólu (Bergmann *et al.*, 2019), na mořském dně (Bergmann *et al.*, 2017; Mu *et al.*, 2019), v Mariánském příkopu (Peng *et al.*, 2018), v řekách Tibetské náhorní plošiny (Jiang Ch. *et al.*, 2019) a na poušti v Íránu (Abbasi *et al.*, 2021).

2.2.1 Primární mikroplasty

Mikroplasty se dají dělit dle způsobu vzniku a vstupu do životního prostředí na primární a sekundární (Cole *et al.*, 2011). Primární mikroplasty jsou mikroplasty vyrobené přímo pro využití v průmyslu, dostávají se do životního prostředí již v mikroskopickém měřítku. Do této kategorie tak spadají například i mikroplasty vzniklé praním prádla (Hyeon *et al.*, 2023), nebo mikroplasty vzniklé z odírání automobilových pneumatik (Hoeke *et al.*, 2024; Boucher a Friot, 2017). Dále se dají najít v kosmetických produktech, jako jsou různé tělové krémy, sprchové gely, holicí krémy a opalovací krémy, kde plní roli exfoliantů (Fendall a Sewell, 2009; Hoang *et al.*, 2022). Mimo již zmiňovaných kosmetických produktů, můžeme primární mikroplasty najít i v barvách na vlasy, v lacích na nehty, v deodorantech a v zubních pastách (Zitko a Hanlon, 1991; Lassen *et al.*, 2015; Boucher a Friot, 2017). Tyto plasty jsou dříve či později smyty z těla a tím se dostávají do odpadních vod, do čistírny odpadních vod a do kalů, kterými se hnojí zemědělská pole. Dále se primární mikroplasty využívají ve farmaceutickém průmyslu jako nosiče účinných látek nebo jako průmyslová abraziva používaná například při čištění tryskáním, či jako složka vrtných kapalin při průzkumu ropy a zemního plynu (Lassen *et al.*, 2015; Sundt *et al.*, 2014; Essel *et al.*, 2015). Do životního prostředí se mohou primární mikroplasty dostat také přímo z výroby při transportu (Duis a Coors, 2016).

2.2.2 Sekundární mikroplasty

Sekundární mikroplasty vznikají rozpadem makroplastů přítomných v životním prostředí. Vlivy působící na makroplasty jsou mechanického typu (abraze pískem, vodou nebo zeminou) (Yang *et al.*, 2023; Bhattacharjee *et al.*, 2023), fyzikálního (teplo, ultra fialové záření, UV) (Mailhot *et al.*, 2000) a biologického (působení mikroorganismů) (Jain *et al.*, 2022; Jeon *et al.*, 2021; Habib *et al.*, 2020). Za sekundární mikroplasty se považují rozpadlé plasty, které se dostaly do životního prostředí odhazováním odpadu mimo místa k tomu určená, špatným skládkováním, ale i při přírodních katastrofách jako hurikány a záplavové vlny (Ryan *et al.*, 2023). Mezi velké zdroje sekundárních mikroplastů se řadí i rybářský průmysl a lodní doprava, kde dochází mimo jiné k oděru a ztrátám rybářských sítí a pastí na chobotnice (Andriolo a Gonçalves, 2023; Skirtun *et al.*, 2022). Z lodních nátěrů také dochází k uvolňování mikroplastů (Galafassi *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2014; Imhof *et al.*, 2016). Ve městech, kromě již zmiňovaného plastového odpadu nacházejícího se mimo místa pro odpad určená, se mikroplasty generují i abrazí nátěrů budov, umělých trávníků (Lassen *et al.*, 2015) a pozemního silničního značení (Vianello *et al.*, 2019). Nebo se později vlivem srážek mikroplasty dostanou do odpadních vod či přímo do životního prostředí (Zhang *et al.*, 2019).

Významným zdrojem sekundárních mikroplastů v půdě jsou mulčovací filmy a textilie používané v zemědělství i na soukromých zahradách (Huang *et al.*, 2020). Dále se ke zdrojům sekundárních mikroplastů v půdě mohou řadit fóliové kryty na zahrady, senážní fólie na balení balíků sena, různé zavlažovací systémy a plastové zahradnické pomůcky (Kasirajan a Ngouajio, 2012).

Půda patří k prostředí, kde se mikroplasty hromadí spíše, než vznikají. Dalším zdrojem mikroplastů v půdě jsou kaly z čistíren odpadních vod, kterými se půda hnojí (Carr *et al.*, 2016; Magni *et al.*, 2019).

2.3 Plastové mulčovací textilie

Mulče obecně jsou přírodní a syntetické materiály organického nebo anorganického původu, které se pokládají na povrch půdy za účelem mulčování (Chalker-Scott, 2007). Při mulčování nedochází k odparu vody z půdy a tím dochází ke zvýšení vlhkosti půdy (Ahmad *et al.*, 2020; Russel, 1940). Další výhodou mulčování je zabránění růstu plevelů (Wilén *et al.*, 1999; Ahmad *et al.*, 2020), zabránění eroze půdy (Borst a Woodbrun, 1942) a udržování stálé teploty půdy (Kader *et al.*, 2019). Mulčování tak zvyšuje produktivitu pěstování (Mutetwa a Mtaita, 2014).

V literatuře je možno se setkat s pojmy: geotextilie (anglicky Geotextile), mulčovací fólie (anglicky Mulching Film) a mulčovací textilie (MTEX, anglicky Mulching Fabric).

Geotextilie je vyrobena ze syntetických vláken, může být tkaná či netkaná. Používá se ve stavebním inženýrství, kde má funkci zpevňovací, drenážní (odvod vody), filtrační (zamezení vyplavování sypkých zemin), ochrannou (ochrana hydroizolace) a separační (zábrana promíchávání vrstev půdy různých vlastností) (Ingold, 1993).

Mulčovací fólie je PE materiál podobný měkčenému PVC. Používá se též na soukromé zahrady, ale větší využití má v zemědělství, kde se používá k mulčování velkých ploch. Zároveň se jedná o první mulčovací materiál, se kterým průkopník v mulčování pomocí plastové hmoty, profesor E.M. Emmert z Kentucky, začínal své experimenty (Emmert, 1957). Od té doby došlo k masivnímu nárůstu používání plastu jako materiálu pro syntetické mulče. V roce 2020 bylo globálně na mulčování použito zhruba 2 milionu tun plastu (Wang S. *et al.*, 2022).

MTEX je už z podstaty svého názvu textilie. Jedná se o syntetická vlákna propletená (tkaná forma textile) nebo pouze termicky spojená k sobě (netkaná forma textile). Barvu mohou mít MTEX bílou, hnědou nebo černou dle aditiv. Uhlíková černá se kupříkladu používá jako barvivo a zároveň funguje jako UV stabilizátor a chrání textilií před oxidací, stejně funguje oxid titaničitý (TiO₂), který dodává textilií naopak bílou barvu. Různých aditiv, která se používají i během výroby textilií a mají antimikrobiální nebo proti hořlavý efekt, je celá řada (Wiewel a Lamoree, 2016). S MTEX se lze majoritně setkat na soukromých zahradách. Nejčastěji si ji lidé spojí se sazeničkami jahod, paprik, salátu atp.

Ze studií je známo, že na polích dochází k postupnému rozpadu mulčovací fólie na mikroplasty (Junhao *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2020; Wang T. *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022), ovšem téma rozpadu MTEX by potřebovalo hlubšího zkoumání.

2.4 Toxicita mikroplastů

Z nepřehledného množství článků vyplývá, že mikroplasty mají na živočichy negativní vliv. U živočišných druhů vystavených mikroplastům bylo sledováno zvýšení oxidativního stresu (Alomar *et al.*, 2017; Schirinzi *et al.*, 2017), genotoxicita (Jiang X. *et al.*, 2019; Çobanoğlu *et al.*, 2021), imunotoxicita (Zhou, *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2023), neurotoxicita (Yu *et al.*, 2023; Suman *et al.*, 2023), snížená reprodukce (Ju *et al.*, 2019; Kwak a An, 2021), změna chování organismů (Yin *et al.*, 2018; 2019) a změna střevního mikrobiomu (Li R. *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2024; Zhu *et al.*, 2024).

Z předchozích článků, popisujících vlivy mikroplastů na živočichy, by se mohlo zdát, že jsou samotné mikroplasty velmi toxické částice. Je ovšem nutno si uvědomit, že studie o toxicitě jsou prováděny v laboratořích za uměle nastavených podmínek a modelové organismy jsou často vystavovány koncentracím mikroplastů neodpovídajícím environmentálním koncentracím. Dále jsou organismy vystavovány čistým plastům z výroby (Zhu *et al.*, 2024; Ding *et al.*, 2024). V reálném prostředí se nacházejí mikroplasty různých tvarů a složení v různém stádiu rozpadu (Kwak *et al.*, 2013; Barboza *et al.*, 2020; Cheung a Fok, 2017) a díky svému velkému specifickému povrchu poskytují prostor pro sorpci jiných polutantů (Arienzo *et al.*, 2021; Titov, 2022) a mikrobiálních společenstev (Wang J. *et al.*, 2021; Zhang W. *et al.*, 2022; Viršek *et al.*, 2017). Popis účinků mikroplastů na organismy v reálném prostředí tak pravděpodobněji bude mnohem složitější i z pohledu negativních kontrol.

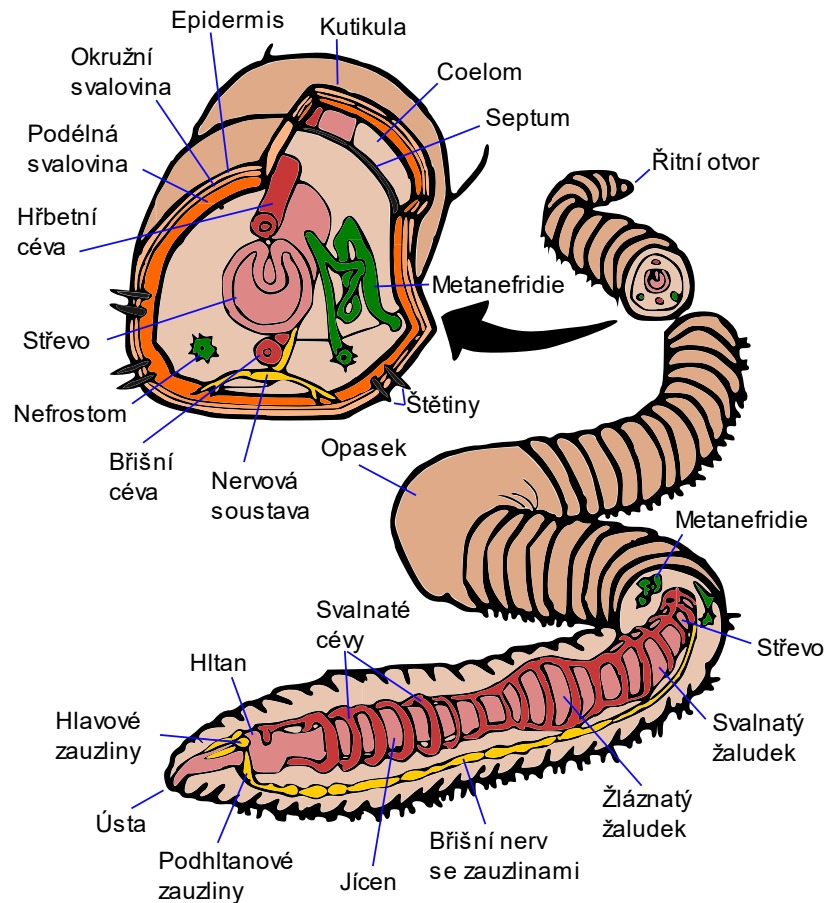
2.5 Žížaly jako modelový organismus

2.5.1 O žížalách obecně

Žížaly (Crassicitellata) jsou společně s pijavicemi jednou z nejznámějších skupin máloštětinatých opaskovců (Clitellata). Fylogenetické studie postavené na větším množství molekulárních markerů staví tuto monofyletickou skupinu do příbuznosti se skupinou Moniligastrida (Erséus *et al.*, 2020). Charakteristické jsou více vrstevnatým opaskem (*clitellum*), který je výraznější než u ostatních maloštětinatých opaskovců. Další apomorfií je tzv. oktogonadální uspořádání pohlavních orgánů. Jedná se o stav, kdy se ve 4 za sebou jdoucích segmentech nacházejí 2 páry semenných váčků (*testes*) a 2 páry vaječnicků (*ovarium*). I když se právě žížaly vyvinuly zřejmě z druhů čistě vodních (Rousset *et al.*, 2008), většina pravých žížal je čistě terestrická.

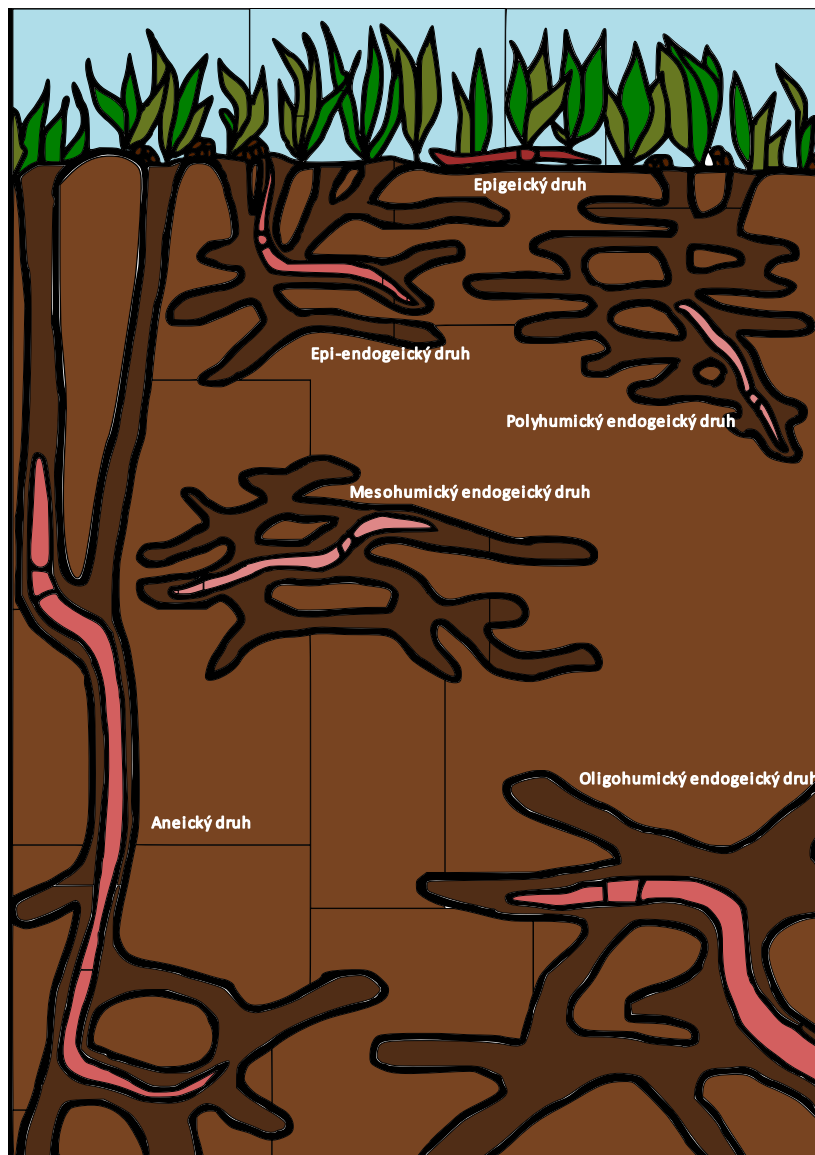
Tvar těla mají žížaly válcovitý a podlouhlý, měřit mohou od 2 či 4 cm po 1 m. Barvu mohou mít od šedo/bílo růžové přes růžovou, purpurovou, hnědou až zelenou (Pižl, 2018). Žížalí coelom je přepážkami rozdělen do článků, na kterých jsou štětky. Povrch těla kryje kutikula, po kterou se nachází epidermis, okružní a podélná svalovina. Celým žížalím tělem prochází nepřerušene nervová, cévní a trávicí soustava. Nervová soustava je gangliová, se zauzlinami v každém článku těla. V hlavové části se nachází hlavové a podhltanové zauzliny. Cévní soustava je uzavřená, podél břišní a hřbetní části

procházejí hlavní cévy propojené příčnými spojkami (komisurami). Komisury v oblasti jícnu jsou tvořeny svalnatými cévami a zajišťují pumpování krve. Žížaly dýchají povrchem těla, proto pokožka žížal obsahuje velké množství malých cév zajišťujících dýchání. Trávicí soustava se dělí na hltan, jícen, žláznatý žaludek, svalnatý žaludek a střevo. V každém článku je přítomna metanefridie, vylučovací orgán žížal viz Obrázek 1. Žížaly jsou hermafroditi, kteří mají v dospělosti opasek s vajíčky. (Campbell a Reece, 2006; Rosypal, 2003).



Obrázek 1 Obecná anatomie žížal Obecná anatomie žížaly, převzato a upraveno v programu Inkscape z webové stránky (Mehr a Dilip, 2017)

Dle (Bouché, 1977) se žížaly dělí na 3 skupiny (viz. Obrázek 2). Na žížaly epigeické živící se opadem a vyskytujícími se na povrchu půdy. Na žížaly endogeické živící se minerální půdou méně bohatou na organickou hmotu a vyskytujícími se ve vrchních vrstvách půdy. Hlubící vertikální chodbičky, zřídka lezoucí na půdní povrch. A na žížaly aneické živící ve spodních vrstvách půdy, hlubící vertikální chodbičky a živící se organickou hmotou z povrchu půdy, kterou zabudovávají hluboko pod povrch.



Obrázek 2 Obrázek ilustrující odlišné ekologické strategie (skupiny) žížal, převzato a upraveno pomocí programu Inkscape od (Hsu et al., 2023).

Žížaly se vyskytují na všech kontinentech, ovšem převážná většina se nachází v subtropických, tropických oblastech a v mírných pásech. Dnes je známo přes 5000 druhů žížal. Ve střední Evropě je nejvíce žížal z čeledi Žížalovití (*Lumbricidae*) s více než 150 druhy, z čehož je okolo 52 druhů známo v České republice. Žížaly se více vyskytují v úrodnějších rozmanitějších, nezaplavených půdách

v lužních lesích nebo na loukách, méně již v jehličnatých lesích, rašeliništích či v orné půdě. Výskyt žížal v půdě se pohybuje okolo počtu 80 až 800 jedinců na 1 m² (Miko, 2019; Pižl, 2018).

Žížaly patří mezi saprofační makrofaunu půdy, živí se odumřelou organickou hmotou, mikroorganismy a velmi zřídka malými půdními organismy. Svými aktivitami mění fyzikální vlastnosti půdy a chemické složení půdy (Lavelle *et al.*, 1997). Proto jsou často označovány jako ekosystémoví inženýři (Jones *et al.*, 1994). Žížaly svou činností promíchávají a fragmentují organickou hmotu z povrchu půdy a zabudovávají ji hlouběji pod povrch. Hrají tak důležitou roli v cyklu uhlíku a dusíku (Don *et al.*, 2008; Fahey *et al.*, 2013; Parkin a Berry, 1999). Je prokázáno, že se v žížalích chodbičkách vyskytují nitrifikační a denitrifikační bakterie. Půda s žížalími chodbičkami obsahuje vyšší množství dusičných (NO₃⁻) a amonných (NH₄⁺) iontů než půda, kde se žížaly nevyskytují (Parkin a Berry, 1999; Horn *et al.*, 2003; Tillinghast *et al.*, 2001)

Bioturbací žížaly půdu též mechanicky rozrušují a provzdušňují (Friend, 1912). Dochází tak ke změně anaerobního prostředí na aerobní a ke vzniku prostorů, kde se mohou usadit mikroorganismy. Žížalí chodbičky též zvyšují potenciál půdy pojmu vodu (Capowiez *et al.*, 2014; Ernst *et al.*, 2009). Půdy tak při srážkách mají menší tendenci být podmáčené.

Důležité jsou i žížalí exkrementy, které mají vůči půdě vyšší zastoupení některých iontů jako je fosfor, draslík, hořčík či vápník (Basker *et al.*, 1993), vyšší podíl dusíku, rozpustného uhlíku a vyšší mikrobiální aktivitu (Daniel a Anderson, 1992; Ruz-Jerez *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2015). Žížalí exkrementy jsou plné živin, které jsou dostupné pro rostliny. Rostliny v půdě s žížalami mají zvýšený příjem dusíku (Zhao a Huang, 1991; Tomati *et al.*, 1988) a vyšší biomasu (Lui *et al.*, 1991; Edwards, 1995). V neposlední řadě slouží žížaly jako důležitá potrava pro dravce.

Díky tomu, že jsou žížaly nejdůležitějším půdním makroorganismem a jsou citlivé k toxickým látkám, byly přijaty jako půdní bio indikátor (OECD, 1984; 2004).

2.5.2 Žížaly rodu *Aporrectodea*

Rod žížal *Aporrectodea* (viz. Obrázek 3, str.17) se řadí do čeledě žížalovití. Druh žížaly temné (*Aporrectodea caliginosa*) (Savigny, 1826) je nejrozšířenější žížalou v palearktické oblasti a jedná se o žížalu, se kterou se člověk nejčastěji setká na obdělávaných polích, loukách nebo zahradách (Boström a Lofs-Holmin, 1996; Pérez-Losada *et al.*, 2009; Boag *et al.*, 1997; Curry *et al.*, 2008; Sims a Gerard, 1999). *A. caliginosa* je nazývána komplexem druhů, kam patří *A. caliginosa s.s.*, *Aporrectodea trapezoides*, *Aporrectodea tuberculata* a *Aporrectodea nokturna*, které od sebe nelze lehce morfologicky rozlišit a musí se přistoupit k metodám molekulární biologie (Pérez-Losada *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2012). *Aporrectodea* sp. je endogeická (Bouché 1977) polyhumická (Hsu *et al.*, 2023) žížala (viz. Obrázek 2, str. 15). Žije ve vrchních 15 cm pod povrchem půdy (Bart *et al.*, 2018) a živí se rozkládající se organickou hmotou bohatou na uhlík a hlavně dusík (Hsu *et al.*, 2023;

Zareitalabad *et al.*, 2010). Jedná se o málo pigmentovanou šedorůžovou žížalu o velikosti 60-85 mm (Sims a Gerard, 1999).



Obrázek 3 Fotografie zachycující jedince žížaly *Aporrectodea* sp. nasbíraného v okolí obce Velké Přílepy, foto: autor.

A. caliginosa je stejně jako například Žížala hnojní (*Eisenia fetida*, čeleď *Lumbricidae*) modelovým organismem využívaným v toxikologických testech (Mosleh *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012). Práce s druhem *E. fetida* má tu výhodu, že je dostupný z laboratorních chovů. Využití takto chovaných žížal zaručuje práci s definovanými jedinci (stejně starými, podobně velikými a živými, chovanými ve stejných definovaných podmínkách). Další výhodou je jeho snadný chov a širší znalosti o tomto druhu (Lowe a Butt, 2007). Na rozdíl od druhu *E. fetida* hodícího se na prvotní testování toxicity látek, je *A. caliginosa* relevantním druhem pro výzkum toxických látek vyskytujících se ve volné přírodě (Bart *et al.*, 2018). Existuje nespočet článků o vlivu mikroplastů na žížalu *E. fetida* (Li *et al.*, 2024; Trakić *et al.*, 2024; Chen *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2020), ale jen několik článků o vlivu mikroplastů na žížalu *A. caliginosa* (Palmqvist *et al.*, 2019).

2.6 Žížalí mikrobiom

2.6.1 Bakterie

Jedná se o živé jednobuněčné prokaryotické organismy o velikosti od desetin do stovek mikrometrů. První, kdo pozoroval a objevil bakterie v roce 1676, byl holandský obchodník s textilem Antonie van Leeuwenhoek. Bakterie pozoroval pomocí jím zkonstruovaného mikroskopu (Kutschera, 2023).

Z antropocentrického hlediska mohou být bakterie vnímány spíše negativně, jako patogenní agens. Bakterie ovšem nejsou jen patogenní a tvoří velmi důležitou složku biosféry. Díky dlouhé evoluci se dokázaly přizpůsobit různorodému prostředí a vyvinout rozmanité typy metabolických drah, které jsou neodlučitelnou součástí biogeochemických cyklů celé Země.

„Život bez mikrobů by nebyl možný“ (z angl. “Life would not long remain possible in the absence of microbes.”), tvrdil již v 19. století Louis Pasteur. Gilbert a Neufeld (2014) ve svém článku vytvářejí fikci světa bez bakterií. Popisují, že kromě faktu, že jsou eukaryotické organismy bakteriím vděčné za svou existenci v podobě mitochondrií a rostliny i v podobě chloroplastů, by bez bakterií pravděpodobně došlo k zastavení biogeochemických cyklů. Kupříkladu by nejspíše došlo k zastavení fixace vzdušného dusíku, klesla by koncentrace kyslíku a vzrostla koncentrace oxidu uhličitého. Živiny by se bez přispění bakterií a bakteriálních enzymů staly pro primární producenty obtížně dostupné. Autoři věnovali svoji pozornost i živočichům a diskutovali možnost negativního dopadu nepřítomnosti symbiotických mutualistických bakterií na imunitní systém a v neposlední řadě i na vstřebávání živin živočichy. Nejenže jsou tedy bakterie neodmyslitelnou součástí prostředí a živočichů, dnes jsou i neodmyslitelnou součástí velkého množství průmyslových odvětví (Zhong *et al.*, 2013; Doelle *et al.*, 1989; Zielińska *et al.*, 2016; Gargouri *et al.*, 2014).

2.6.2 Střevní mikrobiom žížal

Střevo žížal je prostředím, kde dochází k přímému kontaktu střevních bakterií s půdními mikroorganismy. Ačkoliv jsou žížaly v permanentním kontaktu s půdou a půdními mikroorganismy, je prokázáno, že mají žížaly svůj stálý střevní mikrobiom (Liu *et al.*, 2018). Průchodem půdy a půdních mikroorganismů střevem dochází k jejich namnožení či redukci. Jenkinson (1963) popisuje tzv. Priming effect. Z literatury znám též jako paradox šípkové Růženky (Sleeping Beauty paradox), který říká, že v půdě se vyskytují některé mikroorganismy v dormantním stádiu. Tyto mikroorganismy se mohou časem dostat do vyhovujícího prostředí jako je například žížalí střevo či žížalí chodbičky, kde se nachází uhlík v asimilovatelné podobě a mikroorganismy se tak stanou metabolicky aktivními.

Za pomoci enzymů mikroorganismů ve střevě žížal dochází k rozkladu složitých organických látek jako je celulóza či lignin (Scheu, 1993; Lattaudl *et al.*, 1999; Beloqui *et al.*, 2010) a k dalším dějům podporujícím biochemické cykly uhlíku a dusíku (Wu *et al.*, 2015). Střevo žížal je na živiny bohaté

(Barois *et al.*, 1993), anoxické prostředí (Horn *et al.*, 2003). O anaerobióze svědčí přítomnost oxidu dusného (N₂O) ve střevě žízála jako produktu dýchacího řetězce denitrifikačních bakterií (Karsten a Drake, 1997; Horn *et al.*, 2006; Matthies *et al.*, 1999; Ihssen *et al.*, 2003) viz Tabulka 1. Li *et al.*, (2021) zkoumali abundanci bakterií schopných anaerobní oxidace amoniaku (anammox) ve střevě endogeické žízály *Pheretima guillelmi* a v půdě. Zjistili, že abundance anammox bakterií se ve střevě snižuje oproti půdě, kde se abundance nemění oproti ostatním zkoumaným bakteriím, které průchodem střeva svou abundanci zvyšují.

Tabulka 1 Tabulka převzata a přeložena dle (Drake a Horn, 2007).

Aporecrrectodea spp.	Skupiny bakterií	(bakterie/g suché hmotnosti)		S/P	Reference
		Střevo (S)	Půda (P)		
oxické podmínky	fakultativní aerobové	3 × 10 ⁸	9 × 10 ⁶	33	(Ihssen <i>et al.</i> , 2003)
	bakterie oxidující NH ₄ ⁺	2 × 10 ⁵	2 × 10 ⁴	10	(Ihssen <i>et al.</i> , 2003)
	bakterie oxidující NO ₂ ⁻	3 × 10 ⁵	2 × 10 ⁴	15	(Ihssen <i>et al.</i> , 2003)
anoxické podmínky	fakultativní anaerobové	1 × 10 ⁷	2 × 10 ⁵	50	(Ihssen <i>et al.</i> , 2003)
	bakterie redukující NO ₃ ⁻	1 × 10 ⁷	4 × 10 ⁵	25	(Ihssen <i>et al.</i> , 2003)
	denitrifikační bakterie	6 × 10 ⁶	2 × 10 ⁴	300	(Ihssen <i>et al.</i> , 2003)
Celkový počet bakteriálních buněk		1 × 10 ¹⁰	6 × 10 ⁹	2	(Křišťufek <i>et al.</i> 1995)

Horn *et al.*, (2003) ve svém článku popisují přítomnost fermentativních metabolitů jako je formiát, acetát, laktát a sukcinát ve střevě žízála též podporující anaerobiózu střeva. Zeibich *et al.*, (2019) popisují přítomnost fermentativních bakterií ve střevě žízály obecné (*Lumbricus terrestris*). Fermentující bakterie byly přítomny jak v obsahu žízálního střeva, tak v samotném střevu. Byla pozorována výrazně snížená fermentace v půdě. Wüst *et al.*, (2011) identifikovali *Clostridiaceae* a *Enterobacteriaceae* jako hlavní fermentující čeledě bakterií v obsahu střeva *L. terrestris*. Dalšími výraznými anaerobními mikroorganismy jsou metanogenní Archaea, která byla ve střevě žízála také potvrzena (Koubová *et al.*, 2012; Depkat-Jakob *et al.*, 2012; Schulz *et al.*, 2015), viz Tabulka 2, str. 20.

Kromě toho, že mikroorganismy ve střevě napomáhají rozkladu složitých organických látek, samotné mohou žízále sloužit jako zdroj aminokyselin (Larsen *et al.*, 2016) a lipidů (Sampedro *et al.*, 2006).

Tabulka 2 Tabulka převzata a upravena dle (Drake a Horn 2007), založena na datech z následujících článků (Trigo a Lavelle 1993; Horn et al., 2003; Laverack 1963; Sampedro et al., 2006; Tillinghast et al., 2001; Trigo a Lavelle 1995; Barois a Lavelle, 1986).

Parametr	Střevo	Půda
Kyslík	0	koncentrace proměnlivá
Obsah vody (% čerstvé váhy)	40–90	≈20–40
pH	6,4–7,7	4,6–7,1
Celkový uhlík (C) (mg/g) suché váhy	80–110	20–40
Celkový dusík (N) (mg/g) suché váhy	11	2
C/N	7	10
Dusičnany (NO ₃ ⁻) (mM)	0.3	0.9
Dusitany (NO ₂ ⁻) (mM)	0,22	0,04
Amonný kation (NH ₄ ⁺) (mM)	0,5–20	0,05–0,09
Volně rozpustné aminokyseliny (μM)	410	10
Celkové rozpustné aminokyseliny (μM)	1280	17
Celkové mastné kyseliny (C ₁₂ -C ₂₄) (μmol/g) suché váhy	3,8	0,6
Glukóza (mM)	32 (až 137)	ND
Maltóza (mM)	3 (až 15)	ND
Formiát (mM)	4 (až 18)	ND
Acetát (mM)	3 (až 24)	ND
Laktát (mM)	1 (až 5)	ND
Sukcinát (mM)	1 (až 3)	ND

Na změny ve střevním mikrobiomu žížal má nejvíce vliv, jestli se jedná o žížalu epigeickou, endogeickou nebo aneickou, poté v jakém prostředí se nachází a o jaký druh se jedná (Thakuria et al., 2010).

Sapkota et al., (2020) určili zastoupení jednotlivých bakteriálních kmenů (phyllum) z obsahu střeva u žížal *A. caliginosa*, *Allolobophora chlorotica*, *A. tuberculata* a *Lumbricus herculeus*. Byly identifikovány Acidobacteria (nyní Acidobacteriota) (Oren a Garrity, 2021), Actinobacteria (nyní Actinomycetota), Bacteroidetes (nyní Bacteroidota), Chloroflexi (nyní Chloroflexota), Firmicutes (nyní Bacillota), Latescibacteria, Nitrospirae (nyní Nitrospirota), Patescibacteria, Proteobacteria (nyní Pseudomonadota), Rokubacteria, Tenericutes (nyní Mycoplasmatota) a Verrucomicrobia (nyní Verrucomicrobiota), z čehož byl pro žížalu *A. caliginosa* charakteristický kmen Acidobacteria a třída Alphaproteobacteria. Tikhonov et al., (2016) z trávicí tekutiny ze střeva žížaly *A. caliginosa* izolovali a namnožili 5 hlavních bakteriálních druhů, kterými byly *Aeromonas encheleia* (Proteobacteria, nyní Pseudomonadota), *Bacillus thuringiensis* (Bacillota), *Acinetobacter* sp. (Pseudomonadota), *Aeromonas* sp. (Pseudomonadota) a *Streptomyces* sp. (Actinomycetota). Následně zkoumali rozklad huminových

kyselin těmito bakteriemi s a bez střevní tekutiny žížal. Jediný *Acinetobacter* z počátku inkubace vykazovat zpomalený růst, ostatní druhy bakterií nikoliv. Ve střevě *A. caliginosa* se můžeme setkat s výše zmíněnými druhy bakterií rozkládajícími huminové kyseliny. Byzov *et al.*, (2009) izolovali ze střeva žížaly *A. caliginosa* následující kultivovatelné druhy *Aeromonas* sp., *Buttiauxella* sp., *Buttiauxella brennerae*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas proteolytica* (Gammaproteobacteria, Pseudomonadota). Dalšími byly *Delftia acidovorans* (Betaproteobacteria, Pseudomonadota), *Ochrobactrum grignonense* (Alphaproteobacteria, Pseudomonadota), *Bacillus circulans* (Bacillota), *Microbacterium paraoxydans*, *Streptomyces* sp. (Actinomycetota), *Chryseobacterium scophthalmum*, *Sphingobacteriaceae bacterium* (Bacteroidota).

Bakterie produkující N₂O byly u *A. caliginosa* nalezeny hlavně v obsahu střeva. V samotném střevním mikrobiomu se bakterie s disimilativní redukcí nitrátu a denitrifikační bakterie moc nevyskytují (Horn *et al.*, 2003; Ihssen *et al.*, 2003).

Bylo publikováno mnoho studií o ovlivnění mikrobiomu polutanty u žížal. Astaykina *et al.*, (2022) zkoumali vliv 3 pesticidů na střevní mikrobiom žížaly *L. rubelus*. Byly ovlivněny bakterie, které se účastní rozkladu organické hmoty, nitrifikace, denitrifikace a disimilace nitrátu. Může tak docházet k ovlivnění cyklu uhlíku a dusíku v půdě. Ovlivnění mikrobiomu může mít vliv na přežití a schopnost rozmnožování u žížal, jak zjistili Ding *et al.*, (2020), kteří vystavili žížalu *Enchytraeus crypticus* mikroplastům z automobilových pneumatik. Dále došlo k namnožení patogenních bakterií z čeledě *Enterobacteriaceae* a *Aeromonadaceae*, které byly spojeny se střevními záněty (Winter *et al.*, 2013; Takahashi *et al.*, 2014) a tím by dále mohlo docházet k šíření patogenních bakterií do půdy. Přestože existuje mnoho článků o vlivu různých druhů polutantů na střevní mikrobiom žížal (Zhao *et al.*, 2024b; Zhang *et al.*, 2023; Mirleau *et al.*, 2024; Chang *et al.*, 2021; Krishnaswamy *et al.*, 2021; XIA *et al.*, 2023; Zhu *et al.*, 2022), článků o vlivu mikroplastů na střevní mikrobiom je pouze několik (Lahive *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022; Xu a Yu 2021).

3 Metody a materiály

3.1 Materiály a roztoky

	CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE, MATERIÁLY	ZNAČKA/DODAVATEL	ZEMĚ PŮVODU
I Z O L A C E M I K R O P L A S T Ů	Aceton pro HPLC	VWR Chemicals	Francie
	Peroxid vodíku H ₂ O ₂ 30%	Lach:ner	ČR
	Sůl jedlá kamenná s jodem	K+S Czech Republic a.s., závod SOLNÉ MLÝNY	ČR
	Heptahydrát síranu železnatého	Lach:ner	ČR
	95% kyselina sírová	VWR Chemicals	Francie
	Písek na tryskání	Metal Project s.r.o.	ČR
	Mulčovací netkaná textilie	AGRO CS a.s.	ČR
	Celulózo nitrátové membránové filtry, 0,2um	Whatman	SNR
	0,2 um, 47 mm, polytetrafluorethylenové filtry	Sigma-Aldrich	Irsko
	Podložní sklíčka 76x52x1 mm	Marienfeld	SNR
	Krycí sklíčka 50x75 mm	Marienfeld	SNR
	Mechanické počítadlo	Heathrow Scientifics	Čína
	Mixér model 8011EG se dvěma rychlostmi	Waring	USA
	Čistička vzduchu Dyson Pure Cool TP00	Dyson Ltd	VB
	Membránová vývěva LABOPORT® N 86 KT.18	KNF	Francie
	Tablet a kamera, Moticom® BTU10	Motic	SNR
	Laboratorní pec, LE 15/11	LAC	ČR
	Pec	Memmert	SNR
	Optický mikroskop MBL 2100	Krüss	SNR
	Plynový chromatograf Varian 3400	Varian	USA
Hmotnostní spektrometr ITS40	Finnigen MAT	USA	
Lyofilizátor	Labio	ČR	
Pyrolyzátor	Labio	ČR	
Infračervený spektrometr s Fourierovou transformací Nicolet iN10	Thermo Fisher Scientific	USA	
I M B U Ň I K Y N Í	Guaiaacol Glyceril ether	Sigma-Aldrich	Taiwan
	Fosfátový pufr (PBS) bez vápníku a hořčíku	MP Biomedicals	USA
	Dihydrát sodné sůli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA)	Sigma-Aldrich	USA
	Počítací sklíčka	Buerker	SNR
	Baterie alkalická ETA PREMIUM 6V	Eta	ČR
	Baterie zinkouhlíková Varta Super Heavy Duty 4,5 V	Varta	ČR
	Centrifugační zkumavky 15 ml	Biofil	Španělsko
	Centrifuga Mikro 220R	Hettich®	SNR
	Optický mikroskop IM-3 s fázovým kontrastem	OPTIKA Italy	Itálie
P I T V A	OASIS® IDEAL Black, aranžovací hmota	OASIS	ČR
	Entomologické špendlíky 0,5/39 mm	Sphiinx	ČR
	Lékařské oční nůžky WESTCOTT pružinové	DIMEDA Instrumente GmbH	SNR
	Mattoni perlivá	Mattoni	ČR
I Z O L A C E D N A	Roztok fenolu	Sigma-Aldrich	USA
	Hexadecyltrimethylammonium bromid (CTAB)	Molekula	SNR
	Octan sodný trihydrát (NaAc)	Penta chemicals	ČR
	Tris-(hydroxymethyl) - aminomethan	Loba feinchemie	Rakousko
	n-Amylalkohol	Penta chemicals	ČR
	Chloroform	Penta chemicals	ČR
	Chlorid sodný	Sigma-Aldrich	USA
	Dodecylsírán sodný (SDS)	Carl ROTH	SNR
	Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	Lach:ner	ČR
	Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Penta chemicals	ČR
	Isopropanol	VWR Chemicals	Francie
	Homogenizační mikrozukavky, 2 mL	BIoplastics	Nizozemsko
	Víčka k homogenizačním mikrozukavkám	BIoplastics	Nizozemsko
	Skleněné kuličky 0,25 - 0,5 mm	Carl ROTH	SNR
Mikrocentrifugační zkumavky 1,5 ml	Biologix	ČR	
Nitrilové rukavice	VWR Chemicals	Malajsie	
Mikrocentrifuga Spectrafuge™ 24D	Labnet	USA	
P C R	Ultra H ₂ O	Top-Bio	ČR
	Hovězí sérový albumin (BSA)	GeneON	SNR
	Deoxy nukleosid trofosfát (dNTP)	Thermo Fisher Scientific	Litva
	Q5® High-Fidelity DNA Polymeráza	BioLabs	UK
	Q5® Reaction Buffer Pack	BioLabs	UK
	Q5® High GC Enhancer	BioLabs	UK
	Primery (515F, 806R)	Sigma-Aldrich	USA
	NanoDrop ND-1000 Spektrofotometr	MGP	USA
	Zkumavkové stripy	Biologix	ČR
Termo cykler T100	BIO RAD	Singapur	

Q U I B T	MinElute PCR Purification Kit (50)	QIAGEN	SNR
	Qubit™ dsDNA Quantitation, Broad Range	Invitrogen	USA
SEKV	MiSeq	Illimuna	USA
M E T A B O L I T A R N Í C K Á	Methanol	Honeywell	USA
	Chloroform	Penta chemicals	ČR
	Acetonitril	Honeywell	SNR
	Octan amonný ≥99%, HiPerSolv CHROMANORM® for LC-MS	VWR Chemicals	UK
	Mravenčan amonný ≥99%, HiPerSolv CHROMANORM® for LC-MS	VWR Chemicals	UK
	Amonný roztok 20 - 22% HiPerSolv CHROMANORM® for LC-MS	VWR Chemicals	UK
	Kyselina mravenčí	Merck	ČR
	Kyselina trihydrogen fosforečná 99%	Merck	ČR
	Fluorid amonný	Honeywell	SNR
	InfinityLab Deactivator Additive	Agilent	USA
	Skleněné kuličky 0,3 mm	VWR Chemicals	ČR
	FastPrep-24™ 5G	MGP	Indie
	Concentrator 5310	Eppendorf	SNR
1260 Infinity II LC systém a 6546 LC/Q-TOF hmotnostní spektrometr s elektrosprejovou ionizací	Agilent	USA	

ROZTOKY			MOBILNÍ FÁZE		
5M NaCl	29,22 g	NaCl	100mM	3,15262 g	mravenčan amonný
	100 ml	ddH ₂ O	mravenčan	500 ml	ultra čistá voda
3M NaAc, pH5	40,8 g	NaAc	100mM octan amonný, pH9	3,85870 g	octan amonný
	40 ml	ddH ₂ O		500 ml	ultra čistá voda
	pH	CH ₃ COOH		pH	NH ₄ OH
Chloroform/isoamyl alkohol (24:1)	2 ml	isoamylalkohol	Vodná fáze, měření v pozitivním módu, HILIC	100 ml	100mM mravenčan amonný
	48 ml	chloroform		900 ml	ultra čistá voda
70% EtOH	35 ml	EtOH	Vodná fáze, měření v negativním módu, C18	1 ml	kyselina mravenčí
	15 ml	dH ₂ O		100 ml	100mM octan amonný
10% CTAB v 0,7M NaCl	4,1 g	NaCl	Organická fáze, měření v pozitivním módu, HILIC	900 ml	ultra čistá voda
	50 ml	ddH ₂ O		0,5 ml	Deaktivační roztok
	10 g	CTAB		100 ml	100mM mravenčan amonný
	do 100 ml	ddH ₂ O		900 ml	ACN
1M Tris-HCl, pH8	78,8 g	Tris-HCl	Organická fáze, měření v negativním módu, C18	1 ml	kyselina mravenčí
	450 ml	ddH ₂ O		100 ml	100mM octan amonný
	pH	HCl		900 ml	ACN
	do 500 ml	ddH ₂ O		0,5 ml	pasiv
Extrakční pufr 50mM NaH ₂ PO ₄ , pH8; 50mM NaCl; 500mM Tris-HCl; 5% SDS	10 g	SDS	Pasiv	450 ml	ACN
	2 ml	5M NaCl		50 ml	ultra čistá voda
	100 ml	1M Tris-HCl, pH8		2,5 ml	H ₃ PO ₄
	1,5601 g	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O		18 ml	ACN
	do 200 ml	ddH ₂ O		12 ml	ultra čistá voda
5M NaCl_MTEX	292,2 g	NaCl	60% MeOH	18 ml	MeOH
	1000 ml	dH ₂ O		12 ml	ultra čistá voda
Fentonův roztok	15 g	FeSO ₄ ·7H ₂ O	MeOH:ultra čistá voda	15 ml	MeOH
	1000 ml	dH ₂ O		15 ml	ultra čistá voda
	6 ml	96% H ₂ SO ₄		3,7037 g	NH ₄ F
PBS (3:2)	5 ks	tablety PBS	1M NH ₄ F	100 ml	ultra čistá voda
	830 ml	kláv. ultra čistá voda		2 l	MeOH
Extrakční pufr	2,50 g	GGE	MeOH + NH ₄ F	1 ml	NH ₄ F
	0,39 g	EDTA		1 l	ultra čistá voda
	150 ml	PBS (3:2)		0,5 ml	NH ₄ F

3.2 Metody

3.2.1 Příprava mikroplastů a analýza hmotnosti mikrovláken

Typ plastu, ze kterého je vyrobena textilie používaná v této práci, je PP. Při zpracování textilie na mikroplasty byl omezen kontakt textilie s jakýmkoliv jinými plastovými laboratorními pomůckami. MTEX byla v laboratoři na podkladu z hliníkové fólie nůžkami nastříhána na částechky zhruba o velikosti 5 x 5 mm (viz. Obrázek 4).



Obrázek 4 Fotografie postupu ručního stříhání mulčovací textilie na částechky zhruba o velikosti 5 x 5 mm, foto: autor.

Pro zpracování textilie o velikosti 5 x 5 mm na vlákna byl použit mixér. Navážka částic o velikosti 5 x 5 mm činila maximálně 2 gramy. Navážka byla vložena do mixéru a byla homogenizována ve směsi ethanolu (EtOH) s destilovanou vodou (dH₂O) v poměru 1:1. Vzniklý shluk vláken byl z mixéru převeden do 1000ml skleněné kádinky a postříhán nůžkami na menší shluky vláken. Tyto menší shluky vláken byly opět převedeny zpět do mixéru a homogenizovány za účelem rozvolnění vláken.

Vzniklá směs vláken PP textilie v dH₂O a EtOH byla filtrována přes vakuovou filtrační aparaturu pomocí membránové vývěvy přes celulósový filtrační papír a řádně propláchnuta EtOH. Propláchnutá vlákna byla pomocí pinzety přenesena do zvážených 50ml šroubovacích vzorkovnic a zbylá vlákna na filtračním papíře spláchnuta do šroubovacích vzorkovnic pomocí EtOH. Tímto byl zmenšen objem kapaliny nutné k odpaření a k vysušení vláken. Vlákna ve šroubovacích vzorkovnicích se dosušovala pomocí dusíku a vyhřívané destičky. Suchá vlákna byla zvážena a uchována ve šroubovacích vzorkovnicích.

Vyrobená vlákna byla zkoumána pod světelným mikroskopem a focena. Z fotografií byla pomocí programu ImageJ zjištěna průměrná délka a šířka mikroplastových vláken.

K určení hmotnosti PP z vlákna netkané MTEX byla použita pyrolýza spojená s plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií. Postup práce a nastavení stroje dle (Havlíčková, 2022). Výsledná spektra byla porovnána s již naměřenými spektry PP.

3.2.2 Izolace mikroplastových vláken z půd

S drobnými úpravami bylo postupováno dle (Pospíchalová, 2023). Celý postup byl proveden v laboratoři přizpůsobené na práci s mikroplasty z reálného prostředí.

Jedná se o laboratoř bez oken s kovovou pracovní deskou a náslapnou lepenkou umístěnou za vchodovými dveřmi, aby nedocházelo k přílišnému transportu prachu na botách do laboratoře. Dále se v laboratoři nachází čistička vzduchu, která byla v provozu po dobu práce v laboratoři. Po celou dobu bylo pracováno v bílém bavlněném oblečení. Všechno skleněné nádobí, aparatury, laboratorní nástroje jako lžičky a pinzety, ale i hliníková fólie byly před použitím umyty acetonem pro HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl. high-performance liquid chromatography) ve skle za účelem zbavení se potenciálně přítomných mikroplastů. Všechny roztoky, vyjma 30% peroxidu vodíku (H_2O_2) s nimiž se v laboratoři pracovalo, byly nejméně 3x (roztok chloridu sodného - NaCl 5x) filtrovány přes celulózo-nitrátový filtr za účelem snížení výskytu mikroplastových částic a vláken v roztocích.

Pro izolaci MTEX vláken z půd byly poskytnuty 500g vzorky půd vystavených černé PP MTEX ze soukromé zahrady (viz. Tabulka 3). Jako negativní kontrola zde byl použit očištěný písek na tryskání. Postup čištění písku viz. Tabulka 4, str.26.

Tabulka 3 Názvy a popisy jednotlivých vzorků půd vystavených a nevystavených mulčovací textilii (MTEX).

Název vzorku	Popis vzorku půdy
1 ROK	vzorek půdy ze hnojeného záhonu; došlo zde k degradaci a rozpadu MTEX na kusy
12-13 LET	vzorek půdy pod keři; MTEX zde ležela 12-13 let
8-9 LET	vzorek půdy pod keři; MTEX zde ležela 8-9 let
Trávník	vzorek půdy pod travnatým porostem; půda zde nebyla přímo vystavena MTEX

Tabulka 4 Postup čištění písku na tryskání použitý v této práci jako negativní kontrola při extrakci mikroplastů z půdy.

Postup čištění písku: (skleněné kádinky)	Počet kroků	Čas (min)
1) promýt v kohoutkové vodě	8x	–
2) promýt v dH ₂ O	3x	–
ULTRAZVUK	–	15
3) promýt v EtOH na mytí	3 - 4x	–
ULTRAZVUK	–	15
4) promýt čistým EtOH	3 - 4x	–
5) promýt čistým acetonem	3 - 4x	–
ULTRAZVUK	–	15
6) vyschnout v digestoři	–	přes noc
7) promýt v kys. dusičné HNO ₃	1x	–
ULTRAZVUK	–	30
8) vypláchnout vodou	5x	–
9) vypláchnout dH ₂ O	1x	–
10) promýt čistým acetonem	4x	–
ULTRAZVUK	–	15
11) nechat vyschnout v digestoři	–	přes noc

3.2.2.1 Homogenizace půd

Vzorky půd byly lyofilizovány a poté homogenizovány. Nejdříve byla půda dána mezi 2 filtrační papíry a za pomoci palice rozbita na menší částice. Následně byla půda rozemleta v třecí misce a přeseta přes síto s velikostí ok 1 mm.

3.2.2.2 Digesce

Byl připraven Fentonův roztok rozpuštěním 15 gramů heptahydrátu síranu železnatého (FeSO₄ · 7H₂O) v 1000 ml dH₂O a přidáním 6 ml 96% kyseliny sírové (H₂SO₄). Následně byl Fentonův roztok 3x přefiltrován přes celulózo nitrátové filtry.

Do 100ml Erlenmeyerových baněk, které byly po celou dobu překryty hliníkovou fólií, bylo vždy naváženo 10 gramů půdy (Blank-písek, 1 rok, 12-13 let, 8-9 let, trávník). Bylo vždy pracováno se 4 vzorky od 1 půdy a s 1 pozitivním vzorkem, kam byly přidány vždy dva menší shluky vyrobených mikroplastových vláken MTEX za účelem ověření funkčnosti metody. Celkem bylo 24 vzorků půd navážených v Erlenmeyerových baňkách.

Ke každému vzorku bylo pomocí skleněné pipety přidáno 30 ml Fentonova činidla a dále opatrně po 5 ml byl přidáván 30% H₂O₂ tak, aby nedocházelo k přílišnému přehřívání či vykypění vzorku a tím ke ztrátě nebo degradování mikroplastových vláken (Hu *et al.*, 2022). Po přidání celého objemu 30 ml 30% H₂O₂ byly baňky se vzorky dány do pece předehřáté na 60°C na 24 hodin. Po 24 hodinách, kdy byl veškerý H₂O₂ přeměněn na vodu, byla digesce ukončena.

3.2.2.3 Flotace

Byl připraven 5M roztok NaCl přidáním 233,6 g NaCl do 800 ml dH₂O. NaCl byl žíhán v laboratorní peci v třecí misce na 600 °C po dobu 4 hodin za účelem degradovat potenciálně přítomné mikroplasty.

Do baněk se vzorky půd a se vzniklou vodou o objemu 60 ml byl přidán vypálený NaCl o hmotnosti 17,5 g tak, aby vznikl roztok o koncentraci 5 M. Poté byly baňky se vzorky dolity 5M roztokem NaCl cca 1 cm pod okraj, překryty parafilmem a hliníkovou fólií. Takto uzavřenými baňkami bylo řádně zatřepáno tak, aby se promíchal celý objem. Následně se nechala proběhnout flotace po dobu 7 dní.

Po ukončení flotace byl roztok NaCl s flotovanými částicemi filtrován pomocí vakuové filtrační aparatury přes polytetrafluorethylenové filtry. Byla filtrována většina objemu roztoku NaCl tak, aby nedošlo ke kontaminaci usazenou zeminou na dně Erlenmeyerovy baňky. Filtry s flotovanými částicemi byly 3x promyty dH₂O a následně EtOH, aby došlo ke smytí částic z nálevky filtrační aparatury. Filtr s částicemi byl následně přendán na podložní sklíčko a překryt krycím sklíčkem. Krycí a podložní sklíčko k sobě byly přilepeny lepicí páskou a vzorek uchován pro pozdější analýzu.

3.2.2.4 Detekce vláken

Filtrované vzorky půd na podložním sklíčku byly mikroskopovány pod světelným mikroskopem a za pomoci mechanického počítadla byla počítána vlákna MTEX. Následně byla ze vzorků náhodně vybrána vlákna a pomocí pinzety částečně přilepena na lepicí pásku. Lepicí páska s vlákny byla poté přilepena na podložní sklíčko hladce potažené hliníkovou fólií. Takový vzorek byl analyzován pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) a získané absorpční spektrum bylo porovnáno s absorpčním spektrem zakoupené černé netkané MTEX.

3.2.3 Sběr a určování žížal, sběr půdy

Žížaly byly sbírány v obci Velké Přílepy (50.1571011N, 14.3127675E; 50.1569397N, 14.3120758E; 50.1570150N, 14.3124622E) (viz Obrázek 5) ve dnech 31.7. 2023, 1.8. 2023 a 6.9.2023. Podmínky při kopání: 23 °C a 19 °C, zataženo, deštivo. Kopání bylo provedeno rýčem do hloubky 15-25 cm. Žížaly byly sbírány do sklenice s lokální půdou.

Na chov žížal a charakterizaci půdy bylo nasbíráno cca 8 kg půdy do plastových kyblíků ve stejné lokalitě. Opad byl nasbíráán do jednoho plastového kyblíku v téže lokalitě.

Žížaly byly určeny na základě morfologie za pomoci prof. Ing. Mgr. Jana Frouze, CSc. z Ústavu pro životní prostředí Přírodovědecké fakulty UK. Protože u žížal nebyla provedena sekvenace, bude v práci uváděno pouze jméno *Apporectodea* sp. Dále ovšem budou citovány i články zmiňující druh *A. caliginosa*, protože byl s určitou pravděpodobností nasbíráán a použit do experimentu hlavně tento druh.



Obrázek 5 Fotografie ze sběru žížal v obci Velké Přílepy, foto: autor.

3.2.4 Charakterizace chovné půdy

Analýza půd byla provedena standardizovanými metodami v laboratoři Výzkumného ústavu meliorací a ochrany půdy, v.v.i. (VÚMOP) a v Laboratoři environmentální chemie a analýzy půd na Ústavu pro životní prostředí (LECHAP).

Dále bylo určeno WHC půdy (z angl. Water holding capacity, schopnost půdy zadržet vodu). Na Petriho misky bylo na předvážkách naváženo přibližně 50 g půdy. Půda byla sušena v peci při 60 °C po dobu 24 hodin. Další den byla půda zvážena pro stanovení WHC a objemu vody v půdě. Vysušená půda byla vsypána do nálevky s filtračním papírem. Do nálevky bylo převedeno 50 ml ultra čisté vody a ponecháno 1 hodinu stát. Po 1 hodině bylo na odměrném válci odečten objem proteklé vody.

Hodnota WHC byla počítána pomocí vzorce:
$$\frac{\text{objem proteklé vody} \cdot 100}{(\text{navážka půdy} - \text{objem proteklé vody})}$$

3.2.5 Experimentální design

Experiment byl založen 2.8. 2023 (na 14 a 28 dní) a 7.9. 2023 (na 56 dní). Půda byla navlhčena tak, aby vlhkost půdy byla 25 % (Eriksen-Hamel a Whalen, 2007; Butt *et al.*, 2020). Sebrané žížaly byly ten samý den převezeny do laboratoře a po jedné zváženy na předvážkách. Pro získání vzorků S0 (střeva v čase 0) a H0 (obsah ze střev v čase 0), bylo 10 žížal přímo vypitváno. Do zavařovacích sklenic o objemu 4 l byla navážena půda tak, aby výška půdy ve sklenicích byla aspoň 15 cm. Sklenice byly označeny NC

(negativní kontrola bez mikroplastů), c1 (vysoká koncentrace mikroplastů) a c2 (nižší koncentrace mikroplastů). Do sklenic byly vypuštěny žížaly a přidán opad a do sklenic c1 a c2 v opadu zamíchána mikroplastová vlákna. Jednotlivé navážky půdy, počet žížal vypuštěných do jednotlivých sklenic a navážky mikroplastových textilních vláken jsou uvedeny v Tabulce 5. Hrdla takto připravených sklenic s žížalami byla přetažena silonovou punčochou, upevněna gumičkou a sklenice byly umístěny do chladničky nastavené na 15 °C (Bart *et al.*, 2019; Bart *et al.*, 2020; Butt *et al.*, 2020; Holmstrup, 2001) viz. Obrázek 6. Vlhčení půdy bylo prováděno 1x za 14 dní 15 ml dH₂O. Ze sklenic byly postupně odebrány žížaly na pitvu. Během 56denního experimentu byly odebrány vzorky chovné půdy v časech 14, 42 a 56 dní.



Obrázek 6 Fotografie 3 chovných sklenic v inkubátoru (15 °C) se zeminou, opadem s a bez mikroplastů a žížalami v čase 0 dní, foto: autor.

Tabulka 5 Nastavení experimentu s navážkami mikroplastů odpovídajícím hmotnosti čerstvé půdy ve sklenicích. (NC negativní kontrola; c1 koncentrace mikrovláken z mulčovací textilie (MTEX) 1 mg/kg; c2 koncentrace MTEX mikrovláken 0,0265 mg/kg).

Prefix vzorku	Čas experimentu (dny)	Váha půdy ve sklenici (g)	Navážka MTEX (g)	Počet žížal ve sklenici (ks)
NC	14	1953,090	–	24
	28			
	56	1956,000	–	16
c1	14	1954,110	1,9565	24
	28			
	56	1954,200	1,9564	17
c2	14	1956,520	0,0519	24
	28			
	56	1956,000	0,0518	17

3.2.6 Pitva žížal

Pitevní destičky byly vyrobeny z aranžovací hmoty napuštěné vodou a omotané parafilmem. Takto připravené destičky byly uloženy do mrazáku. Veškeré nástroje použité na pitvu byly dezinfikovány EtOH.

Žížaly byly umyty v dH₂O a jednotlivě zváženy na předvážkách. Naměřené hodnoty hmotností žížal po experimentu byly porovnány s hmotnostmi žížal před experimentem pomocí statistického testu jednocestná ANOVA v programu Origin 2019b.

Žížaly byly postupně vloženy do perlivé vody za účelem jejich uspní. Poté byly položeny na studenou pitevní destičku na hřbet. Žížala byla na destičku upevněna pomocí entomologických špendlíků v hlavové a ocasní části. Pomocí nůžek byla žížala nastříhnuta v místě pod opaskem a dále podélně otevřena pro zpřístupnění celých střev. Pokožka se svalovinou byly pomocí entomologických špendlíků uchyceny tak, aby nepřekážely při dalších úkonech. Následně bylo pomocí nůžek otevřeno samotné střevo. Ze střeva byla do homogenizační mikrozkuřavky odebrána půda a uchována na ledu. Po odebrání půdy ze střeva byla žížala opláchnuta dH₂O, aby došlo k vymytí zbytků půdy ze střev. Dále byla odebrána střeva, vložena do další homogenizační mikrozkuřavky a uchována na ledu. Zbytek žížaly byl vložena do další mikrocentrifugační zkuřavky a též uchován na ledu.

Střeva, stejně jako obsah ze střev z 10 pitvaných žížal vystavených stejnému typu podmínek (koncentrace mikrovláken, čas expozice) byla spojena do 1 homogenizační mikrozkuřavky. Těla žížal vystavených stejnému typu podmínek na analýzu metabolomu byla po 2 uchována v mikrocentrifugačních zkuřavkách. Po pitvě byly vzorky uchovány při teplotě -80 °C.

3.2.7 Analýza bakteriálního mikrobiomu

3.2.7.1 Izolace DNA

Izolace byla provedena dle protokolu (Stach *et al.*, 2006). Vzorky byly zpracovány v digestoři za použití nitrilových rukavic. Do homogenizačních mikrozkuřavek bylo převedeno 300 µl extrakčního pufru, 75 µl fenolu a 75 µl směsi chloroform/ isoamyl alkohol (24:1). Směs byla promíchána pomocí vortexu a homogenizována pomocí přístroje FastPrep-24™ 5G (5,0 m/sec; 20 sec). Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 3 min při 10 000 g (tíhové zrychlení). Supernatant byl odebrán do nových mikrocentrifugačních zkuřavek. Byl přidán fenol a směs chloroform/isoamyl alkohol v množství ekvivalentu 1/2 objemu odebraného supernatantu. Směs byla promíchána na vortexu a centrifugována při 6000 rpm (otáčky za minutu, z angl. revolutions per minute) po dobu 5 minut. Opět byl odebrán supernatant do nových mikrocentrifugačních zkuřavek a přidán fenol a chloroform/isoamyl alkohol v množství ekvivalentu objemu odebraného supernatantu. Směs byla promíchána na vortexu a centrifugována při 6000 rpm po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl supernatant odebrán do nových mikrocentrifugačních zkuřavek a byl přidán 5M NaCl o objemu 1/3 ekvivalentu objemu odebraného

supernatantu. Dále bylo přidáno 10% CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid) v množství 1/10 ekvivalentu objemu odebraného supernatantu. Směs byla promíchána na vortexu a inkubována při teplotě 65 °C po dobu 30 min. Vzorky poté vychladly na laboratorní teplotu. Následně byl ke vzorkům přidán chloroform/isoamyl alkohol v množství ekvivalentu objemu supernatantu, 5M NaCl a 10% CTAB. Vzorky byly promíchány na vortexu a centrifugovány při 4500 rpm po dobu 20 min. Supernatant byl převeden do nových mikrocentrifugačních zkumavek. Dále byl k supernatantu přidán isopropanol v množství 3/5 ekvivalentu objemu odebraného supernatantu a 3M octan sodný v množství 1/10 ekvivalentu objemu odebraného supernatantu. Vzorky byly velmi pomalu 5x ručně převráceny dnem vzhůru za účelem promíchání a byly ponechány v mrazáku do dalšího dne. Následující den byly vzorky vyndány a při laboratorní teplotě centrifugovány při 10 000 rpm po dobu 20 minut. Supernatant byl odstraněn a zbylá peleta v mikrocentrifugačních zkumavkách sušena při teplotě 65 °C. Následně byla peleta uchována v 50 µl ultra čisté vody bez enzymů degradujících DNA (deoxyribonukleová kyselina) a ribonukleovou kyselinu při teplotě -20 °C.

Koncentrace získané DNA byla měřena pomocí Nanodropu a vzorky dle potřeby ředěny na koncentrace DNA pohybující se v rozmezí 40-120 ng/µl.

3.2.7.2 Polymerázová řetězcová reakce (PCR)

Metoda je založena na namnožení zájmových vláken DNA principem replikace DNA pomocí primerů kompatibilních s danou sekvencí. Byly použity primery rozeznávající region V4 16S rRNA. Forward primer 515F (5'→3'): GTGCCAGCMGCCGCGGTAA a reverse primer 806R (5'→3'): GGACTACHVGGGTWTCTAAT (Caporaso *et al.*, 2011).

Před samotnou prací v boxu byly pipety v boxu očištěny EtOH a samotný box byl sterilizován UV světlem po dobu 20 minut. Autoklávem sterilizované zkumavkové stripy byly umístěny do vymraženého stojánku. Primery byly na centrifuze krátce stočeny a do každé mikrozkumavky byly převedeny 2 µl daných primerů. Dále byly pomocí vortexu promíchány vzorky izolované DNA. Z 1 vzorku bylo převedeno po 1 µl do 3 mikrozkumavek ve stripu. Byl vytvořen tzv. „master mix“ skládající se z Q5 reakčního pufru (5 µl/vzorek), nukleotidů (0,5 µl/vzorek), BSA (hovězí sérový albumin) (1,5 µl/vzorek), Q5 Enhanceru (5 µl/vzorek) a ultra čisté vody (9,75 µl/vzorek) bez enzymů degradujících DNA a ribonukleovou kyselinu. Bylo vždy převedeno 22 µl master mixu do jednotlivých mikrozkumavek ve stripu, PCR probíhala v 25 µl. Vzorky byly krátce centrifugovány za účelem spojení reagentů na dně zkumavkových stripů. Vzorky byly vloženy do termo cyklieru, nastavení viz. Tabulka 6, str 32.

Tabulka 6 Tabulka s nastavením termo cyklu pro polymerázovou řetězcovou reakci (PCR).

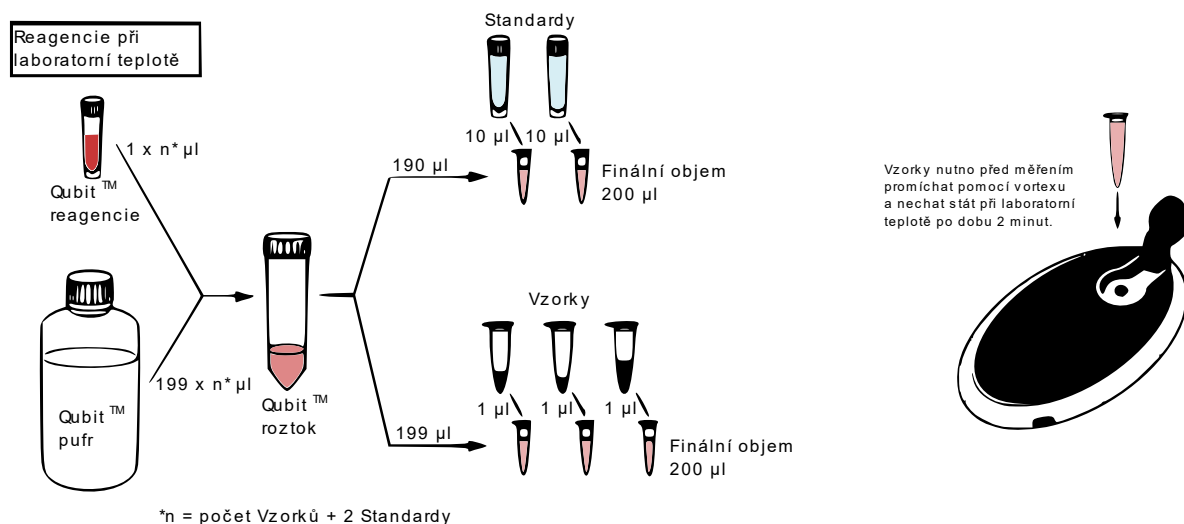
Nastavení PCR termo cyklu			
Kroky	Teplota (°C)	Čas (s)	Opakování
1	94	240	–
2 Denaturace	94	45	25
3 Nasedání primerů	50	60	
4 Syntéza	72	75	
5	72	600	–
6	4	∞	–

3.2.7.3 Přečištění vzorků

Přečištění vzorků po PCR bylo provedeno pomocí MinElute PCR Purification Kit. Vzniklé 3 paralely jednoho vzorku ze zkumavkových stripů byly spojeny dohromady nanesením na kolony MiniElute Spin Columns z MinElute PCR Purification Kit, dále jen kolon. Poté byl do kolon převeden objem PB pufru odpovídající 5násobku objemu vzorku DNA. Vzorky byly centrifugovány při 13 300 rpm po dobu 1 minuty. Po centrifugování byl odstraněn eluent a do kolon bylo převedeno 750 µl PE pufru. Vzorky byly za stejných podmínek znovu centrifugovány, eluent odstraněn a vzorky znovu centrifugovány. Kolony byly umístěny do nových autoklávem sterilizovaných mikrozkuvek a bylo do nich převedeno 10 µl PCR ultra čisté vody bez enzymů degradujících DNA a ribonukleovou kyselinu. Takto byly kolony ponechány 1 minutu stát a následně byly centrifugovány za totožného nastavení centrifugy. Kolony byly odstraněny a eluent byl uchován při teplotě -20 °C.

3.2.7.4 Qubit

Při barvení vzorků na měření koncentrace DNA pomocí Qubit byl použit Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kit, Broad Range (široká škála) a bylo postupováno dle schématu viz Obrázek 7, str. 33.



Obrázek 7 Schéma práce při barvení vzorků izolované DNA pomocí Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kit, Broad Range (široká škála) pro zjištění koncentrace izolované DNA, schéma upraveno dle (Invitrogen 2010) v programu Inkscape

3.2.7.5 Sekvence a zpracování sekvenačních dat

Sekvence proběhla v Laboratoři environmentální mikrobiologie na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i. na přístroji MiSeq.

Sekvence technologií Illumina je tzv. sekvence pomocí syntézy. Před samotnou sekvenací dochází k připojení adaptorů a primerů na namnožené zájmové DNA sekvence. Následně dochází k homolognímu párování mezi oligonukleotidy na destičce přístroje a adaptory s primery sekvence. Dále probíhá namnožení sekvencí a odmytí přebytečných sekvencí tak, že na destičce zůstávají pouze připojená vlákna DNA s oligonukleotidy. Samotná sekvence začíná připojováním značených deoxyribonukleotidů (dNTP) a syntézou vlákna. Každé připojení dNTP emituje fluorescenční signál charakteristický pro daný dNTP (Illumina, 2010). Analýza sekvenačních dat proběhla v programu SEED 2 (Větrovský *et al.*, 2018; Větrovský a Baldrian, 2013). V prvním kroku byly spárovány párové konce ampliconů sekvencí, následně byly odstraněny sekvence s nízkým skóre kvality (PHRED <30) a sekvence s délkou menší než 238 páru bazí (bp, z angl. base pair) (odstranění sekvencí mitochondriálního či plastidového původu) a větší než 350 bp. V dalším kroku byly sekvence seskupeny podle barcode motivů a ze sekvence byly odstraněny primery s přilehlými sekvencemi indexu a sekvencemi kompatibilními s oligonukleotidy na sekvenační destičce. Následně byly sekvence seřazeny do klastrů (8 236), vymazány chimérické sekvence (40 741) a vybrány reprezentativní klastry sekvencí (mostabundant). Sekvence byly porovnány s BLAST databází (Zhang *et al.*, 2000) a výsledné tabulky byly exportovány do excelového souboru. V programu Excel byla vytvořena tabulka klastrů s počtem sekvencí v jednotlivých vzorcích. Následně byla vytvořena OTU tabulka (z angl. operational taxonomic unit, funkční taxonomická jednotka) s podobností sekvencí nad 97 %. Bylo vymazáno

37 klastřů bakteriálního druhu *Verminephrobacter aporrectodeae*, bakterie z metanefridií žížal, z celkového počtu klastřů 8236.

Dále byla vytvořena taxonomická tabulka klastřů zařazených do taxonomických jednotek (doména, kmen, třída, řád, čeleď, rod, druh) a tabulka se jmény vzorků lišící se proměnnými (koncentrace MTEX mikrovláken, čas). Tyto tabulky byly použity jako vstupní data do programu R s balíčky phyloseq, readxl, ggplot2, vegan, ggsignif a ggforce, kde byl na základě jednocestné analýzy ANOVA proveden TukeyHSD test pro vícenásobné srovnání bakteriální diverzity mezi skupinami.

Pro grafické zobrazení shlukování vzorků byla použita metoda analýzy hlavních souřadnic (PCoA, z angl. Principal Coordinates Analysis) s využitím odmocněné Bray-Curtisovy vzdálenosti mezi vzorky.

Diverzita byla hodnocena dle Shannon-Wienerova indexu (H) a byla počítána v programu excel dle vzorce: $H = -\sum p_i \times \ln(p_i)$, kde ln je přirozený logaritmus ($\approx 2,718$) a p_i je podíl jednoho OTU vůči celkovému součtu OTU. Pro statistické porovnání hodnot diverzit mezi vzorky (NC-c1 a NC-c2) byl použit Hutchesonův t-test pro dva indexy diverzity (Hutcheson, 1970). Hutchesonův t-test (t) byl počítán v programu Excel pomocí vzorce: $t = \frac{H_a - H_b}{\sqrt{(S_{H_a}^2 + S_{H_b}^2)}}$, kde H_a a H_b jsou porovnávané Shannon-Wienerovy

indexy diverzity a $S_{H_a}^2$ a $S_{H_b}^2$ jsou variance Shannon-Wienerových indexů počítaných dle vzorce:

$S_H^2 = \frac{\sum p_i \times (\ln p_i)^2 - (\sum p_i \ln p_i)^2}{N} + \frac{S-1}{2 \times N^2}$, kde N je počet OTU ve vzorku a S je součet všech OTU ve vzorku.

Dále byly vypočítány stupně volnosti dle vzorce: $d_f = \frac{(S_{H_a}^2 + S_{H_b}^2)^2}{\frac{(S_{H_a}^2)^2}{N_a} + \frac{(S_{H_b}^2)^2}{N_b}}$. Hodnota signifikance (p) byla

vypočítána pomocí funkce TDIST v programu excel.

Pro statistické porovnání hodnot diverzit mezi vzorky (0-14-28/42-56) byl použit vícenásobný Hutchesonův t-test. Test byl proveden v programu R pomocí balíčku ecolTest. Výsledkem byla matice p hodnot.

Graf s relativním zastoupením bakterií a tabulka s procentuálním zastoupením jednotlivých bakteriálních tříd ve vzorcích byly vytvořeny v programu R. Do grafu bylo zobrazeno 20 nejzastoupenějších bakteriálních tříd, další třídy byly zahrnuty do „ostatních“.

3.2.8 Extrakce žížalích imunitních buněk

Extrakce žížalích imunitních buněk byla postupně provedena pomocí 3 rozdílných metod. Žížaly jsou dorzálními póry v kontaktu s prostředím a do coelomové dutiny se mohou dostat bakterie z prostředí. V coelomové dutině jsou přítomny imunitní buňky, které jsou schopné cizorodé bakterie pohltit a následně jsou tyto buňky přes dorzální póry expedovány z žížalího těla ven (Cameron, 1932).

3.2.8.1 *Extrakce imunitních buněk extrakčním pufrem*

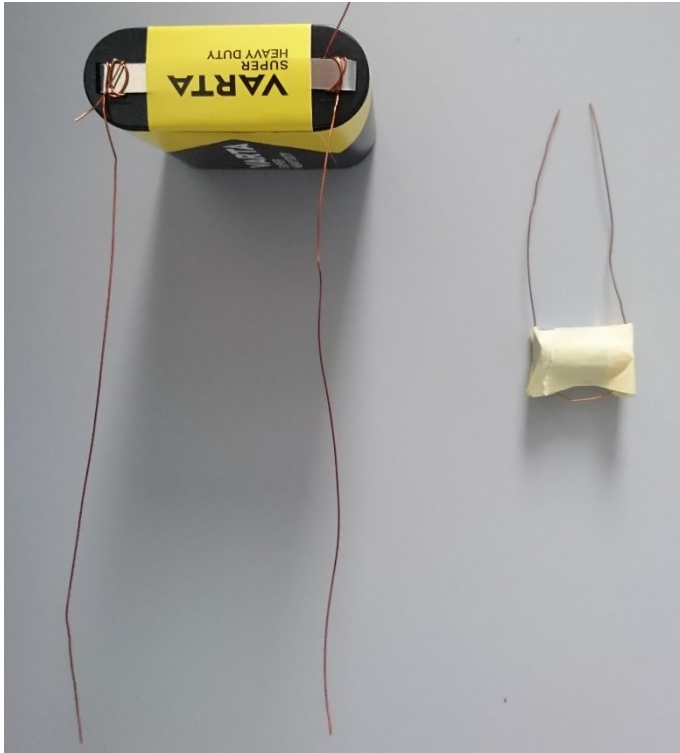
Při extrakci bylo postupováno dle (Navarro Pacheco *et al.*, 2021). Žížaly byly den před experimentem nechány při laboratorní teplotě na navlhčeném filtračním papíru defekovat. Další den byly žížaly po 6 kusech dány na 2 minuty do 15ml centrifugačních zkumavek s 6 ml extrakčního pufru (laboratorní teplota). Po 2 minutách byly žížaly vyjmuty a opláchnuty vodou. Vzorky byly přečištěny následujícím postupem. Centrifugační zkumavky s imunitními buňkami v extrakčním pufru byly centrifugovány při 150 g po dobu 10 minut při 4 °C. Poté byly centrifugační zkumavky s buňkami na ledu přeneseny do laminárního boxu a zde byl z centrifugačních zkumavek odstraněn supernatant a přidán 1 ml roztoku PBS (3:2) (z angl., Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr). S centrifugačními zkumavkami bylo lehce zamícháno, aby došlo k resuspendování buněk, ale ne k jejich poničení a byly opět centrifugovány (150 g, 10 minut, 4 °C). Tento postup byl ještě 1x zopakován. Po 3. centrifugaci byl supernatant odstraněn a do centrifugačních zkumavek přidáno 150 µl PBS, následně s nimi bylo lehce zamícháno, aby došlo k homogenizaci směsi. Vzorky byly prozkoumány pod mikroskopem za účelem určení množství vyextrahovaných buněk.

3.2.8.2 *Extrakce imunitních buněk Pasteurovou pipetou*

Žížaly byly 2 dny před experimentem nechány při laboratorní teplotě na navlhčeném filtračním papíru defekovat. Následně byly žížaly jednotlivě uspány v perlivé vodě a přeneseny na chlazenou destičku. Zde byly žížaly pomocí ukazováčku a prostředníčku nataženy do délky v oblasti opasku. Pod opasek byla zapíchnuta dlouhá Pasteurova pipeta ulomená do špičky a dále s ní bylo pohybováno pod kůží ve směru od hlavy k řitnímu otvoru. Pipeta se plnila coelomovou tekutinou. Bylo provedeno celkem 5 odběrů z 5 žížal. Buňky byly přečištěny pouze 1x. Tedy byly centrifugovány při 150 g, po dobu 10 minut při 4 °C a resuspendovány ve 150 µl PBS. Vzorky byly prozkoumány pod mikroskopem za účelem určení množství vyextrahovaných buněk.

3.2.8.3 Extrakce imunitních buněk elektrickým napětím

Na baterie o napětí 4,5 V a 6 V byly umístěny vodiče v podobě měděného drátku (viz. Obrázek 8), které byly ponořeny do Petriho misky s PBS a žížalou tak, aby byly pod hladinou roztoku a nedotýkaly se misky. Vodiče byly v roztoku ponořeny 1 minutu. Poté byla žížala z misky vyjmuta a roztok s buňkami převeden do centrifugačních zkumavek. Celkem bylo odebráno 5 vzorků. Celkem 3 žížaly byly vystaveny baterii o napětí 6 V a 2 žížaly baterii o napětí 4,5 V. Buňky byly přečištěny pouze 1x. Tedy byly centrifugovány při 150 g po dobu 10 minut při 4 °C a resuspendovány ve 150 μ l PBS. Vzorky byly prozkoumány pod mikroskopem za účelem určení množství vyextrahovaných buněk.



Obrázek 8 Baterie s vodiči použité při extrakci imunitních buněk z žížal o výkonu 4,5 V (vlevo) a 6 V (vpravo), foto: autor.

3.2.9 Mikroskopování imunitních buněk

Vzorky byly analyzovány na světelném mikroskopu. Ze vzorku bylo vždy odebráno 7,5 µl a mikroskopováno. Na počítacím sklíčku bylo náhodně vybráno 10 čtverců, ve kterých byly počítány buňky za pomoci mechanického počítadla. Následně bylo dle vzorců níže vypočítáno množství buněk v 1 ml (x) a hodnota objemu, ve kterém by se nacházelo 200 000 buněk (y) nutných na analýzu testu fagocytózy pomocí cytometru.

$$x = \frac{\text{množství buněk v deseti čtvercích} \cdot \text{objem mikroskopovaného vzorku } [\mu\text{l}]}{\text{počet čtverců (10)} \cdot 0,004}$$

$$y = \frac{10^5 \cdot 10^3}{x}$$

3.2.10 Necílená metabolická analýza

3.2.10.1 Homogenizace a extrakce

Žířaly bez střeva, uchované po pitvě v mrazáku při teplotě -80 °C (5 paralelních vzorků po 2 žířalách), byly homogenizovány v třecích miskách za pomoci tekutého dusíku. Se vzorky bylo pracováno na ledu. Od každého vzorku bylo na analytických vahách co nejpřesněji odváženo 100 mg do homogenizačních mikrozkušavek s homogenizačními kuličkami. K navážce bylo ihned přidáno 500 µl chlazeného chloroformu (CHCl₃) a následně 500 µl chlazeného roztoku methanolu (MeOH) a ultra čisté vody (1:1). Vzorky byly homogenizovány na stroji FastPrep-24™ 5G (5,0 m/sec; 20 sec). Následně byly homogenizované vzorky odstředěny na centrifuze (5000 rpm, 20 min, 4 °C). Došlo k oddělení dvou fází, horní polární a spodní nepolární. Obě fáze byly pipetou zvlášť rozděleny do mikrocentrifugačních zkumavek (cca 450 µl), odpařeny do sucha na vakuové odparce Concentrator 5301 a uchovány při teplotě -80 °C.

3.2.10.2 Příprava vzorků na měření

Vzorky na analýzu polárních metabolitů byly pomocí vortexu rozpuštěny ve 150 µl 60% roztoku acetonitrilu (ACN). Dále byly vzorky centrifugovány (5000 g, 10 min, 4 °C). Po centrifugaci bylo odebráno 130 µl supernatantu do vzorkovnic se šroubovacím uzávěrem s insertem. V odebraných vzorcích docházelo k samovolnému rozdělení kapaliny na spodní vzezřením olejovitou část a horní čirou frakci. Vzorky tak byly ponechány do dalšího dne při teplotě -20 °C pro lepší oddělení vzniklých částí. Následujícího dne bylo do nových insertů odebráno 50 µl horní čiré frakce vzorku a naředěno pomocí 50 µl 60% ACN. Z těchto naředěných vzorků byl připraven QC vzorek (z angl. quality control, kontrola kvality) odebráním a sloučením 5 µl z každého vzorku (výsledný objem 230 µl).

Vzorky na analýzu nepolárních metabolitů byly pomocí vortexu rozpuštěny ve 150 µl 60% roztoku MeOH. Následně byly vzorky centrifugovány (5000 g, 10 min, 4 °C). Po centrifugaci bylo odebráno 130 µl supernatantu do vzorkovnic se šroubovacím uzávěrem s insertem. Byl vytvořen

QC vzorek převedením 5 μ l z každého vzorku (výsledný objem 250 μ l) Vzorky o výsledném objemu 125 μ l byly nechány do druhého dne při teplotě -20 °C.

3.2.10.3 Analýza extrahovaných vzorků

Necílená metabolická analýza byla provedena na stroji 1260 Infinity II LC (kapalinová chromatografie, z angl. Liquid chromatography) s 6546 LC/Q-TOF (technologie kvadrupól doba letu, z angl. Quadrupole time-of-flight) hmotnostním spektrometrem s elektrosprejovou ionizací. V průběhu analýzy byly zaznamenávány ionty v rozsahu 50–1200 m/z. Vzorky byly měřeny v randomizovaném pořadí. QC vzorek byl nástřikován po každých 7 až 10 měřených vzorcích.

Pro analýzu polárních metabolitů byla použita kolona Poroshell 120, HILIC-Z 2,7 μ m chromatografie s hydrofilní interakcí (z angl. hydrophilic interaction chromatography), 2,1 x 150 mm od Agilentu. Nastavení stroje pro analýzu polárních metabolitů bylo následující. Jako mobilní fáze byly použity ultra čistá voda (A) a 90% ACN (B), obojí obohaceno o 10mM mravenčan amonný a 0,1% (v/v) kyselinu mravenčí. V pozitivním módu činil nástřik vzorku 5 μ l, rychlost toku mobilní fáze byla 0,25 ml/min, teplota kolony 25 °C a gradient eluce byl (min/% A): 0/0, 3/0, 13/95, 16/95, 18/0, 20/0. V negativním módu činil nástřik vzorku 5 μ l, rychlost toku mobilní fáze byla 0,25 ml/min, teplota kolony 50 °C a gradient eluce byl (min/% A): 0/0, 3/0, 13/50, 18/50, 20/0, 22/0. Jako mobilní fáze byly v tomto případě opět použity ultra čistá voda (A) a 90% ACN (B), tentokrát však byly obě obohaceny o 10mM octan amonný a 2,5 μ M deaktivční roztok. Pro analýzu nepolárních metabolitů byla použita kolona Acclaim RSLC 120 C18, 2,2 μ m, 120A, 2,1 x 150 mm od ThermoFisher. Jako mobilní fáze byly použity ultra čistá voda (A) a MeOH (B), vodná i organická fáze obsahovaly aditivum fluorid amonný o koncentraci 500 μ M. Nastavení stroje pro analýzu nepolárních metabolitů bylo následující. Nástřik vzorku činil 5 μ l, rychlost toku mobilní fáze byla 0,4 ml/min, teplota kolony 40 °C a gradient eluce byl (min/% A): 0/95, 1/95, 10/0, 23/0, 25/95 a 27/95.

Mobilní fáze a aditiva byly připravovány z chemikálií v LC-MS kvalitě (kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, z angl. liquid chromatography–mass spectrometry).

3.2.10.4 Zpracování dat

Pomocí softwaru MassHunter Profinder 10.0 (Agilent) byly vyhledány znaky (peaky), jejichž intenzita byla větší než 2000 jednotek dopadu iontů (z angl. counts) a byly přítomné alespoň v 1 skupině vzorků v alespoň 3 z 5 paralelních vzorků. Znaky byly následně statisticky zpracovány pomocí softwaru Mass Profiler Profesional (MPP) (Agilent). Byla provedena jednocestná ANOVA (hodnota p <0,05) a dále byla data filtrována dle velikosti změny oproti NC, zde byla jako hranice stanovena míra velikosti změny, z angl. fold change (FCH) > 2.

4 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo určit, zda a jaký vliv mají mikroplasty na imunitní systém, metabolom a na střevní mikrobiom žížal *Apporectodea* sp. Dalším cílem bylo zjistit, zda se v půdě nacházejí mikroplasty z černé netkané PP MTEX a určit jejich koncentraci.

Hypotézy byly následující:

Mikroplasty mají vliv na fagocytózu imunitních buněk žížal.

Mikroplasty způsobují změny v žížalím metabolomu.

Mikroplasty způsobují změny v relativním zastoupení bakterií ve střevě žížal a snižují jejich diverzitu.

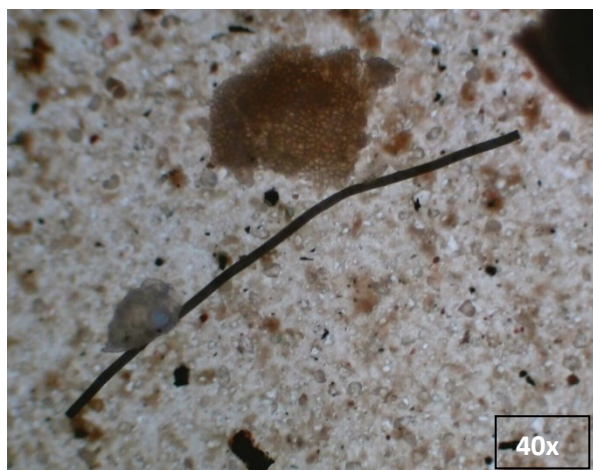
Do půdy zakryté netkanou MTEX se z této textilie uvolňují plastová mikrovlákná.

5 Výsledky

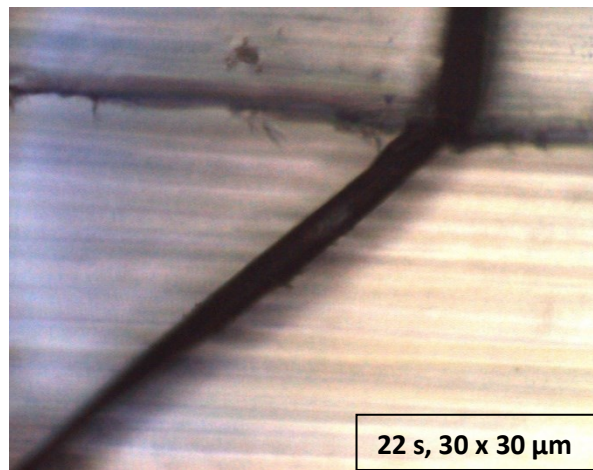
5.1 Příprava a charakterizace mikroplastů

Celkem bylo připraveno 22,84 g mikroplastů. Na průměrnou navážku textilie 1,27 g činila ztráta mikroplastů při zpracování textilie průměrně 0,05 g. Průměrná délka mikroplastů z MTEX byla 890 μm a průměrná šířka 24 μm , minimální zjištěná délka byla 141 μm a maximální 4811 μm . Fotku vlákna ze světelného mikroskopu zobrazuje Obrázek 9 a fotka vlákna ze FTIR, expozice 22 s, focná plocha 30 x 30 μm je zobrazena na Obrázku 10.

Průměrná hmotnost vlákna byla 4,5 μg .



Obrázek 9 Fotka vlákna z mulčovací textilie ze světelného mikroskopu, zvětšeno 40x, foto: autor.



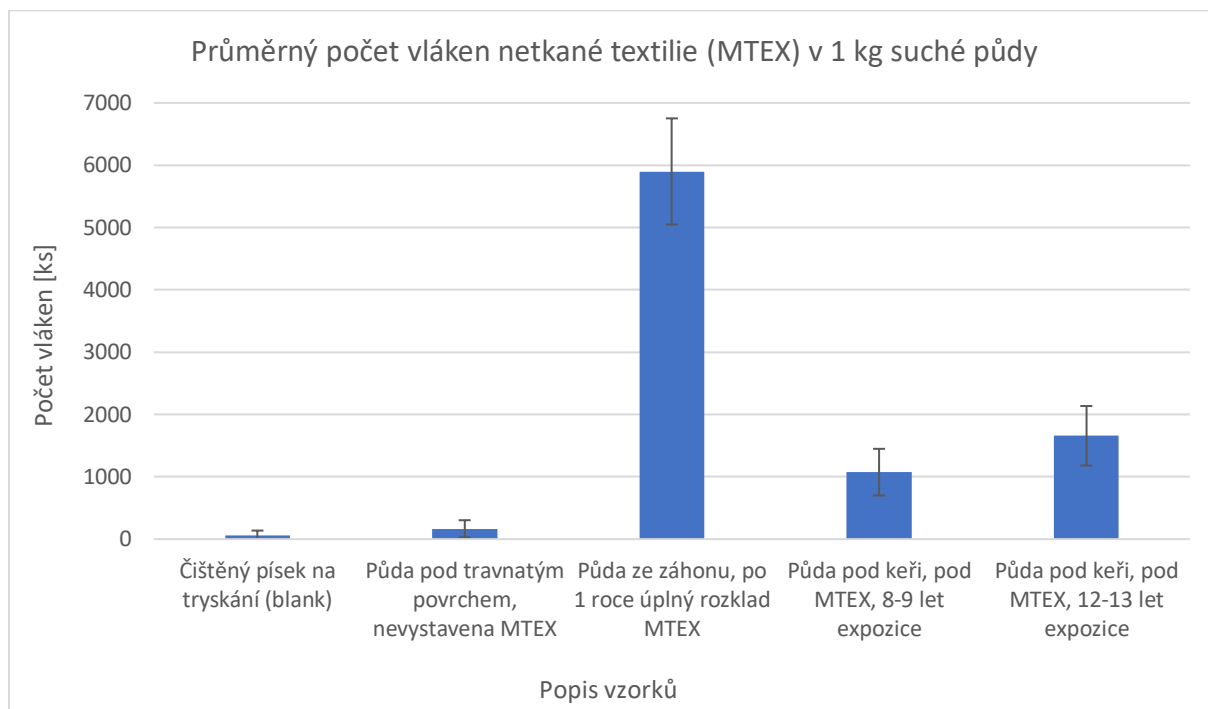
Obrázek 10 Fotka vlákna mulčovací textilie z infračerveného spektrometru s Fourierovou transformací. Expozice 22 s, focná plocha 30x30 μm , foto: Mgr. Kamila Šrédlová, PhD.

5.2 Izolace mikroplastových vláken z půdy a pyrolýza

Ve vzorcích půdy ze soukromé zahrady vystavené a nevystavené netkané MTEX byl stanoven počet mikroplastových vláken. V 1 kg vzorku blanku bylo průměrně nalezeno 53 kusů vláken. V 1 kg suché půdy pod travnatým povrchem bylo nalezeno průměrně 167 kusů vláken mikroplastů. V 1 kg suché půdy ze záhonu, který byl pokryt textilií po celý 1 rok a došlo zde k rozpadu textilie, byl průměrný počet nalezených vláken 5900 kusů. V 1 kg suchých půd pod keři, kde textilie leží 8-9 a 12-13 let, byl průměrný počet nalezených vláken 1075 kusů a 1658 kusů (viz. Obrázek 11, str.40). V pozitivním vzorku z půdy pod travnatým povrchem bylo nalezeno průměrně 2958 vláken na 1 kg suché půdy. V pozitivním vzorku z půdy ze zahrady, kde byla MTEX po 1 rok, bylo nalezeno průměrně 6333 vláken na 1 kg suché půdy. V pozitivním vzorku z půdy pod keři, kde byla MTEX 8-9 let bylo nalezeno průměrně 3750 a v půdě pod keři, kde byla MTEX 12-13 let bylo nalezeno průměrně 1658 vláken na 1 kg suché půdy. Metoda extrakce MTEX mikrovláken z půdy tedy tímto byla ověřena.

Jako environmentálně relevantní koncentrace mikroplastových vláken byla zvolena koncentrace odpovídající koncentraci vláken nalezených v půdě ze záhonu po 1 roce. Počet vláken

ve 120 gramech takové půdy byl 708 kusů. Hmotnost vláken přidávaných na 1 kg půdy činila 0,02655 g. Přesné navážky půd a textilních vláken do experimentů viz. Tabulka 5, str.29.



Obrázek 11 Počet vláken mikroplastů z netkané MTEX nalezených ve vzorcích půdy vystavené a nevystavené MTEX.

5.3 Sběr a určování žížal

Sběr byl proveden na 3 místech o rozloze cca 7 metrů krát 2 metry do hloubky 20 cm. Množství překopané zeminy na 1 místě činilo zhruba 2,8 m³. Celkově bylo jen do pokusů nasbíráno 131 žížal. Žížaly byly dle morfologie určeny jako *Apporectodea* sp.

5.4 Charakterizace půdy

Výsledky charakterizace půd získané standardizovanými metodami jsou shrnuty v Tabulce 7. Elektrická vodivost půdy udává míru salinity půdy. Pokud se vodivost pohybuje do 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, jedná se o půdu nezasolenou, s nízkým obsahem iontů (Gartner *et al.*, 1999). Bylo určeno procento oxidovatelného uhlíku (Cox) přítomného v půdě, celkový organický uhlík (TOC, z angl. total organic carbon). Dále byl určen amoniakální dusík (N-NH_4^+), dusičnanový dusík (N-NO_3^-) a procentuální zastoupení uhlíku (C) a dusíku (N) a jejich poměr v půdě a další zastoupení prvků.

Tabulka 7 Tabulka parametrů určených při charakterizaci chovné půdy. Koncentrace uvedené v jednotkách mg/kg jsou v kg suché půdy až na akt. N-NH_4^+ a akt. N-NO_3^- , kde jsou hodnoty udány v mg na kg čerstvé půdy.

CHARAKTERIZACE CHOVNÉ PŮDY							
vodivost ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH(aq)	Cox (%)	sušina (%)	humus (%)	TOC (ppm)	hlína (%)	
380,5	6,8	5,07	79,18	8,72	64,5	18	
jíl (%)	písek (%)	akt. N-NH_4^+ (mg/kg)	akt. N-NO_3^- (mg/kg)	C/N	C (%)	N (%)	
68	14	1,30	112,95	10,8	6,5	0,6	
P (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Al (mg/kg)	K (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Ca (mg/kg)	
51,6	49,0	88,1	194,0	489,6	322,1	6495,2	
Na (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Cr (mg/kg)	As (mg/kg)	Zn (mg/kg)
23,3	0,2	11,1	7,1	1,7	0,1	0,8	10,7

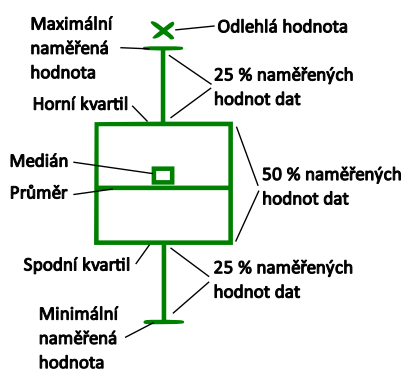
Hodnoty naměřených WHC chovné půdy před a po experimentu jsou zobrazeny v Tabulce 8. Průměrné hodnoty WHC se pohybovaly v rozmezí 34–48 %. Průměrná vlhkost chovné půdy před a po experimentu tak činila 24 %.

Tabulka 8 Tabulka s průměrnými hodnotami WHC (z angl. water holding capacity) v čase 0 a 28 dní (pokus 1 od 2.8. 2023) a v čase 0 a 56 dní (pokus 2 od 7.9. 2023).

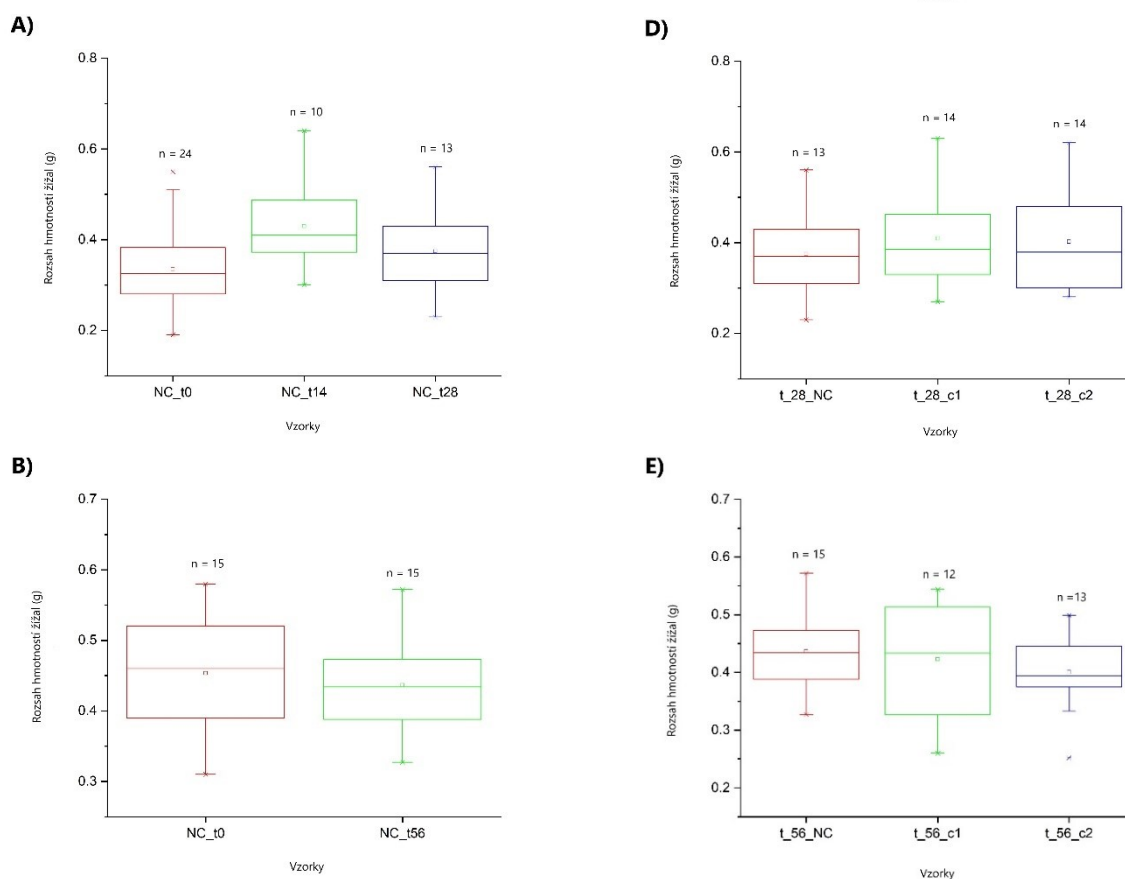
	Čas (dny)	Průměrné WHC půdy (%)
Pokus 1	0	34.96
	28	37.26
Pokus 2	0	39.97
	56	47.33

5.5 Hmotnost žížal v průběhu experimentu

Hmotnosti žížal před a po experimentu se významně nelišily ($p < 0,05$). Čas experimentu ani koncentrace mikrovláken, kterým byly žížaly vystaveny neměly vliv na hmotnosti žížal, viz Obrázek 13. Ani po 56 dnech nebyl zaznamenán žádný úbytek na hmotnostech žížal. To svědčí o životaschopnosti modelového organismu. Výsledky statistických parametrů byly zobrazeny v podobě krabicových grafů. Vysvětlení krabicových grafů viz. legenda na Obrázku 12.



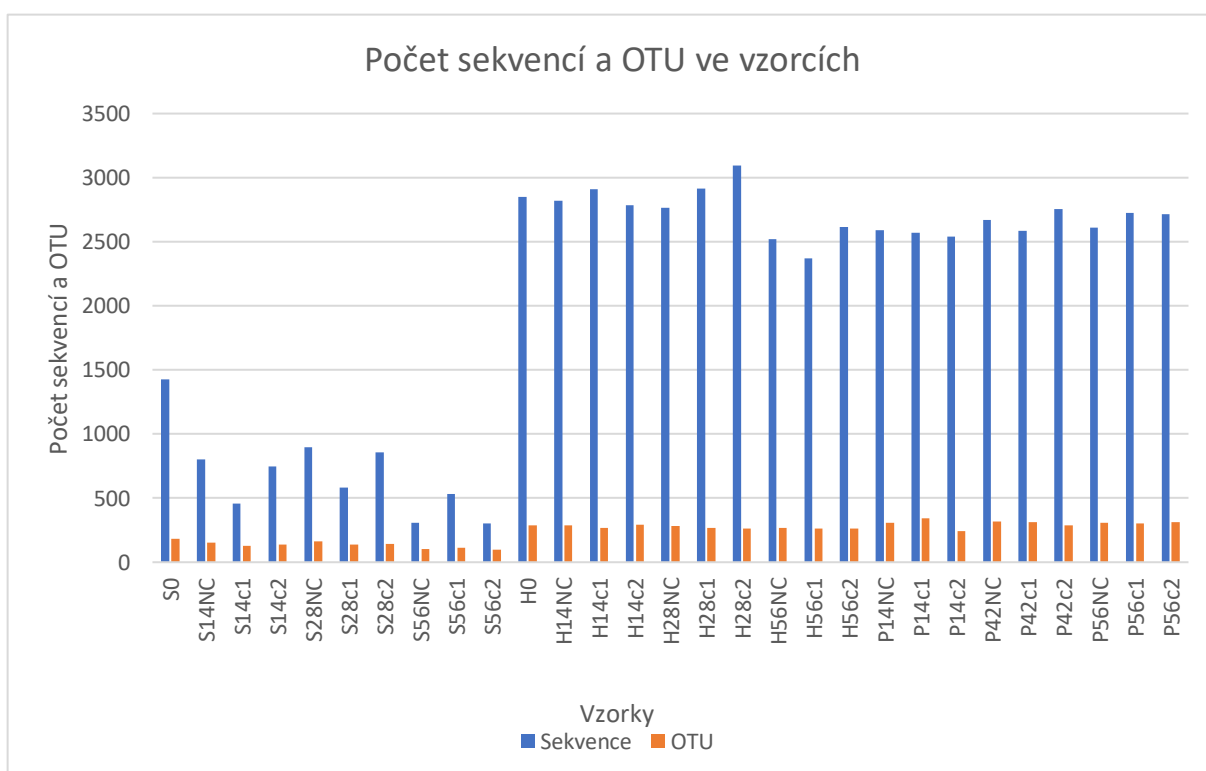
Obrázek 12 Legenda ke krabicovým grafům.



Obrázek 13 Rozsah hmotností žížal (n = počet žížal) v závislosti na čase A), B) (NC-negativní kontrola v čase 0, 14, 28 a 56 dní) a na koncentraci mikroplastů, kterým byly žížaly vystaveny C), D), E) (v čase t 14, 28 a 56 dní o koncentraci c1=1 g/kg, c2=0,0265 g/kg čerstvé půdy).

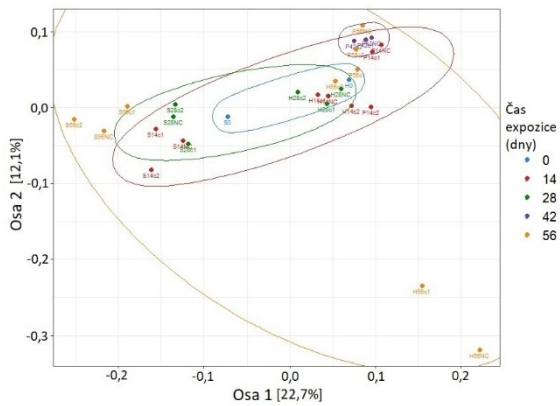
5.6 Analýza bakteriálního mikrobiomu

Při úpravě dat byl odstraněn druh bakterií *V. aporrectodeae*. Bylo vymazáno 37 klastřů. Počet sekvencí konkrétně u vzorků ze střev žířal byl 32 565, po vymazání klastřů odpovídajících *V. aporrectodeae*, se celkový počet sekvencí bakterií ze střev žířal snížil na 6926. Bylo vymazáno 25 639 sekvencí odpovídajících 78 % sekvencí bakterií ze střev žířal. Po úpravě dat popsanych v metodické sekci (kapitola 3.2.7.5 Sekvence a zpracování sekvenačních dat) shlukovalo celkových 58 317 sekvencí do 916 OTU. Maximální počet sekvencí napříč všemi vzorky (střeva, obsah střeva, půda) činil 3097, minimální 305. Průměrný počet sekvencí na vzorek bylo 2010 sekvencí. Průměrný počet OTU na vzorek bylo 236, maximální počet OTU na vzorek byl 340 a minimální 96. Počty sekvencí a OTU ve vzorcích viz. Obrázek 14.

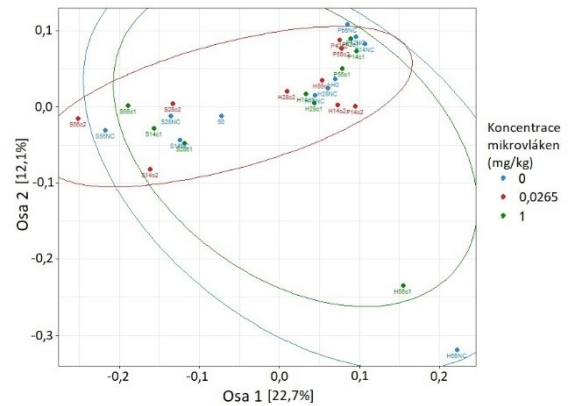


Obrázek 14 Počet sekvencí a OTU v jednotlivých vzorcích ze střev (S), obsahu střeva (H) a chovné půdy (P) v čase 0, 14, 28, 42 a 56 dní o koncentracích mikroplastů 0 g/kg (NC), 1 g/kg (c1) a 0,0256 g/kg (c2) čerstvé půdy.

Při vynesení všech vzorků do grafu PCoA založeném na odmocněné Bray-Curtisově vzdálenosti mezi vzorky neměl čas expozice ani koncentrace mikrovláken vliv na bakteriální složení žízálních střev, obsahu střeva a chovné půdy u jednotlivých vzorků, viz Obrázek 15 a 16.

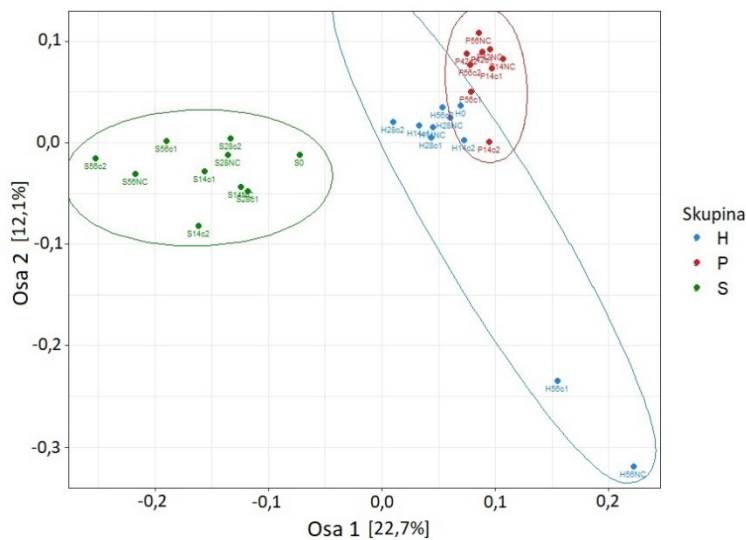


Obrázek 15 PCoA na základě odmocněné Bray-Curtisovy vzdálenosti mezi všemi vzorky ze střev žízálních (S), z obsahu střeva (H) a z chovné půdy (P) při expozici mikroplasty po dobu 0, 14, 28, 42 a 56 dní. Koncentrace mikroplastů byla 0 mg/kg (NC), 1 mg/kg (c1) a 0,0265 mg/kg (c2) suché půdy. Elipsami znázorněno shlukování vzorků na základě času expozice.



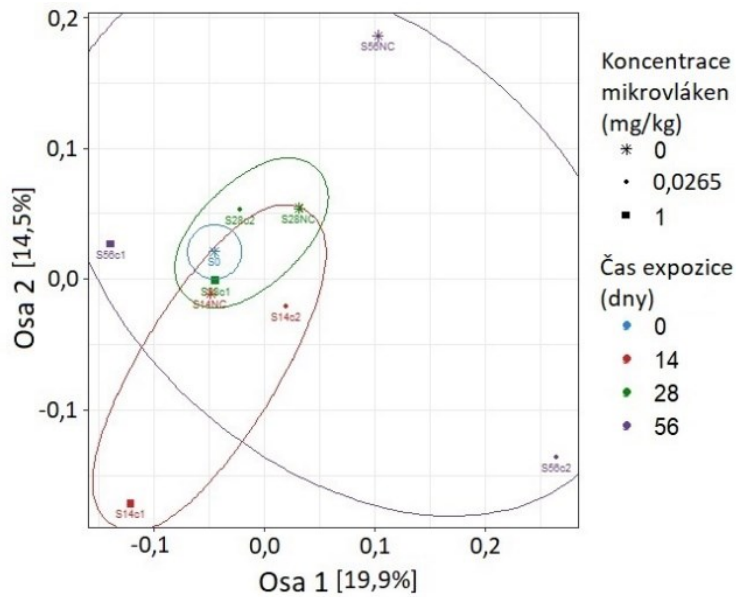
Obrázek 16 PCoA na základě odmocněné Bray-Curtisovy vzdálenosti mezi všemi vzorky ze střev žízálních (S), z obsahu střeva (H) a z chovné půdy (P) při expozici mikroplasty po dobu 0, 14, 28, 42 a 56 dní. Koncentrace mikroplastů byla 0 mg/kg (NC), 1 mg/kg (c1) a 0,0265 mg/kg (c2) suché půdy. Elipsami znázorněno shlukování vzorků na základě koncentrace mikrovláken.

Naopak bylo pozorováno shlukování vzorků podle místa, odkud byla izolována bakteriální DNA. Ta byla izolována ze střeva (S), z obsahu střeva (H) a z chovné půdy (P) viz Obrázek 17. Složení střevního mikrobiomu se lišilo od složení mikrobiomu z obsahu střeva a chovné půdy. Složení mikrobiomu z obsahu střeva a z chovné půdy si je z části podobné.



Obrázek 17 PCoA na základě odmocněné Bray-Curtisovy vzdálenosti mezi všemi vzorky ze střev žízálních (S), z obsahu střeva (H) a z chovné půdy (P) při expozici mikroplasty po dobu 0, 14, 28, 42 a 56 dní. Koncentrace mikroplastů byla 0 mg/kg (NC), 1 mg/kg (c1) a 0,0265 mg/kg (c2) suché půdy. Elipsami znázorněno shlukování vzorků dle skupiny.

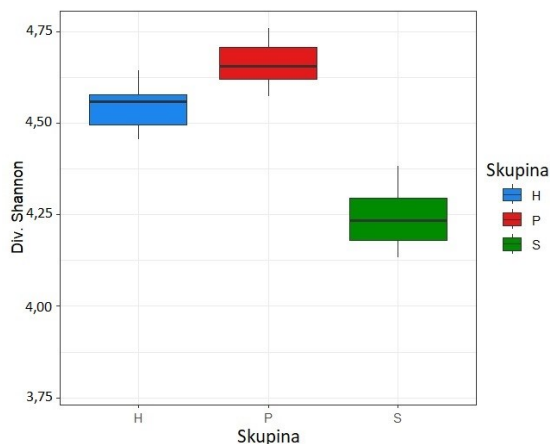
Při vynesení vzorků pouze z žízálich střev nedocházelo ke shlukování vzorků ani podle času expozice ani podle koncentrace mikroplastů, kterým byly žízály vystaveny, viz. Obrázek 18. Elipsami jsou ohraničeny vzorky ze stejné časové linie experimentu.



Obrázek 18 PCoA na základě odmocněné Bray-Curtisovy vzdálenosti mezi vzorky znázorňující shlukování vzorků ze střev žízála dle koncentrace mikrovláken (0 mg/kg (NC), 1 mg/kg (c1) a 0,0265 mg/kg (c2) suché půdy) a času expozice (0, 14, 28, 42 a 56 dní).

TukeyHSD test na základě jednocestné analýzy ANOVA odhalil signifikantní rozdíl v bakteriální diverzitě mezi vzorky ze střeva (S) a vzorky obsahu střev (H, $p=0,00031$) a vzorky chovné půdy (P, $p=0,00002$). Nejvyšší diverzita byla sledována u vzorků chovné půdy, následně byla pozorována menší diverzita

u vzorků z obsahu střeva a nejnižší bakteriální diverzita byla pozorována u vzorků z žízálich střev,



Obrázek 19 Porovnání alfa diverzity (dle Shannonova indexu) mezi vzorky podle skupiny vzorků z obsahu střeva (H), chovné půdy (P) a střeva (S).

viz. Obrázek 19.

Na základě Hutchesonova t-testu pro porovnání dvou Shannon-Wienerových indexů diverzity nebyly sledovány signifikantní změny v bakteriální diverzitě ve střevech žížal vystavených různým koncentracím mikrovláken. Avšak byla sledována signifikantní změna ($p = 0,0008$) v diverzitě střevního mikrobiomu u žížal vystavených koncentraci mikroplastů 1 mg/kg po dobu 56 dní vůči kontrole po 56 dnech. Dále nebyla u vzorků z obsahu střeva ani z chovné půdy sledována žádná signifikantní změna v diverzitě mikrobiomu, viz. Tabulka 9. Hypotéza navržená v této práci ve znění: mikroplasty snižují bakteriální diverzitu, byla zamítnuta v našem experimentálním nastavení. Nulová hypotéza Hutchesonova t-testu (diverzity se od sebe neliší) zamítnuta nebyla.

Tabulka 9 Porovnání Shannon-Wienerových indexů diverzity (H=) vždy mezi kontrolou (NC) a vzorkem exponovaným mikrovláknům o koncentraci 1mg/kg (c1) a 0,0265 mg/kg (c2). Indexy diverzity jsou uvedeny pro vzorky ze střev žížal (S), z obsahu střeva (H) a z chovné půdy (P) v časech 14, 28 a 56 dní. Porovnání proběhlo pomocí Hutchesonova t-testu, $p =$ signifikance.

	S14c1 H = 4,26		S28c1 H = 4,37		S56c1 H = 3,78
S14NC	$p = 0,29$	S28NC	$p = 0,91$	S56NC	$p = 0,0008$
H = 4,17	S14c2 H = 4,22 $p = 0,72$	H = 4,38	S28c2 H = 4,19 $p = 0,19$	H = 4,25	S56c2 H = 4,13 $p = 0,15$

	H14c1 H = 4,24		H28c1 H = 4,31		H56c1 H = 4,31
H14NC	$p = 0,99$	H28NC	$p = 0,99$	H56NC	$p = 0,99$
H = 4,28	H14c2 H = 4,32 $p = 0,99$	H = 4,28	H28c2 H = 4,25 $p = 0,99$	H = 4,05	H56c2 H = 4,28 $p = 0,99$

	P14c1 H = 4,26		P42c1 H = 4,29		P56c1 H = 4,26
P14NC	$p = 0,99$	P42NC	$p = 0,99$	H56NC	$p = 0,80$
H = 4,28	P14c2 H = 3,91 $p = 0,98$	H = 4,32	P42c2 H = 4,27 $p = 0,99$	H = 4,25	P56c2 H = 4,26 $p = 0,80$

Byl proveden vícenásobný Hutchesonův test pro porovnání diverzit vzorků během času experimentu. Byly sledovány signifikantní změny v diverzitě střevního mikrobiomu v závislosti na času experimentu. Diverzita bakterií ve střevě žížal po 14 dnech experimentu se signifikantně lišila od diverzity bakterií ve střevě žížal v čase 0 ($p = 0,023$). Dále se lišila diverzita bakterií ze střev žížal po 14 dnech od diverzity bakterií ze střev po 28 dnech experimentu ($p = 0,001$). Byla též zaznamenána

signifikantní změna v diverzitě bakterií ze střev žířal po 28 dnech od diverzity bakterií ze střev po 56 dnech experimentu ($p = 0,041$), viz. Tabulka 10, str.48.

Tabulka 10 Matice p hodnot po vícenásobném porovnání Shannon-Wienerových indexů diverzit (H) mezi kontrolními vzorky (NC) ze střev žířal (S) v čase 0, 14, 28 a 56 dní. Porovnání proběhlo pomocí vícenásobného Hutchesonova t -testu. Signifikantní p hodnoty zvýrazněny oranžově.

Vzorky ze střev žířal (S)					
Název vzorku	H	S0	S14NC	S28NC	S56NC
		4,31	4,17	4,38	4,25
S0	4,31	X	0,023	0,144	0,334
S14NC	4,17	0,023	X	0,001	0,290
S28NC	4,38	0,144	0,001	X	0,041
S56NC	4,25	0,334	0,290	0,041	X

U vzorků z obsahu střeva žířal byly zaznamenány signifikantní změny ($p < 0,05$) v diverzitě bakterií pouze u vzorků v čase 0, 14 a 28 dní vůči diverzitě bakterií z obsahu střeva po 56 dnech, viz. Tabulka 11. Největší změna v diverzitách bakterií byla zaznamenána mezi vzorky kontrol z obsahu střev po 28 dnech a po 56 dnech ($p = 6,20 \cdot 10^{-11}$). Byla též zaznamenána signifikantní změna v bakteriální diverzitě mezi kontrolními vzorky z obsahu střev po 14 dnech a 56 dnech ($p = 7,71 \cdot 10^{-11}$). Dále byla sledována signifikantní změna v bakteriálních diverzitách mezi kontrolními vzorky z obsahu střeva v čase 0 a 56 dní ($p = 7,79 \cdot 10^{-11}$).

Tabulka 11 Matice p hodnot po vícenásobném porovnání Shannon-Wienerových indexů diverzit (H) mezi kontrolními vzorky (NC) z obsahu střev žířal v čase 0, 14, 28 a 56 dní (H0, H14NC, H28NC, H56NC). Porovnání proběhlo pomocí vícenásobného Hutchesonova t -testu. Signifikantní p hodnoty zvýrazněny oranžově.

Vzorky z obsahu střev žířal (H)					
Název vzorku	H	H0	H14NC	H28NC	H56NC
		4,58	4,57	4,58	4,31
H0	4,58	X	0,956	0,973	$7,79 \cdot 10^{-11}$
H14NC	4,57	0,956	X	0,928	$7,71 \cdot 10^{-11}$
H28NC	4,58	0,973	0,928	X	$6,20 \cdot 10^{-11}$
H56NC	4,31	$7,79 \cdot 10^{-11}$	$7,71 \cdot 10^{-11}$	$6,20 \cdot 10^{-11}$	X

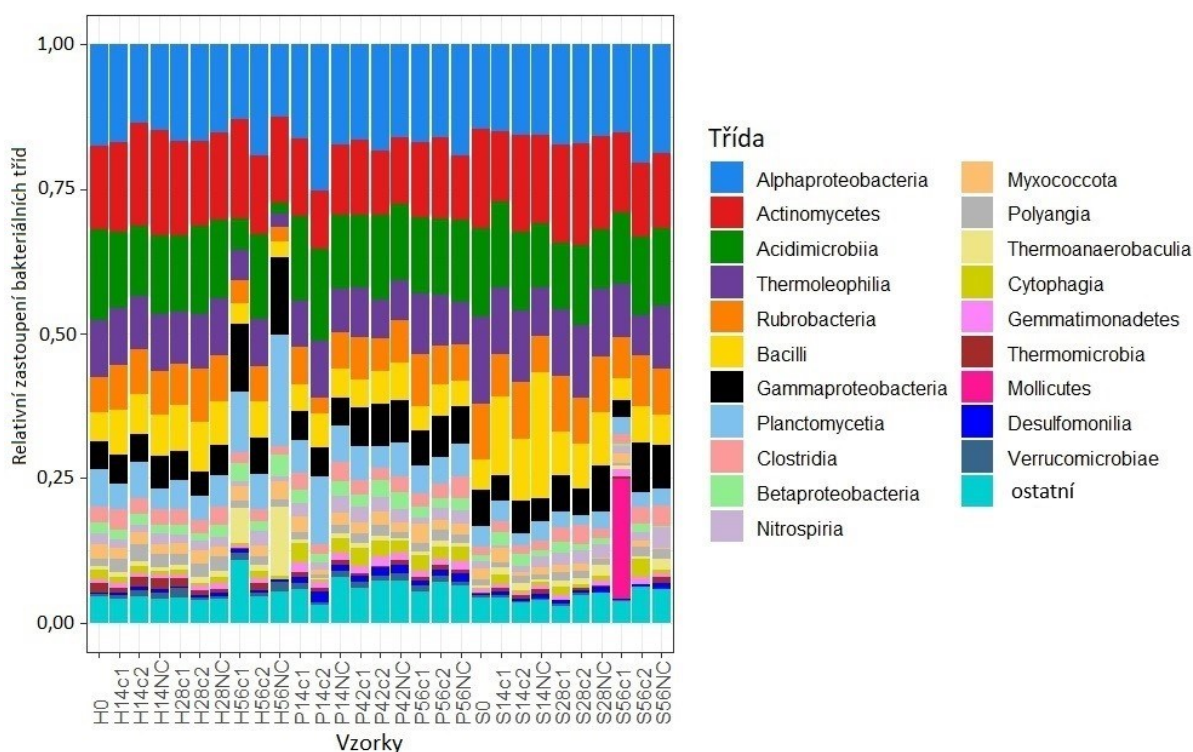
U vzorků chovné půdy byla zaznamenána pouze 1 signifikantní změna v diverzitě bakterií ve vzorku po 42 dnech vůči vzorku po 56 dnech ($p = 0,004$), viz. Tabulka 12.

Tabulka 12 Matice p hodnot po vícenásobném porovnání Shannon-Wienerových indexů diverzit (H) mezi kontrolními vzorky (NC) chovných půd (P) v čase 14, 42 a 56 dní. Porovnání proběhlo pomocí vícenásobného Hutchesonova t -testu. Signifikantní p hodnoty zvýrazněny oranžově.

Vzorky z chovné půdy (P)				
Název vzorku	H	P14NC	P42NC	P56NC
		4,71	4,75	4,64
P14NC	4,71	X	0,265	0,078
P42NC	4,75	0,265	X	0,004
P56NC	4,64	0,078	0,004	X

Dále byl vytvořen sloupcový graf znázorňující 20 nejzastoupenějších bakteriálních tříd ve vzorcích ze střev žížal, z obsahu střeva a z chovné půdy, viz Obrázek 20. Nebyly pozorovány žádné významné změny v relativním zastoupení bakteriálních tříd v návaznosti na vystavení žížal MTEX mikrovláknům. U vzorků z obsahu střeva po 56 dnech expozice koncentraci mikroplastů 0 a 1 mg/kg (H56NC a H56c1) došlo k navýšení relativního zastoupení bakterií z třídy Thermoanaerobaculia, Planctomycetia a Gammaproteobacteria. Naopak došlo k poklesu relativního zastoupení bakterií z tříd Rubrobacteria, Bacilli, Thermoleophilia a Acidimicrobiia vzhledem k ostatním vzorkům. U vzorku ze střeva žížal po 56 dnech expozice mikroplastům o koncentraci 1 mg/kg (S56c1) došlo k významnému navýšení relativního zastoupení bakterií z třídy Mollicutes.

V programu R byla vytvořena taxonomická tabulka udávající procentuální zastoupení jednotlivých bakteriálních tříd dle počtu sekvencí přítomných ve vzorcích ze střev. Bylo zobrazeno prvních 20 nejzastoupenějších bakteriálních tříd. Nejzastoupenějšími třídami byly Alphaproteobacteria, Actinomycetes nebo Acidimicrobiia, viz Tabulka 13 (str. 50). Nejzastoupenějšími kmeny bakterií (hodnoty uvedeny v procentech sekvencí) byly Actinomycetota (49,29 %), dále Pseudomonadota (23,04 %), Bacillota (11,42 %), Planctomycetota (3,09 %), Myxococcota (2,56 %), Acidobacteriota (2,23 %), Nitrospirota (1,69 %), Mycoplasmatota (1,62 %) a Bacteroidota (1,21 %).



Obrázek 20 Relativní zastoupení bakteriálních tříd ve vzorcích ze střev žížal (S), z obsahu střeva (H) a z chovné půdy (P). Doba expozice mikroplasty byla 0, 14, 28, 42 a 56 dní. Koncentrace mikroplastů byla 0 mg/kg (NC), 1 mg/kg (c1) a 0,0265 mg/kg (c2) suché půdy.

Tabulka 13 Tabulka zobrazující 20 nejzastoupenějších bakteriálních tříd ze střeva žíhal *Aporrectodea* sp dle procentuálního zastoupení sekvencí.

Kmen	Třída	Sekvence (%)
Pseudomonadota	Alphaproteobacteria	16.05
Actinomycetota	Actinomycetes	15.84
Actinomycetota	Acidimicrobiia	13.08
Actinomycetota	Thermoleophilia	11.69
Bacillota	Bacilli	9.22
Actinomycetota	Rubrobacteria	8.63
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	5.76
Planctomycetota	Planctomycetia	2.83
Bacillota	Clostridia	2.08
Nitrospirota	Nitrospira	1.69
Mycoplasmata	Mollicutes	1.62
Myxococcota	Myxococcota	1.24
Pseudomonadota	Betaproteobacteria	1.23
Myxococcota	Polyangia	1.09
Acidobacteriota	Thermoanaerobaculia	0.97
Bacteroidota	Cytophagia	0.73
Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	0.63
Acidobacteriota	Terriglobia	0.51
Thermodesulfobacteriota	Desulfomonilia	0.51

5.7 Extrakce imunitních buněk

Množství imunitních buněk vyextrahovaných jednotlivými metodami viz. Tabulka 14. Data ukazují, že ani jedna z metod použitých na extrakci imunitních buněk nebyla úspěšná. Počet extrahovaných buněk nebyl dostatečný pro provedení následné analýzy.

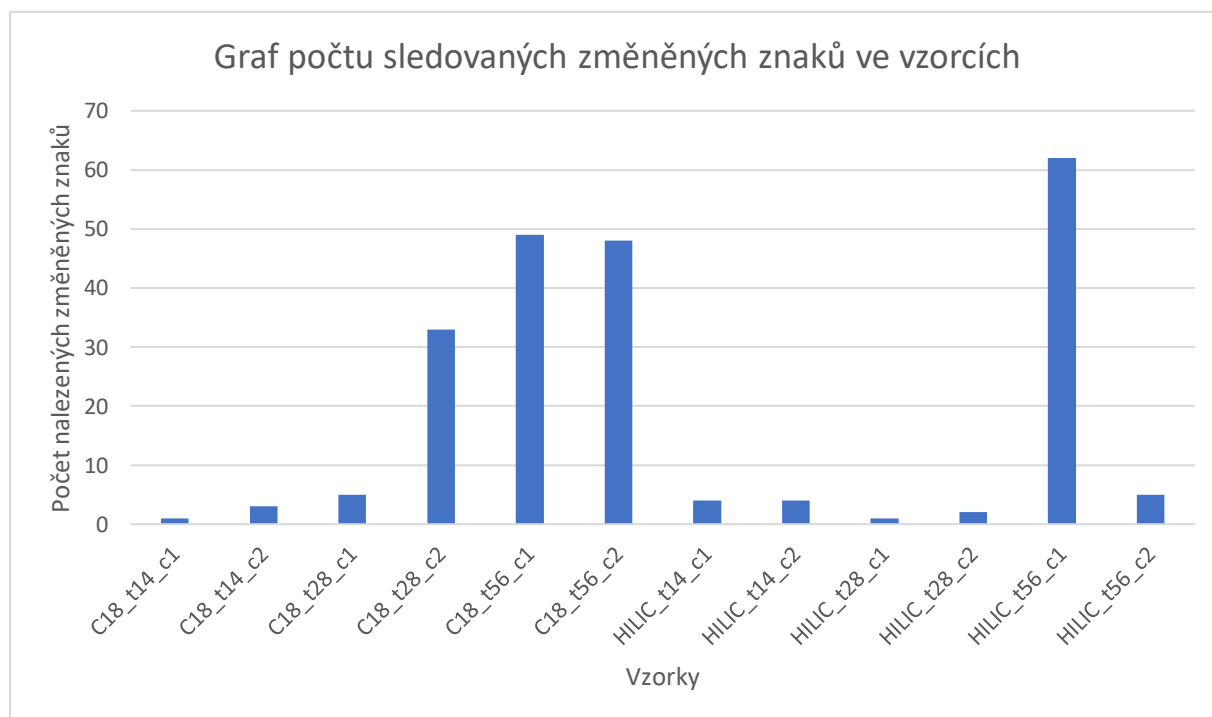
Tabulka 14 Počty vyextrahovaných imunitních buněk pomocí 3 metod z žíhal *Aporrectodea* sp. Extrakce buněk pomocí elektrického napětí 6 a 4,5 V trvala 60 sekund. * Po extrakci buněk Pasteurovou pipetou a bateriemi došlo pouze k 1 přečištění vzorků.

Metody extrakce buněk	Počet žíhal v jednom vzorku	Počet extrahovaných buněk/ml	Objem s 2×10^5 buněk (μ l)	Objem jamky v 96 destičce (μ l)
Extrakce buněk pufrem	6	6750	29630	400
	6	7500	26667	
Extrakce buněk Pasteurovou pipetou*	1	50000	4000	
	1	325000	615	
Extrakce buněk za pomoci elektrického napětí 60 s*	6 V	100000	2000	
	4,5 V	75 000	2667	

5.8 Necílená metabolická analýza

Metodou necílené analýzy metabolitů byly sledovány změny ve znacích u vzorků žížal vystavených mikroplastům po určitý čas v porovnání s negativní kontrolou žížal nevystavených mikroplastům. Znaky ve vzorcích označených HILIC jsou metabolity polární. Znaky ve vzorcích označených C18 jsou metabolity nepolární. U polárních znaků ve vzorcích žížal vystavených koncentraci MTEX 1 mg/kg (c1) po dobu 14 dní (C18_t14_c1) byla zaznamenána 1 změna. U žížal vystavených po dobu 14 dní koncentraci 0,0265 g/kg (c2) (C18_t14_c2) byly zaznamenány 3 změněné znaky. U žížal vystavených po dobu 28 dní mikroplastům o koncentraci c1 (C18_t28_c1) bylo zaznamenáno 5 změněných znaků a o koncentraci c2 (C18_t28_c2) 33 změněných znaků. U žížal vystavených 56 dní MTEX o koncentraci c1 (C18_t56_c1) bylo zaznamenáno 49 změněných znaků a při koncentraci c2 (C18_t56_c2) 48 změněných znaků.

U nepolárních znaků ve vzorcích žížal vystavených koncentraci MTEX c1 po dobu 14 dní (HILIC_t14_c1) byly zaznamenány 4 změny stejně jako u žížal vystavených MTEX o koncentraci c2 (HILIC_t14_c2). U žížal vystavených po dobu 28 dní mikroplastům o koncentraci c1 (HILIC_t28_c1) byl zaznamenán 1 změněný znak a o koncentraci c2 (HILIC_t28_c2) 2 změněné znaky. U žížal vystavených 56 dní MTEX o koncentraci c1 (HILIC_t56_c1) bylo sledováno 62 změněných znaků a při koncentraci c2 (C18_t56_c2) 5 změněných znaků viz. Obrázek 21.



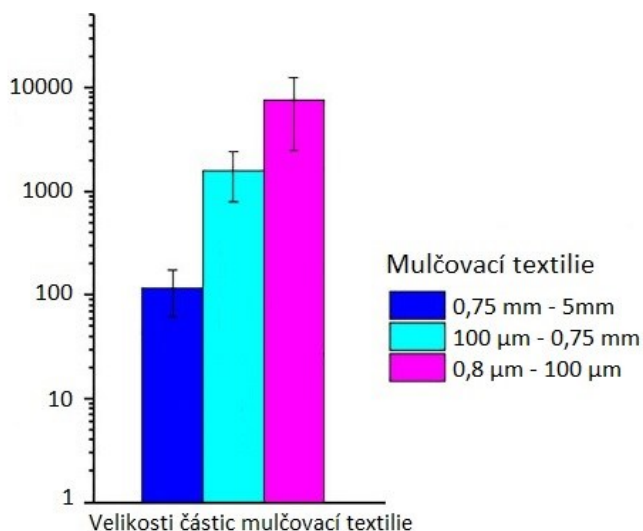
Obrázek 21 Počet nalezených signifikantně změněných znaků ($p < 0,05$, $FCH=2$) (C18-nepolární znaky; HILIC-polární znaky) u jednotlivých vzorků žížal vystavených mikroplastům o koncentraci 1 mg/kg půdy (c1) a 0,0256 mg/kg (c2) z mulčovací textilie (MTEX) po dobu 14, 28 a 56 dní.

6 Diskuse

6.1 Mikroplasty z mulčovací textilie

Mulčování syntetickými mulči je dodnes velmi časté a oblíbené řešení, jak zvýšit rostlinnou produkci (Kamal *et al.*, 2012; Devasinghe *et al.*, 2015; Moursy *et al.*, 2015). V roce 2020 bylo globálně použito přes 2,1 milionu tun plastového mulče (Wang *et al.*, 2022). PE je první plastový materiál, který byl využit na mulčování (Emmert, 1954) a možná právě proto nejrozšířenější materiál na mulčování. S jistotou lze říci, že tématu orientovanému na rozpad mulčovacích PE či LDPE fólií (Crossman *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021; Ling Ding *et al.*, 2020; Li W. *et al.*, 2020; Ramos *et al.*, 2015) a vlivu PE či LDPE mikroplastů na půdní parametry, na půdní mikrobiotu nebo faunu (Chen *et al.*, 2023; Qi *et al.*, 2020b; Huang *et al.*, 2019; Qi *et al.*, 2020a; Song *et al.*, 2023) je věnováno více pozornosti. Články věnující se vláknům z MTEX byly nalezeny pouze 2 (Sobhani *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2023), ze kterých pouze 1 zmiňuje PP MTEX (Sobhani *et al.*, 2021).

Sobhani *et al.*, (2021) izolovali mikroplasty ze zahradní půdy v jižní Austrálii, Bellevue Heights 5050 pomocí běžného domácího vybavení po 7 letech používání PP MTEX. Množství nalezených mikroplastů z MTEX o velikosti 0,8-100 μm bylo okolo 10 000 kusů na 10 g suché půdy. Mikroplastů o velikosti 100 μm -0,75 mm bylo nalezeno okolo 1000 kusů na 10 g suché půdy a mikroplastů o velikosti 0,75-5 mm bylo nalezeno v 10 gramech suché půdy okolo 100 kusů viz. Obrázek 22.



Obrázek 22 Sloupcový graf počtu částic izolovaných z půdy v závislosti na jejich velikosti, převzato a upraveno dle (Sobhani *et al.*, 2021).

Počet všech velikostí částic mikroplastů z MTEX přepočten na 1000 g půdy by pak činil 11 100 000 částic mikroplastů. Této hodnoty počtu vláken v půdě nebylo v této práci ani zdaleka dosaženo. Počet vláken v 1000 g půdy se pohyboval v řádech deseti tisíců, nikoli desítek milionů. Tento velký rozdíl v počtu nalezených mikroplastů by mohl být způsoben použitím rozdílných detekčních metod. V této diplomové práci byl použit na kvantifikaci pouze optický mikroskop umožňující

detekovat pouze viditelná vlákna vizuálně a dále FTIR na potvrzení, že sledovaná vlákna pod světelným mikroskopem jsou PP. Zatímco v práci (Sobhani *et al.*, 2021) byla použita Ramanova spektroskopie, která umožňuje detekci menších částic. Vzhledem k nedostatku publikací na mikroplasty uvolňující se z MTEX, byl tento pokus proveden za účelem zjištění, zda k rozpadu textilie vůbec dochází a za účelem zjistit rámcovou koncentraci takových mikroplastů v půdě. Pro tento účel byly zvolené metody detekce vláken zcela dostačující.

6.2 Sběr a určování žížal

Vzhledem k tomu, že nebyl nalezen žádný dostupný chov žížal rodu *A. caliginosa*, byly žížaly nasbírány. Ve většině níže zmíněných studiích, kde byla použita *A. caliginosa* jako modelový organismus, byly žížaly ručně nasbírány. Nasbírané žížaly pak byly v některých případech v téže studiích určeny dle morfologie, tedy dle klíče. Ve většině případů nebylo uvedeno podle čeho byly žížaly taxonomicky určeny viz Tabulka 15.

Tabulka 15 Studie zahrnující *A. caliginosa* a sledované parametry (způsoby získání *A. caliginosa* do studie a způsob určení žížal).

Zisk žížal		Určení žížal	Zdroj
Samosběr	Chov		
✓	×	neuveďeno	(Eriksen-Hamel a Whalen, 2007)
×	✓	–	(Elyamine a Hu, 2020)
×	✓	–	(Neilson a Boag, 2003)
✓	×	neuveďeno	(Dai <i>et al.</i> , 2004)
✓	×	určení dle klíče Sims a Gerard (1999)	(Butt <i>et al.</i> , 2020)
✓	×	neuveďeno	(Khalil, 2016)
✓	×	neuveďeno	(Holmstrup, 2001)
✓	×	určení dle klíče Sims a Gerard (1999)	(Bart <i>et al.</i> , 2020)
✓	×	určení dle klíče Sims a Gerard (1999)	(Hobbelen <i>et al.</i> , 2006)
✓	×	neuveďeno	(Bart <i>et al.</i> , 2019a)
✓	×	neuveďeno	(Eriksen-Hamel a Whalen, 2006)
✓	×	určení dle klíče Blakemore (2006)	(Pérez-Losada <i>et al.</i> , 2009)
✓	×	určení dle klíče Sims a Gerard (1999)	(Bart <i>et al.</i> , 2019)
✓	×	neuveďeno	(Owojori a Reinecke, 2009)
×	✓	–	(Elyamine <i>et al.</i> , 2018)
×	✓	–	(Puga-Freitas <i>et al.</i> , 2012)

6.3 Charakterizace půdy

Chovná půda byla charakterizována za účelem zjištění parametrů půdy a za účelem zjištění přítomnosti toxických prvků, jejichž přítomnost by mohla ovlivnit výsledky toxicity mikroplastů. Je známo, že na povrch mikroplastů se mohou sorbovat jiné polutanty, mezi které patří i těžké kovy (Zhou *et al.*, 2019). Sorpcí těžkých kovů na mikroplast se mohou kovy stát biologicky dostupnější a koncentrovanější a tím nebezpečnější (An *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2020) ve své práci například zjistili, že přítomnost mikroplastů v půdě zvyšuje ukládání kadmia v těle žížaly *E. fetida*.

Limity těžkých kovů v půdě dle WHO (1999) jsou 100 mg chromu, 0,8 mg kadmia, 85 mg olova, 36 mg mědi a 50 mg zinku na 1 kg půdy. Ani v jednom z případů nepřesáhla koncentrace zmíněných prvků v chovné půdě dané limity. Koncentrace hliníku se v půdě přirozeně pohybuje od 10 000 do 300 000 mg/kg půdy (Lindsay, 1979). Limit pro koncentraci arsenu v zemědělské půdě je 20 mg/kg (Rahman *et al.*, 2023). Ani v tomto případě nebyly v chovné půdě nalezeny nadlimitní koncentrace. Naměřené hodnoty koncentrací těžkých kovů v chovné půdě se též pohybují v minimálních hodnotách naměřených koncentrací kovů po celé Evropě (Tóth *et al.*, 2016).

Během experimentu bylo nutno dodržovat podmínky vhodné pro chov žížal *Apporectodea* sp., aby neměl na stav žížal vliv jiný faktor než koncentrace mikroplastů a čas, po který byly žížaly mikroplastům vystaveny. Žížaly byly chovány ve tmě, při 15 °C, v půdě o pH 6,8, vlhkost půdy byla cca 24 % (přibližně 37 % WHC), což odpovídá nastavení chovných podmínek v dalších experimentech, viz Tabulka 16. Bami *et al.*, (2017) k chovu žížal nedoporučují použití standardizovaných půd, tohoto doporučení bylo v této práci využito.

Tabulka 16 Tabulka podmínek chovů žížaly *A. caliginosa* v jiných studiích.

Teplota (°C)	Světlo (h)	Vlhkost (%)	pH	Zdroj
15	0	25	6,3	(Eriksen-Hamel a Whalen, 2007)
10-15	0	25-30 18	4,5-7	(Lowe a Butt, 2005)
15	0	20-25	—	(Butt <i>et al.</i> , 2020)
23± 2	12	60	5,57	(Khalil, 2016)
15	0	12	5,9 6,7	(Holmstrup, 2001)
20	0	30	6,3	(Eriksen-Hamel a Whalen, 2006)
15	—	28	7,5	(Bart <i>et al.</i> , 2019)
15	0	28	7,5	(Bart <i>et al.</i> , 2019)
15±1	—	28	7,5	(Bart <i>et al.</i> , 2020)

6.4 Analýza bakteriálního mikrobiomu

Na střevní mikrobiom žížaly *Aporrectodea* sp. neměla vliv koncentrace mikroplastů, ani čas, po který byly žížaly mikroplastům vystaveny. Z dřívějších studií jsou popsány případy vlivu mikroplastů na střevní mikrobiom různých organismů (Qiao *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2018). Změny ve střevním mikrobiomu byly též pozorovány u půdních organismů. Zhu *et al.*, (2018) vystavili chvostoskoky *Folsomia candida* PVC mikroplastům o velikosti 80-250 μm po dobu 56 dní a sledovali změny ve složení střevních bakterií a snížení bakteriální diverzity. U roupic *Enchytraeus crypticus* vystaveným mikroplastům z pneumatik byla též sledována změna ve složení střevního mikrobiomu, který byl obohacen o patogenní bakterie (Ding *et al.*, 2020). V této práci ovšem nebyl pozorován vliv mikroplastů na relativní zastoupení bakterií ve střevě žížal, na relativní zastoupení bakterií obsahu žížalího střeva, ani na relativní zastoupení bakterií v chovné půdě. Složení bakterií se lišilo pouze v závislosti na skupině, tedy na tom, zda byly bakterie izolovány ze střev, obsahu střev nebo chovné půdy. Tyto výsledky se zcela shodují s prací (Adhikari *et al.*, 2023), která se nastavením experimentu velmi podobá této práci. Adhikari *et al.*, (2023) vystavili po dobu 20 dní žížalu *L. terrestris* LDPE mikroplastům o velikosti $<250 \mu\text{m}$, jako materiálu odpovídajícímu složením mulčovací fólie. Mikroplasty, shodně jako v této práci, dali do opadu, nikoli do půdy. Množství přidaných mikroplastů činilo 1,4 g. Následně zkoumali bakterie ze střev žížal, z žížalích exkrementů a chovné půdy. Nezaznamenali žádné signifikantní ovlivnění mikrobiomu po vystavení žížal mikroplastům ani u jednoho ze 3 druhů vzorků. Zaznamenali pouze signifikantní odlišnosti ve složení mikrobiomu ze střev žížal, z exkrementů a z chovné půdy. Ani hmotnosti žížal se před a po experimentu nelišily. Stejně tak neměly PE nanoplasty o koncentraci 200 mg/kg suché půdy po 28 dnech vliv na střevní mikrobiotu žížaly *Metaphire vulgaris* (Wang *et al.*, 2022).

Naopak je publikováno více článků o negativním vlivu mikroplastů na střevní mikrobiom žížal (Chan *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2024a; Yang *et al.*, 2022; Kwak a An 2022; Cheng *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2022; Xu a Yu, 2021).

Zhao *et al.*, (2024a) sledovali změny v relativním zastoupení bakterií ze střev po vystavení žížaly *E. fetida* PVC a LDPE mikroplastům o velikosti 900 μm a koncentraci 50 g/kg. Yu *et al.*, (2022) vystavili žížalu *E. fetida* PE mikroplastům o 6 různých koncentracích po dobu 28 dní a nezaznamenali signifikantní změny v zastoupení dominantních střevních bakterií, jen změnu v relativním zastoupení bakterií, snížení diverzity a bohatosti střevní mikrobioty. Chan *et al.*, (2023) vystavili žížalu *Eudrilus euganiae* PE mikroplastům o velikosti 40–48 μm . Žížaly byly chovány v namletém kartonu. Koncentrace mikroplastů byla 5 a 20 % (w/w). Následně pak sledovali změny v relativním zastoupení bakterií přítomných ve střevě žížal. Chovem žížaly *E. euganiae* v namletém kartonu s mikroplasty, vytvořili umělé prostředí, kde žížaly neměly jinou možnost než pozřít homogenní uniformní stravu s mikroplasty. Vyloučili tak chovnou půdu jako heterogenní proměnnou matici, která by mohla interagovat s mikroplasty

a střevním mikrobiomem žížal. Vytvořili prostředí, kde do styku mohly přijít pouze střevní bakterie žížal a mikroplasty, ovšem neodpovídající reálnému prostředí. Je otázka, zda v životním prostředí opravdu může docházet k ovlivnění střevní mikrobioty žížal mikroplasty.

Tento rozdíl ve výsledcích může být způsoben tím, že ve výše zmíněných pracích byly mikroplasty zamíchány do půdy a tím se žížaly nutně musely s mikroplasty setkat a s největší pravděpodobností je pozřít, jak také zmiňují Adhikari *et al.*, (2023) v závěru své práce. Je možné, že pokud jsou mikroplasty v opadu, nepozře jich žížala tolik, aby bylo možné sledovat na organismu případné projevy toxicity mikroplastů.

Huerta Lwanga *et al.*, (2016) též přidali PE mikroplasty <150 μm o různých koncentracích do opadu a sledovali koncentraci mikroplastů v půdě, vliv mikroplastů na rychlost růstu a mortalitu žížal *L. terrestris* po 60 dnech. Pokud bylo ve 13 g opadu 0,91 g mikroplastů, bylo po 60 dnech v chovné půdě přítomno 0,2 % (w/w) mikroplastů a nebyly zaznamenány změny v růstové rychlosti žížal ani žádná úmrtnost. Naopak pokud bylo v opadu přítomno 3,64 g nebo 5,85 nebo 7,80 g mikroplastů, byly sledovány změny v růstové rychlosti, mortalita a zvýšená koncentrace mikroplastů v půdě. To, že byly sledovány negativní vlivy mikroplastů na žížalu *L. terrestris*, mohlo být způsobeno i rozdílným stylem života žížal. *L. terrestris* je na rozdíl od *A. caliginosa* žížala aneická, která primárně žije ve vertikálních chodbičkách a zabudovává organický opad do půdy (Brown, 1995). Ačkoliv *A. caliginosa* občas na povrch půdy vyleze (viz Obrázek 23, str.54), nemuselo to být dostačující k pozření plastů. Obrázek 23, str.54 níže jsou důkazem, že ovšem docházelo ke kontaktu žížal s mikroplasty.



Obrázek 23 Fotky zachycující přítomnost žížal *Aporrectodea* sp. v opadu, foto:autor

Nicméně samotný kontakt žížal s mikroplasty nemusel vést k pozření mikroplastů žížalami. Je známo, že velikost částic ovlivňuje růst a reprodukci žížal (Lowe a Butt, 2003). Boström (1988) sledovala zvýšený růst a produkci kokonů, pokud byla *A. caliginosa* krmena opadem o velikosti menší než 200 μm oproti žížalám krmeným opadem o velikosti nad 200 μm . Průměrná délka mikroplastů z MTEX byla 890 μm a průměrná šířka 24 μm , minimální naměřená délka byla 141 μm a maximální 4811 μm . Je tak možné, že i když byly žížaly v opadu, nedokázaly mikroplasty pozřít.

V této práci byla jako vysoká koncentrace mikroplastů použita 0,1 % (w/w) odpovídající 1 g mikroplastů na 1 kg čerstvé půdy. Tato koncentrace byla použita v jiných článcích a byl pozorován negativní vliv mikroplastů na žížaly (Chen *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022; Prendergast-Miller *et al.*, 2019; Rodriguez-Seijo *et al.*, 2017). Je tedy možné, že vlákna nebyla pro žížaly toxická pouze z důvodu jejich zamíchání do opadu. Pokud by k pozření mikroplastů žížalami přeci jen došlo, byla koncentrace 1 g/kg dostatečná, aby potenciálně došlo k projevům toxicity.

Určené kmeny bakterií ze střeva žížal *Aporrectodea* sp. se shodují s těmi, které určili Sapkota *et al.*, (2020). Byly též identifikovány kmeny Actinomycetota, Acidobacteriota, Bacteroidota, Pseudomonadota, Bacillota nebo Nitrospirota. V práci Sapkota *et al.*, (2020) určili jako charakteristický kmen bakterií Acidobacteriota z obsahu střeva *A. caliginosa* a jako charakteristickou třídu Alphaproteobacteria v porovnání s jinými druhy žížal. V této práci byl kmen Acidobacteriota zastoupen z 2,23 % počtu všech sekvencí. Třída Alphaproteobacteria byla nejzastoupenější (16,05 % všech sekvencí). U (Sapkota *et al.*, 2020) bylo výrazné relativní zastoupení kmene Verrucomicrobiota, okolo

25 %, v této práci byly sekvence tohoto kmene přítomny pouze z 0,60 %. Rozdíl v zastoupení Verrucomicrobiota by mohl být způsoben tím, že Sapkota *et al.*, (2020) izolovali DNA z obsahu žížalího střeva. Aira *et al.*, (2022) totiž zjistili přítomnost kmene Verrucomicrobiota ve střevě a obsahu střeva u žížaly *A. caliginosa* a také v půdě. Zjistili též, že průchodem půdy žížalím střevem dochází k namnožení bakteriálního kmene Verrucomicrobiota.

Ve střevě žížal byly též zjištěny druhy bakterií *Bacillus sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Streptomyces sp.*, jaké byly určeny v práci (Tikhonov *et al.*, 2016). Nebyl ovšem zjištěn druh *Aeromonas sp.* Tikhonov *et al.*, (2016) určovali bakterie ze střevní tekutiny, ovšem v této práci byla žížalí střeva před odebráním pro pozdější izolaci DNA otevřena a vymyta dH₂O, mohlo dojít k vymytí tohoto bakteriálního druhu.

Ve vzorku ze střev žížal po 56 dnech vystavených koncentraci mikrovláken 1 mg/kg byla pozorována výrazně zvýšená relativní abundance bakteriální třídy Mollicutes, patřící do kmene Mycoplasmatota. Jedná se o mutualistické komenzální nebo parazitické Gram pozitivní bakterie bez buněčné stěny s malým genomem (Johansson a Pettersson, 2002). Bakterie třídy Mollicutes byly již dříve nalezeny v žížalách *L. rubellus*, *L. terrestris* i *A. caliginosa* (Nechitaylo *et al.*, 2009; Singleton *et al.*, 2003). Nechitaylo *et al.*, (2009) popsali přítomnost nekultivovatelných Mollicutes podobných bakterií v orgánech, ve střevě i v obsahu střeva žížal. Singleton *et al.*, (2003) zjistili nový bakteriální klastř ze střeva žížaly *L. rubellus* příbuzný *Spiroplasma sp.* a *Mycoplasma capricolum*. V této práci třída Mollicutes zahrnovala bakteriální rod *Spiroplasma*. *Spiroplasma* byla taktéž objevena v zástupcích kmene členovců (Nechitaylo *et al.*, 2009). V chovné sklenici, kde byly žížaly vystaveny vyšší koncentraci mikrovláken po dobu 56 dní tak mohlo dojít k namnožení drobného hmyzu s bakterií *Spiroplasma* a následné kontaminaci žížal.

Dále byla u vzorků z obsahu střev žížal vystavených mikrovláknům o koncentraci 0 a 1 mg/kg sledována zvýšená relativní abundance bakterií Planctomycetia a Gammaproteobacteria. Lv *et al.*, (2018) zjistili nárůst bakteriálního kmene Planctomycetota v půdě, kde byla přítomna žížala *E. fetida* během vermikompostování. Mohlo se stát, že žížaly *Aporrectodea sp.* v těchto dvou případech mohly pozitivně ovlivnit vlastnosti půdy pro namnožení bakterií třídy Planctomycetia. Byla zaznamenána snížená abundance bakteriální třídy Bacillus, jejíž zástupci mohou degradovat složité organické látky jako je celulóza (Rastogi *et al.*, 2010) nebo mohou pomáhat při mineralizaci fosfátu a redukci dusíkatých sloučenin. Ve studiích, kde byly organismy vystaveny mikroplastům či jiným polutantům, byly zaznamenány zvýšené abundance bakterií třídy Bacillus (Wang *et al.*, 2019; Kuipa *et al.*, 2016; Baihetiyaer *et al.*, 2023; Zhu *et al.*, 2018). Zvýšenou abundanci bakterií třídy Bacillus přikládají autoři schopnosti těchto bakterií rozkládat plasty a jiné polutanty (Cameron *et al.*, 2020; Ragu *et al.*, 2024; Huerta *et al.*, 2018; Hadad *et al.*, 2005).

Byly pozorované změny v diverzitách mikrobiomů mezi vzorky. Signifikantně snížená bakteriální diverzita u vzorku ze střev žížal vystavených mikrovláknům o vyšší koncentraci (S56c1) může korelovat s nárůstem relativního zastoupení Mollicutes, viz Obrázek 20, str. 49. Signifikantně změněné diverzity ve vzorcích z obsahu střeva a z chovné půdy nevykazují žádný trend. Změny v diverzitách mohly být detekovány v důsledku měnících se podmínek, jako je vlhkost půdy, v chovných nádobách.

6.5 Extrakce imunitních buněk

Ani jednou z uvedených metod nebyl z žížal *Aporrectodea* sp. izolován dostatečný počet imunitních buněk (2×10^5) pro následné analýzy a měření pomocí cytometru. Navarro Pacheco *et al.*, (2021) a Semerád *et al.*, (2020) dokázali z žížal *E. fetida* pomocí pufru vyextrahovat potřebné množství imunitních buněk. Tento rozdíl může být dán tím, že Navarro Pacheco *et al.*, (2021) a Semerád *et al.*, (2020) použili žížalu *E. fetida*, zatímco v tomto pokusu bylo pracováno s žížalami *Aporrectodea* sp. Po komunikaci nyní již s paní doktorkou Natividad Isabel Navarro Pacheco a paní doktorkou RNDr. Petrou Procházkovou, Ph.D., obě tou dobou z Laboratoře buněčné a molekulární imunologie Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky bylo přistoupeno k dalším metodám extrakce imunitních buněk.

Buňky byly extrahovány pomocí Pasteurovy pipety (Suzuki *et al.*, 1995). Kwak *et al.*, (2014) pro extrakci imunitních buněk z žížal *E. andrei* a *Perionyx excavatus* použili úspěšně jehlu, kterou defekovaným žížalám zavedli pod opasek a nasáli tak coelomovou tekutinu. Stejně jako Garcia-Velasco *et al.*, (2019) použili k extrakci imunitních buněk z žížaly *E. fetida* jehlu. Rozdíl v úspěšnosti metody by opět mohl být v použití rozdílných žížalích druhů. Žížaly *Aporrectodea* sp. jsou malé žížaly, které po defekaci ztrácí objem těla a je těžké do žížaly Pasteurovu pipetu zavést tak, aby došlo k minimálnímu poškození žížaly, k zisku adekvátního počtu imunitních buněk a nedošlo k perforaci střeva. Extrakce imunitních buněk Pasteurovou pipetou je v případě žížal *Aporrectodea* sp. nevhodná metoda.

Dále bylo přistoupeno k metodě extrakce imunitních buněk pomocí elektrického napětí. Santocki *et al.*, (2016) použili k extrakci imunitních buněk z *E. andrei* napětí 4,5 V, stejně jako Homa *et al.*, (2021). Úspěšnou extrakci imunitních buněk z žížaly *E. fetida* zaznamenali i Singh *et al.*, (2020), kteří použili napětí 6 V. Opět jsou známy publikace pracující s žížalou rodu *Eisenia*, nebo jinými, ovšem žádná o žížalách *Aporrectodea* sp.

6.6 Necílená metabolomická analýza

Byly sledovány změny v metabolickém profilu žížal *Aporrectodea* sp. U žížal vystavených mikroplastům o koncentraci 1mg/kg po dobu 56 dní byla většina změněných zvýšených znaků anotována jako dipeptidy (viz Tabulka 2, příloha). Změny související s metabolismem aminokyselin po vystavení organismu mikroplastům byly zaznamenány již dříve (Qiao *et al.*, 2019; Wan *et al.*, 2019; Jin *et al.*, 2019; Ye *et al.*, 2021).

Chan *et al.*, (2023) sledovali po vystavení žížaly *E. euganiae* PE mikroplastům mírně zvýšenou přítomnost konkrétně leucyl-glycinu, který hraje roli v protizánětlivé reakci. Cao *et al.*, (2022) po vystavení žížaly *E. fetida* kombinaci mikroplastů s plastifikátorem tris (2-chloroethyl) fosfát sledovali naopak sníženou přítomnost znaků souvisejících s metabolismem aminokyselin, konkrétně znaky spjaté se syntézou alaninu, argininu, aspartátu, glutamátu, fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu. Snížený metabolismus aminokyselin může vést k zesílení reakcí citrátového cyklu a tím k přípravě organismu na stresové situace (Zhang *et al.*, 2021). Xu a Yu (2021) sledovali po vystavení žížaly *E. fetida* PS mikroplastům změnu v metabolismu alaninu, aspartátu a glutaminu.

U žížal vystavených mikroplastům o koncentraci 1mg/kg po dobu 56 dní byla sledována zvýšená přítomnost u znaku anotovaného jako L-galactonát a 3-dehydro-L-threonát, což jsou molekuly účastníci se metabolismu askorbátu a aldarátů, metabolismu pravděpodobně spjatého s oxidativním stresem (Kanehisa a Goto, 2000). Dále byla detekována zvýšená přítomnost znaku anotovaného jako 2,4-bis(acetamido)-2,4,6-trideoxy-beta-L-altropyranóza, molekuly účastníci se metabolismu aminosacharidů a nukleotidových sacharidů (Kanehisa a Goto, 2000). Dále byla sledována zvýšená přítomnost znaku anotovaného jako N- α -acetylcitrulin, molekuly účastníci se v biosyntetické dráze argininu, která je dále spjata se syntézou pyrimidinu, polyamidů a dalšími biodegradačními drahami (Wishart *et al.*, 2022). Byly sledovány i změny ve 3 znacích tentativně identifikovaných jako N- α -acetyl-L-2,4-diaminobutyryát, 1,6-anhydro-N-acetyl-beta-muramát a 4-oxo-L-proline, molekuly produkované bakteriálními kmeny. Jedná se pravděpodobně o kontaminaci, nebo chybné anotování molekuly programem. Dále byla sledována vysoká přítomnost znaku anotovaného jako 26 – hydroxybrasinolid. Jedná se steroidní fytohormon, tedy nejspíše o kontaminaci, která mohla vzniknout nedostatečným očištěním žížal určených na necílenou metabolomickou analýzu od půdy. Stejnou kontaminací mohou být i znaky, které byly anotovány jako 3-(7'-methylthio) heptyl malonová kyselina a 4 – hydroxykumarin, látky účastníci se metabolismu rostlin a hub (Bye a King, 1970; Kanehisa a Goto, 2000). U žížal vystavených mikroplastům o koncentraci 0,0265 mg/kg po dobu 56 dní byla též sledována zvýšená přítomnost 26 – hydroxybrasinolidu, 3-(7'-methylthio) heptyl malonové kyseliny a 4-hydroxykumarinu.

Látky rostlinného původu z pozřené zeminy by se mohly dostat do coelomové tekutiny přes střevo, které by bylo zároveň poškozeno kupříkladu mikroplasty. O pozření mikrovláken žížalami není

důkaz a pokud by došlo k pozření, neexistuje důkaz o poškození střev. Kdyby přeci jen došlo k pozření mikrovláken žížalami a poškození střeva a průniku rostlinných látek ze střeva do coelomu, byly by při pitvě vymyty dH₂O. Jedná se tedy s největší pravděpodobností o kontaminace z vnější části těla žížal vzniklé nedostatečným oplachem žížal.

U žížal vystaveným mikroplastům o koncentraci 0,0265 mg/kg po dobu 28 dní byla zaznamenána snížená přítomnost znaku tentativně identifikovaného jako sfinganin, látka spojená se signalizací a oxidací lipidů (Chan *et al.*, 2023; Kanehisa a Goto 2000). Xu a Yu (2021) detekovali naopak zvýšenou přítomnost sfinganinu, stejně jako Chan *et al.*, (2023). Snížená přítomnost sfinganinu by mohla naznačovat, že u žížal neprobíhal oxidativní stres.

Dále byla zaznamenána zvýšená přítomnost v látce anotované jako 7-methoxy-2,2,4-trimethyl-3-(4-methoxyfenyl)-2H-1-benzopyran a snížená přítomnost u 1-oktadekanoyl-2-(9Z,1Z-oktadekadienoyl)-3-O-[(N,N,N-trimethyl) homoserin-glycerolu. 7-methoxy-2,2,4-trimethyl-3-(4-methoxyfenyl)-2H-1-benzopyran je isoflavan, tudíž opět možná půdní kontaminace vzorku žížal (NCBI, 2024). 1-oktadekanoyl-2-(9Z,1Z-oktadekadienoyl)-3-O-[(N,N,N-trimethyl) homoserin-glycerol je látka patřící do skupiny betain lipidů, které se vyskytují u nižších eukaryotických organismů jako jsou řasy a houby (Christie W., 2024).

Ostatní znaky v podobě sumárního vzorce nebyly programem anotovány.

7 Závěr

Jedním z cílů diplomové práce bylo zjistit, zda se mikroplasty uvolňují z MTEX a pomocí flotačního experimentu a následné kvantitativní a kvalitativní analýzy stanovit přibližnou koncentraci mikroplastových vláken z půd. Výsledky experimentu potvrdily, že se vlákna z MTEX uvolňují a tvoří tak mikroplasty. Průměrný počet vláken v 1 kg suchých půd vystavených MTEX se pohyboval v rozmezí od 1075 do 5900 kusů. Černá netkaná PP MTEX je dalším zdrojem sekundárních mikroplastů uvolňujících se do půd.

Dalšími cíli diplomové práce bylo zjistit, zda a jaký vliv mají mikroplasty uvolněné z MTEX na střevní mikrobiom žížal *Aporrectodea* sp. a zda a jaký vliv mají na žížalí imunitní buňky a metabolom.

Výsledky neukazují žádnou změnu v relativním zastoupení střevní mikrobioty po vystavení žížal mikroplastům, stejně tak neukazují změnu mikrobioty v obsahu střeva žížal ani v chovné půdě. Mikrobiota se měnila jen v závislosti na místě, odkud byla odebrána (střeva, obsah střeva, chovná půda). Tento fakt je v souladu s dalšími studiemi. Dle výsledků nelze jednoznačně říci, zda mají mikroplasty vliv na střevní mikrobiom žížal. Byla pozorována změna v bakteriální diverzitě v závislosti na čase. V chovných sklenicích časem muselo docházet ke změnám podmínek a tím k ovlivnění mikrobioty.

Hypotéza o vlivu mikroplastů na imunitní buňky žížal nelze vyvrátit, ovšem ani potvrdit. Nebyl vyextrahován potřebný počet buněk na další analýzu pomocí cytometru. Přestože existují zavedené metody extrakce imunitních buněk z žížal, nebyly v tomto případě pro žížaly *Aporrectodea* sp. relevantní.

Výsledky necílené metabolomické analýzy u žížal vystavených mikroplastům z MTEX ukázaly změny ve znacích. Na změny neměla vliv koncentrace mikroplastů, spíše čas, po který byly žížaly mikroplastům vystaveny. Nejvíce změněných znaků vůči kontrole bylo pozorováno u žížal po 56 dnech. Dle výsledků nelze jednoznačně říci, zda mají mikroplasty vliv na metabolom žížal.

Vzhledem k tomu, že dochází k rozpadu MTEX, má smysl se do budoucna zabývat rozložitelnými materiály vhodnými k výrobě MTEX, či přejít na organické mulče.

Ačkoliv jsou výsledky diplomové práce týkající se škodlivosti mikroplastů z MTEX negativní, přinesly znalosti o modelovém organismu žížaly *Aporrectodea* sp, který je relevantním druhem žížal pro výzkum toxicity polutantů přítomných v reálném prostředí. Vzhledem ke stylu života těchto žížal je doporučeno mikroplasty a jiné polutanty zamíchat do chovné půdy, aby bylo jisté, že se žížaly s polutanty setkají, nebo chovat endogeické žížaly s aneickými, které by polutanty v opadu zabudovávaly do chovné půdy.

Oproti žížalám rodu *Eisenia* nebo *Lumbricus*, jsou žížaly *Aporrectodea* sp. malé a po defekaci ztrácí významnou část objem těla. Pitva je tak mnohem složitější než u žížal rodu *Eisenia* nebo *Lumbricus*. Metody extrakce imunitních buněk používaných pro jiné druhy žížal nejsou aplikovatelné

pro žížaly *Aporrectodea* sp. a bylo by nutno přistoupit k jiným metodám a zvážit jejich relevantnost, pokud by ty stejné žížaly po extrakci buněk měly být použity pro získání střevního mikrobiomu.

Také výtěžnost DNA ze střev žížal pomocí komerčních sad pro extrakci DNA byla velmi malá. Tzv. ruční metoda izolace DNA se v této práci osvědčila. Při izolaci DNA musely být spojeny vzorky střev z 10 žížal, aby bylo dosaženo koncentrace DNA vhodné na PCR.

Mikroplasty jsou perzistentní, prokazatelně všudypřítomné polutanty, jejichž vliv na biologické systémy ovšem zůstává neznámý. Existuje mnoho článků zpracovávajících téma vlivu mikroplastů na organismy, které se svým nastavením a výsledky liší. Pokud je organismus v umělém laboratorním prostředí vystaven mikroplastům a výsledky potvrdí toxický vliv mikroplastů, je otázka, zda tento výsledek může odpovídat dění v reálném prostředí. Zda byl daný organismus vystaven reálným environmentálním koncentracím, zda byly mikroplasty čisté, měly stejný tvar a tak dále. Tato práce se svým nastavením snažila napodobit reálné prostředí, proto byly žížaly kupříkladu chovány v půdě, ze které byly nasbírány. Z výsledků experimentu nelze jednoznačně říci, zda mají mikroplasty vliv na střevní mikrobiom žížal. Výsledky naznačují, že by přítomnost mikroplastů mohla mít vliv na metabolom žížal. Je možné, že samotné nastavení experimentu vytvořilo tak složitý systém, kde se nacházelo mnoho proměnných, které mohly ovlivnit případnou toxicitu mikroplastů.

Je ovšem zřejmé, že mikroplastů v životním prostředí bude nadále přibývat a budou stále přítomny v životním prostředí a měly by být dále zkoumány.

8 Bibliografie

- ABBASI, Sajjad, Andrew TURNER, Mohammad HOSEINI a Hoda AMIRI, 2021. Microplastics in the Lut and Kavir Deserts, Iran. *Environmental Science & Technology* [online]. 55(9), 5993–6000. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.1c00615
- ADHIKARI, Kaushik, Anton F ASTNER, Jennifer M DEBRUYN, Yingxue YU, Douglas G HAYES, Brian T O'CALLAHAN a Markus FLURY, 2023. Earthworms Exposed to Polyethylene and Biodegradable Microplastics in Soil: Microplastic Characterization and Microbial Community Analysis. *ACS Agricultural Science & Technology* [online]. 3(4), 340–349. Dostupné z: doi:10.1021/acsagscitech.2c00333
- AHMAD, S., M. A.S. RAZA, M. F. SALEEM, R. IQBAL, M. S. ZAHEER, I. HAIDER, M. U. ASLAM, M. ALI a I. H. KHAN, 2020. Significance of partial root zone drying and mulches for water saving and weed suppression in wheat. *Journal of Animal and Plant Sciences* [online]. 30(1), 154–162. ISSN 23098694. Dostupné z: doi:10.36899/japs.2020.1.0018
- AIRA, Manuel, Marcos PÉREZ-LOSADA, Keith A. CRANDALL a Jorge DOMÍNGUEZ, 2022. Composition, Structure and Diversity of Soil Bacterial Communities before, during and after Transit through the Gut of the Earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Microorganisms* [online]. 10(5). ISSN 20762607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10051025
- ALLEN, Steve, Deonie ALLEN, Vernon R PHOENIX, Gaël LE ROUX, Pilar DURÁNTEZ JIMÉNEZ, Anaëlle SIMONNEAU, Stéphane BINET a Didier GALOP, 2019. Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment. *Nature Geoscience* [online]. 12(5), 339–344. ISSN 1752-0908. Dostupné z: doi:10.1038/s41561-019-0335-5
- ALOMAR, C, A SUREDA, X CAPÓ, B GUIJARRO, S TEJADA a S DEUDERO, 2017. Microplastic ingestion by *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758 fish and its potential for causing oxidative stress. *Environmental Research* [online]. 159, 135–142. ISSN 0013-9351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2017.07.043
- AN, Qiuying, Tong ZHOU, Ce WEN a Changzhou YAN, 2023. The effects of microplastics on heavy metals bioavailability in soils: a meta-analysis. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 460, 132369 [vid. 2024-04-07]. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2023.132369
- ANDRIOLO, Umberto a Gil GONÇALVES, 2023. The octopus pot on the North Atlantic Iberian coast: A plague of plastic on beaches and dunes. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 192, 115099 [vid. 2024-02-21]. ISSN 0025-326X. Dostupné z: doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2023.115099
- ARIENZO, Michele, Luciano FERRARA a Marco TRIFUOGGI, 2021. The dual role of microplastics in marine environment: Sink and vectors of pollutants [online]. 1. červen 2021. B.m.: MDPI AG. ISSN 20771312. Dostupné z: doi:10.3390/jmse9060642
- ASTAYKINA, Angelika, Rostislav STRELETSKII, Mikhail MASLOV, George KRASNOV a Victor GORBATOV, 2022. Effects of Three Pesticides on the Earthworm *Lumbricus terrestris* Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology* [online]. 13. ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2022.853535
- BAIHETIYAER, Baikerouzi, Nan JIANG, Xianxu LI, Jie SONG, Jun WANG, Xiaoteng FAN, Yajie ZUO a Xianqiang YIN, 2023. Exploring the toxicity of biodegradable microplastics and imidacloprid to earthworms (*Eisenia fetida*) from morphological and gut microbial perspectives. *Environmental Pollution* [online]. 337, 122547. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122547

BANNICK, Claus Gerhard, Regine SZEWZYK, Mathias RICKING, Sara SCHNIEGLER, Nathan OBERMAIER, Anne Kathrin BARTHEL, Korinna ALTMANN, Paul EISENTRAUT a Ulrike BRAUN, 2019. Development and testing of a fractionated filtration for sampling of microplastics in water. *Water Research* [online]. 149, 650–658 [vid. 2024-04-02]. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/J.WATRES.2018.10.045

BAO, Yuanyuan, Jan DOLFING, Baozhan WANG, Ruirui CHEN, Miansong HUANG, Zhongpei LI, Xiangui LIN a Youzhi FENG, 2019. Bacterial communities involved directly or indirectly in the anaerobic degradation of cellulose. *Biology and Fertility of Soils* [online]. 55(3), 201–211. ISSN 1432-0789. Dostupné z: doi:10.1007/s00374-019-01342-1

BARBOZA, Luís Gabriel A., Clara LOPES, Patrícia OLIVEIRA, Filipa BESSA, Vanessa OTERO, Bruno HENRIQUES, Joana RAIMUNDO, Miguel CAETANO, Carlos VALE a Lúcia GUILHERMINO, 2020. Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. *Science of The Total Environment* [online]. 717, 134625 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2019.134625

BAROIS Isabelle and LAVELLE Patrick, 1986. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). *Soil Biol. Biochem.* 18:539–41

BAROIS, I., G. VILLEMEN, P. LAVELLE a F. TOUTAIN, 1993. Transformation of the soil structure through *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta) intestinal tract. *Soil Structure/Soil Biota Interrelationships* [online]. 57–66 [vid. 2024-03-24]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-81490-6.50010-8

BART, Sylvain, Joël AMOSSÉ, Christopher N. LOWE, Christian MOUGIN, Alexandre R.R. PÉRY a Céline PELOSI, 2018. *Aporrectodea caliginosa*, a relevant earthworm species for a posteriori pesticide risk assessment: current knowledge and recommendations for culture and experimental design. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 25(34), 33867–33881. ISSN 16147499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-018-2579-9

BART, Sylvain, Alexandre BARRAUD, Joël AMOSSÉ, Alexandre R.R. PÉRY, Christian MOUGIN a Céline PELOSI, 2019a. Effects of two common fungicides on the reproduction of *Aporrectodea caliginosa* in natural soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 181, 518–524 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/J.ECOENV.2019.06.049

BART, Sylvain, Céline PELOSI, Sylvie NÉLIEU, Isabelle LAMY a Alexandre R R PÉRY, 2020. An energy-based model to analyze growth data of earthworms exposed to two fungicides. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 27(1), 741–750. ISSN 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-019-06985-z

BART, Sylvain, Céline PELOSI a Alexandre R.R. PÉRY, 2019b. Towards a better understanding of the life cycle of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*: New data and energy-based modelling. *Pedobiologia* [online]. 77, 150592 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0031-4056. Dostupné z: doi:10.1016/J.PEDOBI.2019.150592

BASKER, A, A N MACGREGOR a J H KIRKMAN, 1993. Exchangeable potassium and other cations in non-ingested soil and casts of two species of pasture earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 25(12), 1673–1677. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90169-C

BELOQUI, Ana, Taras Y. NECHITAYLO, Nieves LÓPEZ-CORTÉS, Azam GHAZI, María Eugenia GUAZZARONI, Julio POLAINA, Axel W. STRITTMATTER, Oleg REVA, Agnes WALICZEK, Michail M. YAKIMOV, Olga V. GOLYSHINA, Manuel FERRER a Peter N. GOLYSHIN, 2010. Diversity of glycosyl hydrolases from cellulose-depleting communities enriched from casts of two earthworm species. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 76(17), 5934–5946. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00902-10

BERGMANN, Melanie, Sophia MÜTZEL, Sebastian PRIMPKE, Mine B TEKMAN, Jürg TRACHSEL a Gunnar GERDTS, 2019. White and wonderful? Microplastics prevail in snow from the Alps to the Arctic. *Science Advances* [online]. 5(8), eaax1157. Dostupné z: doi:10.1126/sciadv.aax1157

BERGMANN, Melanie, Vanessa WIRZBERGER, Thomas KRUMPEN, Claudia LORENZ, Sebastian PRIMPKE, Mine B TEKMAN a Gunnar GERDTS, 2017. High Quantities of Microplastic in Arctic Deep-Sea Sediments from the HAUSGARTEN Observatory. *Environmental Science & Technology* [online]. 51(19), 11000–11010. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.7b03331

BERIOT, Nicolas, Joost PEEK, Raul ZORNOZA, Violette GEISSEN a Esperanza HUERTA LWANGA, 2021. Low density-microplastics detected in sheep faeces and soil: A case study from the intensive vegetable farming in Southeast Spain. *Science of The Total Environment* [online]. 755, 142653 [vid. 2024-04-02]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2020.142653

BHATTACHARJEE, Linkon, Farhad JAZAEI a Maryam SALEHI, 2023. Insights into the mechanism of plastics' fragmentation under abrasive mechanical forces: An implication for agricultural soil health. *Clean - Soil, Air, Water* [online]. 51(8). ISSN 18630669. Dostupné z: doi:10.1002/clen.202200395

BLAKEMORE, Robert John., 2006. *Cosmopolitan earthworms: an eco-taxonomic guide to the peregrine species of the world.*

BLOUIN, M, M E HODSON, E A DELGADO, G BAKER, L BRUSSAARD, K R BUTT, J DAI, L DENDOOVEN, G PERES, J E TONDOH, D CLUZEAU a J.-J. BRUN, 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science* [online]. 64(2), 161–182. ISSN 1351-0754. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/ejss.12025

BOAG, B, L F PALMER', R NEILSON', R LEGG' a S J CHAMBERS2, 1997. Distribution, prevalence and intensity of earthworm populations in arable land and grassland in Scotland. *Annals of Applied Biology*. 130, 153–165.

BORST, H. L., WOODBURN, Russel, 1942. The effect of mulching and methods of cultivation on run-off and erosion from Muskingum silt loam

BOSTROM, U., 1988. Growth and cocoon production by the earthworm *Aporrectodea caliginosa* in soil mixed with various plant materials. *Pedobiologia* [online]. 32(1–2), 77–80 [vid. 2024-04-10]. ISSN 0031-4056. Dostupné z: doi:10.1016/S0031-4056(23)00218-4

BOSTRÖM, U. a LOFS, A., 1996. Annual population dynamics of earthworms and cocoon production by *Aporrectodea caliginosa* in a meadow fescue ley

BOUCHÉ, M B, 1977. Strategies lombriciennes. *Ecological Bulletins* [online]. (25), 122–132. ISSN 03466868. Dostupné z: http://www.jstor.org/stable/20112572

BOUCHER, Julien a FRIOT, Damien, 2017. Primary Microplastics in the Oceans: A Global Evaluation of Sources. IUCN, Gland, 43 p. DOI: https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2017.01.en

- BRAMI, C, A R GLOVER, K R BUTT a C N LOWE, 2017. Avoidance, biomass and survival response of soil dwelling (endogeic) earthworms to OECD artificial soil: potential implications for earthworm ecotoxicology. *Ecotoxicology* [online]. 26(4), 576–579. ISSN 1573-3017. Dostupné z: doi:10.1007/s10646-017-1788-1
- BROWN, George G, 1995. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? In: H P COLLINS, G P ROBERTSON a M J KLUG, ed. *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity: Proceedings of the International Symposium on Soil Biodiversity, held at Michigan State University, East Lansing, May 3–6, 1993* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 247–269. ISBN 978-94-011-0479-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-011-0479-1_22
- BUTT, Kevin Richard, Camille MÉLINE a Guénola PÉRÈS, 2020. Marine macroalgae as food for earthworms: growth and selection experiments across ecotypes. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 27(27), 33493–33499. ISSN 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-020-07666-y
- BYE, A a Ad H K KING, 1970. The Biosynthesis of 4-Hydroxycoumarin and Dicoumarol by *Aspergillus fumigatus* Fresenius 237. *Biochem. J* [online]. 117, 237–245. Dostupné z: doi:10.1042/bj1170237
- BYZOV, B. A., T. Yu NECHITAYLO, B. K. BUMAZHKIN, A. V. KURAKOV, P. N. GOLYSHIN a D. G. ZVYAGINTSEV, 2009. Culturable microorganisms from the earthworm digestive tract. *Microbiology* [online]. 78(3), 360–368. ISSN 00262617. Dostupné z: doi:10.1134/S0026261709030151
- CAMERON, G R, 1932. Inflammation in earthworms. *The Journal of Pathology and Bacteriology* [online]. 35(6), 933–972. ISSN 0368-3494. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/path.1700350613
- CAMERON, Roberts, Edwards SABRINA, Vague MORGAN, León-Zayas ROSA, Scheffer HENRY, Chan GAYLE, Swartz Natasja A a Mellies Jay L, 2020. Environmental Consortium Containing *Pseudomonas* and *Bacillus* Species Synergistically Degrades Polyethylene Terephthalate Plastic. *mSphere* [online]. 5(6), 10.1128/msphere.01151-20. Dostupné z: doi:10.1128/msphere.01151-20
- CAMPBELL, Neil A. and REECE, Jane B., 2006. *Biologie*. Brno: Computer Press. ISBN 80-251-1178-4. (str. 659)
- CAO, Jing, Qian WANG, Yumeng LEI, Xiaofeng JIANG a Mei LI, 2022. Accumulation of microplastics and Tcep pollutants in agricultural soil: Exploring the links between metabolites and gut microbiota in earthworm homeostasis. *Environment International* [online]. 170, 107590 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENVINT.2022.107590
- CAPORASO, J. Gregory, Christian L. LAUBER, William A. WALTERS, Donna BERG-LYONS, Catherine A. LOZUPONE, Peter J. TURNBAUGH, Noah FIERER a Rob KNIGHT, 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 108(SUPPL. 1), 4516–4522. ISSN 10916490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1000080107
- CAPOWIEZ, Yvan, Stéphane SAMMARTINO a Eric MICHEL, 2014. Burrow systems of endogeic earthworms: Effects of earthworm abundance and consequences for soil water infiltration. *Pedobiologia* [online]. 57(4–6), 303–309. ISSN 00314056. Dostupné z: doi:10.1016/j.pedobi.2014.04.001
- CARR, Steve A, Jin LIU a Arnold G TESORO, 2016. Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Research* [online]. 91, 174–182. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2016.01.002

- ÇOBANOĞLU, Hayal, Murat BELIVERMIŞ, Ercan SIKDOKUR, Önder KILIÇ a Akın ÇAYIR, 2021. Genotoxic and cytotoxic effects of polyethylene microplastics on human peripheral blood lymphocytes. *Chemosphere* [online]. 272, 129805. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2021.129805
- COLE, Matthew, Pennie LINDEQUE, Claudia HALSBAND a Tamara S. GALLOWAY, 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review [online]. *prosinec* 2011. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.025
- CORRADINI, Fabio, Pablo MEZA, Raúl EGUILUZ, Francisco CASADO, Esperanza HUERTA-LWANGA a Violette GEISSEN, 2019. Evidence of microplastic accumulation in agricultural soils from sewage sludge disposal. *Science of The Total Environment* [online]. 671, 411–420 [vid. 2024-04-02]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2019.03.368
- CRAWFORD, D L a J B SUTHERLAND, 1979. Role of actinomycetes in the decomposition of lignocellulose [online]. 20. Dostupné z: <https://www.osti.gov/biblio/5099001>
- CROSSMAN, Jill, Rachel R. HURLEY, Martyn FUTTER a Luca NIZZETTO, 2020. Transfer and transport of microplastics from biosolids to agricultural soils and the wider environment. *Science of The Total Environment* [online]. 724, 138334 [vid. 2024-04-07]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2020.138334
- CURRY, James P., Paul DOHERTY, Gordon PURVIS a Olaf SCHMIDT, 2008. Relationships between earthworm populations and management intensity in cattle-grazed pastures in Ireland. *Applied Soil Ecology* [online]. 39(1), 58–64 [vid. 2024-03-19]. ISSN 0929-1393. Dostupné z: doi:10.1016/J.APSOIL.2007.11.005
- DAI, Jun, Thierry BECQUER, James Henri ROUILLER, Georges REVERSAT, France BERNHARD-REVERSAT, Johanne NAHMANI a Patrick LAVELLE, 2004. Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA-extractable metals in soils. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 36(1), 91–98 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:10.1016/J.SOILBIO.2003.09.001
- DANIEL, O a J M ANDERSON, 1992. Microbial biomass and activity in contrasting soil materials after passage through the gut of the earthworm *Lumbricus rubellus* hoffmeister. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 24(5), 465–470. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90209-G](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90209-G)
- DEPKAT-JAKOB, Peter S., Hunger SINDY, Schulz KRISTIN, Brown George G, Tsai Siu M a Drake Harold L, 2012. Emission of Methane by *Eudrilus eugeniae* and Other Earthworms from Brazil. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 78(8), 3014–3019. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.07949-11
- DEVASINGHE, Udeni, Kaushal PREMARATHNE a U R SANGAKKARA, 2015. Impact of rice straw mulch on growth, yield components and yield of direct seeded lowland rice (*Oryza sativa* L.). *Tropical Agricultural Research* [online]. 24, 325. Dostupné z: doi:10.4038/tar.v24i4.8018
- DING, Jing, Dong ZHU, Hong-Tao WANG, Simon Bo LASSEN, Qing-Lin CHEN, Gang LI, Min LV a Yong-Guan ZHU, 2020a. Dysbiosis in the Gut Microbiota of Soil Fauna Explains the Toxicity of Tire Tread Particles. *Environmental Science & Technology* [online]. 54(12), 7450–7460. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.0c00917
- DING, Ling, Shuaiya ZHANG, Xiaoyu WANG, Xiaomei YANG, Chutian ZHANG, Yanbing QI a Xuetao GUO, 2020b. The occurrence and distribution characteristics of microplastics in the agricultural soils

of Shaanxi Province, in north-western China. *Science of The Total Environment* [online]. 720, 137525 [vid. 2024-04-07]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2020.137525

DING, Ruiyang, Yueyue CHEN, Xuemin SHI, Yang LI, Yang YU, Zhiwei SUN a Junchao DUAN, 2024. Size-dependent toxicity of polystyrene microplastics on the gastrointestinal tract: Oxidative stress related-DNA damage and potential carcinogenicity. *Science of The Total Environment* [online]. 912, 169514 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2023.169514

DOELLE, Monica B, Robyn J MILLICHIP a Horst W DOELLE, 1989. Production of ethanol from corn using inoculum cascading of *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry* [online]. 24, 137–140. Dostupné z: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:94128574>

DON, Axel, Bert STEINBERG, Ingo SCHÖNING, Karin PRITSCH, Monika JOSCHKO, Gerd GLEIXNER a Ernst Detlef SCHULZE, 2008. Organic carbon sequestration in earthworm burrows. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 40(7), 1803–1812. ISSN 00380717. Dostupné z: doi:10.1016/j.soilbio.2008.03.003

DONG, Huike, Xiaoping WANG, Li XU, Jiannan DING a Frank WANIA, 2023. A Flow-through Passive Sampler for Microplastics in Air. *Environmental Science & Technology* [online]. 57(6), 2362–2370. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.2c07016

DUIS, Karen a Anja COORS, 2016. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects [online]. 1. prosinec 2016. B.m.: Springer Verlag. ISSN 21904715. Dostupné z: doi:10.1186/s12302-015-0069-y

EDWARDS, Clive A., 1995. Historical overview of vermicomposting. *Biocycle*, 36, 56-58.

ELYAMINE, Ali Mohamed, Javaria AFZAL, Muhammad Shoaib RANA, Muhammad IMRAN, Miaomiao CAI a Chengxiao HU, 2018. Phenanthrene mitigates cadmium toxicity in earthworms *Eisenia fetida* (Epigeic specie) and *Aporrectodea caliginosa* (endogeic specie) in soil. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 15(11). ISSN 16604601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph15112384

ELYAMINE, Ali Mohamed a Chengxiao HU, 2020. Earthworms and rice straw enhanced soil bacterial diversity and promoted the degradation of phenanthrene. *Environmental Sciences Europe* [online]. 32(1), 124. ISSN 2190-4715. Dostupné z: doi:10.1186/s12302-020-00400-y

EMMERT, E.M., 1954. University of Kentucky builds a greenhouse covered with polyethylene. *Ag News Letter* 22, 2.

EMMERT, Emery Myers, 1957. Black polyethylene for mulching vegetables. In: *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* p. 464-469.

ERIKSEN-HAMEL, Nikita S. a Joann K. WHALEN, 2006. Growth rates of *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta: Lumbricidae) as influenced by soil temperature and moisture in disturbed and undisturbed soil columns. *Pedobiologia* [online]. 50(3), 207–215 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0031-4056. Dostupné z: doi:10.1016/J.PEDOBI.2005.10.008

ERIKSEN-HAMEL, Nikita S. a Joann K. WHALEN, 2007. Competitive interactions affect the growth of *Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta: Lumbricidae) in single- and mixed-species laboratory cultures. *European Journal of Soil Biology* [online]. 43(3), 142–150 [vid. 2024-04-08]. ISSN 1164-5563. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJSOBI.2006.11.005

- ERNST, Gregor, Daniel FELTEN, Michael VOHLAND a Christoph EMMERLING, 2009. Impact of ecologically different earthworm species on soil water characteristics. *European Journal of Soil Biology* [online]. 45(3), 207–213. ISSN 11645563. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejsobi.2009.01.001
- ERSÉUS, Christer, Bronwyn W. WILLIAMS, Kevin M. HORN, Kenneth M. HALANYCH, Scott R. SANTOS, Samuel W. JAMES, Michel CREUZÉ DES CHÂTELLIERS a Frank E. ANDERSON, 2020. Phylogenomic analyses reveal a Palaeozoic radiation and support a freshwater origin for clitellate annelids. *Zoologica Scripta* [online]. 49(5), 614–640. ISSN 14636409. Dostupné z: doi:10.1111/zsc.12426
- ESSEL, Roland, Linda ENGEL, Michael CARUS, Ralph Heinrich AHRENS, 2015. Sources of microplastics relevant to marine protection in Germany. *Texte 64/2015*. Dessau-Roßlau: German Federal Environment Agency, dostupné z: <https://www.umweltbundesamt.de/en/publikationen/sources-of-microplastics-relevant-to-marine>
- FAHEY, Timothy J., Joseph B. YAVITT, Ruth E. SHERMAN, John C. MAERZ, Peter M. GROFFMAN, Melany C. FISK a Patrick J. BOHLEN, 2013. Earthworm effects on the incorporation of litter C and N into soil organic matter in a sugar maple forest. *Ecological Applications* [online]. 23(5), 1185–1201. ISSN 10510761. Dostupné z: doi:10.1890/12-1760.1
- FENDALL, Lisa S. a Mary A. SEWELL, 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 58(8), 1225–1228. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2009.04.025
- FERNÁNDEZ, Rosa, Ana ALMODÓVAR, Marta NOVO, Bárbara SIMANCAS a Darío J. DÍAZ COSÍN, 2012. Adding complexity to the complex: New insights into the phylogeny, diversification and origin of parthenogenesis in the Aporrectodea caliginosa species complex (Oligochaeta, Lumbricidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]. 64(2), 368–379 [vid. 2024-03-19]. ISSN 1055-7903. Dostupné z: doi:10.1016/J.YMPEV.2012.04.011
- FRIAS, J.P.G.L. a Roisin NASH, 2019. Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 138, 145–147. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2018.11.022
- FRIEND, J NEWTON, 1912. AERATION OF THE SOIL BY EARTHWORMS. *Science Progress in the Twentieth Century (1906-1916)* [online]. 6(23), 393–401. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/43427175>
- GALAFASSI, Silvia, Luca NIZZETTO a Pietro VOLTA, 2019. Plastic sources: A survey across scientific and grey literature for their inventory and relative contribution to microplastics pollution in natural environments, with an emphasis on surface water. *Science of The Total Environment* [online]. 693, 133499. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.305
- GARCIA-VELASCO, N., A. IRIZAR, E. URIONABARRENETXEA, J. J. SCOTT-FORDSMAND a M. SOTO, 2019. Selection of an optimal culture medium and the most responsive viability assay to assess AgNPs toxicity with primary cultures of *Eisenia fetida* coelomocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 183, 109545 [vid. 2024-04-12]. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/J.ECOENV.2019.109545
- GARGOURI, Boutheina, Fatma KARRAY, Najla MHIRI, Fathi ALOUI a Sami SAYADI, 2014. Bioremediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soil by bacterial consortium isolated from an industrial wastewater treatment plant. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* [online]. 89(7), 978–987. ISSN 10974660. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.4188

GARDNER, C.M.K. LARYEA, K.B. UNGER, P.W. (1999): Soil Physical Constraints to Plant Growth and Crop Production. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), [vid: 18.04.2024], Dostupné z: https://books.google.cz/books/about/Soil_Physical_Constraints_to_Plant_Growth.html?id=3JYMcgAACAAJ&redir_esc=y,

GILBERT, Jack A. a Josh D. NEUFELD, 2014. „Life in a germ-free world“: Isolating life from the laboratory animal to the bubble boy [online]. 2012. ISSN 00075140. Dostupné z: doi:10.1353/bhm.2012.0028

HABIB, Syahir, Anastasia IRUTHAYAM, Mohd Yunus ABD SHUKOR, Siti Aisyah ALIAS, Jerzy SMYKLA a Nur Adeela YASID, 2020. Biodeterioration of Untreated Polypropylene Microplastic Particles by Antarctic Bacteria. *Polymers* [online]. 12(11), 2616. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12112616

HADAD, D, S GERESH a A SIVAN, 2005. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 98(5), 1093–1100. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02553.x

HAVLÍČKOVÁ, Lucie. Využití analytické pyrolýzy pro detekci plastů a mikroplastů v ŽP [online]. Praha, 2022 [cit. 2024-03-25]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/171811>. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D., DSc.

HOANG, T. T.T., B. A. NGUYEN, N. N.Q. PHAM, N. B. NGUYEN, T. K.T. TRAN, T. C.L. TU, T. D. HUYNH, T. N.T. NGUYEN, T. P.Q. PHAM, T. V. NGUYEN, T. L. NGUYEN a Q. H. LE, 2022. The potential emission of personal care products derived plastic microbeads: a case study of Ho Chi Minh City, Vietnam. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science [online]. B.m.: IOP Publishing Ltd. ISSN 17551315. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/964/1/012013

HOBBELEN, P. H.F., J. E. KOOLHAAS a C. A.M. VAN GESTEL, 2006. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environmental Pollution* [online]. 144(2), 639–646 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENVPOL.2006.01.019

HOEKE, Sya, Jikke VAN WIJNEN, Harold KRIKKE, Ansje LÖHR a Ad M J RAGAS, 2024. Mapping the tire supply chain and its microplastics emissions using a multi-stakeholder approach. *Resources, Conservation and Recycling* [online]. 203, 107389. ISSN 0921-3449. Dostupné z: doi:10.1016/j.resconrec.2023.107389

HOLMSTRUP, Martin, 2001. Sensitivity of life history parameters in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to small changes in soil water potential. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 33(9), 1217–1223 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:10.1016/S0038-0717(01)00026-8

HOMA, Joanna, Alina KLOSOWSKA a Magdalena CHADZINSKA, 2021. Arginase activity in eisenia andrei coelomocytes: Function in the earthworm innate response. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 22(7). ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22073687

HORN, Marcus A., Ralph MERTEL, Matthias GEHRE, Matthias KÄSTNER a Harold L. DRAKE, 2006. In vivo emission of dinitrogen by earthworms via denitrifying bacteria in the gut. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 72(2), 1013–1018. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.72.2.1013-1018.2006

HORN, Marcus A., Andreas SCHRAMM a Harold L. DRAKE, 2003. The earthworm gut: An ideal habitat for ingested N₂O-producing microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 69(3), 1662–1669. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.69.3.1662-1669.2003

HSU, Gen Chang, Katalin SZLAVECZ, Csaba CSUZDI, Michael BERNARD a Chih Han CHANG, 2023. Ecological groups and isotopic niches of earthworms. *Applied Soil Ecology* [online]. 181, 104655 [vid. 2024-03-19]. ISSN 0929-1393. Dostupné z: doi:10.1016/J.APSSOIL.2022.104655

HU, Kunsheng, Peng ZHOU, Yangyang YANG, Tony HALL, Gang NIE, Yu YAO, Xiaoguang DUAN a Shaobin WANG, 2022. Degradation of Microplastics by a Thermal Fenton Reaction. *ACS ES and T Engineering* [online]. 2(1), 110–120. ISSN 26900645. Dostupné z: doi:10.1021/acsestengg.1c00323

HUANG, Yi, Qin LIU, Weiqian JIA, Changrong YAN a Jie WANG, 2020. Agricultural plastic mulching as a source of microplastics in the terrestrial environment. *Environmental Pollution* [online]. 260, 114096. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2020.114096

HUANG, Yi, Yanran ZHAO, Jie WANG, Mengjun ZHANG, Weiqian JIA a Xiao QIN, 2019. LDPE microplastic films alter microbial community composition and enzymatic activities in soil. *Environmental Pollution* [online]. 254, 112983 [vid. 2024-04-07]. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENVPOL.2019.112983

HUERTA LWANGA, Esperanza, Hennie GERTSEN, Harm GOOREN, Piet PETERS, Tamás SALÁNKI, Martine VAN DER PLOEG, Ellen BESSELING, Albert A. KOELMANS a Violette GEISSEN, 2016. Microplastics in the Terrestrial Ecosystem: Implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Environmental Science and Technology* [online]. 50(5), 2685–2691. ISSN 15205851. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.5b05478

HUERTA LWANGA, Esperanza, Binita THAPA, Xiaomei YANG, Henny GERTSEN, Tamás SALÁNKI, Violette GEISSEN a Paolina GARBEVA, 2018. Decay of low-density polyethylene by bacteria extracted from earthworm's guts: A potential for soil restoration. *Science of The Total Environment* [online]. 624, 753–757. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.144

HUTCHESON, Kermit, 1970. A test for comparing diversities based on the shannon formula. *Journal of Theoretical Biology* [online]. 29(1), 151–154. ISSN 0022-5193. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/0022-5193(70)90124-4

HYEON, Yejin, Soyoun KIM, Eunjin OK a Chanhyuk PARK, 2023. A fluid imaging flow cytometry for rapid characterization and realistic evaluation of microplastic fiber transport in ceramic membranes for laundry wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal* [online]. 454, 140028. ISSN 1385-8947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2022.140028

CHALKER-SCOTT, Linda, 2007. Impact of Mulches on Landscape Plants and the Environment — A Review. *Journal of Environmental Horticulture* [online]. 25(4), 239–249. ISSN 0738-2898. Dostupné z: doi:10.24266/0738-2898-25.4.239

CHAN, Wan Ting, Carl Angelo MEDRIANO a Sungwoo BAE, 2023. Unveiling the impact of short-term polyethylene microplastics exposure on metabolomics and gut microbiota in earthworms (*Eudrilus euganiae*). *Journal of Hazardous Materials* [online]. 460, 132305 [vid. 2024-04-03]. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2023.132305

CHANG, Xingping, Yang SUN, Lixia ZHAO, Xiaojing LI, Side YANG, Liping WENG a Yongtao LI, 2021. Exposure to fomesafen alters the gut microbiota and the physiology of the earthworm *Pheretima*

guillelmi. *Chemosphere* [online]. 284, 131290 [vid. 2024-04-11]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131290

CHEN, Jie, Jun TAO, Hua ZHANG a Wei GU, 2023. Effects of residue types and plastic mulch on earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Duges, 1828) within mesocosms at a salt-affected soil. *Archives of Agronomy and Soil Science* [online]. 69(7), 1055–1070. ISSN 0365-0340. Dostupné z: doi:10.1080/03650340.2022.2052050

CHEN, Yuling, Xiaoning LIU, Yifei LENG a Jun WANG, 2020. Defense responses in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 187, 109788 [vid. 2024-03-19]. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/J.ECOENV.2019.109788

CHENG, Yali, Wenhui SONG, Huimei TIAN, Kaihua ZHANG, Bing LI, Zhongkun DU, Wen ZHANG, Jinhua WANG, Jun WANG a Lusheng ZHU, 2021. The effects of high-density polyethylene and polypropylene microplastics on the soil and earthworm *Metaphire guillelmi* gut microbiota. *Chemosphere* [online]. 267, 129219 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.129219

CHEUNG, Pui Kwan a Lincoln FOK, 2017. Characterisation of plastic microbeads in facial scrubs and their estimated emissions in Mainland China. *Water Research* [online]. 122, 53–61 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/J.WATRES.2017.05.053

CHRISTIE William W., 2024. Betaine Lipids. *The Lipid web* [online] [vid. 2024-04-28]. Dostupné z: https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/lipids/complex/betaine/index.htm

CHUBARENKO, Irina a Natalia STEPANOVA, 2017. Microplastics in sea coastal zone: Lessons learned from the Baltic amber. *Environmental Pollution* [online]. 224, 243–254 [vid. 2024-04-02]. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENVPOL.2017.01.085

IHSSEN, Julian, Marcus A. HORN, Carola MATTHIES, Anita GÖSSNER, Andreas SCHRAMM a Harold L. DRAKE, 2003. N₂O-producing microorganisms in the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* are indicative of ingested soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 69(3), 1655–1661. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.69.3.1655-1661.2003

© Illumina 2010, Inc. All rights reserved. Illumina, illuminaDx, Solexa, Making Sense Out of Life, Oligator, Sentrix, GoldenGate, GoldenGate Indexing, DASL, BeadArray, Array of Arrays, Infinium, BeadXpress, VeraCode, IntelliHyb, iSelect, CSpPro, GenomeStudio, Genetic Energy, HiSeq and HiScan are registered trademarks or trademarks of Illumina, Inc. All other brands and names contained herein are the property of their respective owners. Pub. No. 770-2007-002 Current as of 11 October 2010

IMHOF, Hannes K, Christian LAFORSCH, Alexandra C WIESHEU, Johannes SCHMID, Philipp M ANGER, Reinhard NIESSNER a Natalia P IVLEVA, 2016. Pigments and plastic in limnetic ecosystems: A qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes. *Water Research* [online]. 98, 64–74. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2016.03.015

INGOLD, Terry S., 1993. *Geotextiles and Geomembranes Handbook 1st Edition* [online]. 1. vyd. B.m.: Elsevier Advanced Technology [vid. 2024-04-29]. ISBN 1483292622. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=V1XgBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=INGOLD,+Terry+S.+\(ed.\).+Geotextiles+and+geomembranes+handbook.+Elsevier,+2013&ots=0G6UzU5ftQ&sig=IXuyy60s7PIM5CxqKRfHhbXXk0A&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=V1XgBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=INGOLD,+Terry+S.+(ed.).+Geotextiles+and+geomembranes+handbook.+Elsevier,+2013&ots=0G6UzU5ftQ&sig=IXuyy60s7PIM5CxqKRfHhbXXk0A&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

JAIN, Kimi, H. BHUNIA a M. Sudhakara REDDY, 2022. Degradation of polypropylene-poly-L-lactide blends by *Bacillus* isolates: a microcosm and field evaluation [online]. 2022. B.m.: Taylor and Francis Ltd. ISSN 15476529. Dostupné z: doi:10.1080/10889868.2021.1886037

JENKINSON, David, 1963. The priming action. In: Report of the FAO/IAEA Technical Meeting Organized by the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the International Atomic Energy Agency in cooperation with the International Soil Society Brunswick-Volkenrode, 9-14 September, 1963. Pergamon Press, 1963. p. 199-208.

JEON, Jong-Min, So-Jin PARK, Tae-Rim CHOI, Jeong-Hoon PARK, Yung-Hun YANG a Jeong-Jun YOON, 2021. Biodegradation of polyethylene and polypropylene by *Lysinibacillus* species JJY0216 isolated from soil grove. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 191, 109662. ISSN 0141-3910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2021.109662

JIANG, Changbo, Lingshi YIN, Zhiwei LI, Xiaofeng WEN, Xin LUO, Shuping HU, Hanyuan YANG, Yuannan LONG, Bin DENG, Lingzhi HUANG a Yizhuang LIU, 2019a. Microplastic pollution in the rivers of the Tibet Plateau. *Environmental Pollution* [online]. 249, 91–98. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.03.022

JIANG, Xiaofeng, Yeqian CHANG, Tong ZHANG, Yu QIAO, Göran KLOBUČAR a Mei LI, 2020. Toxicological effects of polystyrene microplastics on earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Pollution* [online]. 259, 113896 [vid. 2024-03-19]. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENVPOL.2019.113896

JIANG, Xiaofeng, Hao CHEN, Yuanchen LIAO, Ziqi YE, Mei LI a Göran KLOBUČAR, 2019b. Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba*. *Environmental Pollution* [online]. 250, 831–838. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.04.055

JIN, Yuanxiang, Liang LU, Wenqing TU, Ting LUO a Zhengwei FU, 2019. Impacts of polystyrene microplastic on the gut barrier, microbiota and metabolism of mice. *Science of The Total Environment* [online]. 649, 308–317 [vid. 2024-04-12]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.08.353

JOHANSSON, Karl-Erik a Bertil PETTERSSON, 2002. Taxonomy of Mollicutes. In: Shmuel RAZIN a Richard HERRMANN, ed. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas* [online]. Boston, MA: Springer US, s. 1–29. ISBN 978-0-306-47606-8. Dostupné z: doi:10.1007/0-306-47606-1_1

JONES, C G, J H LAWTON a M SHACHAK, 1994. ORGANISMS AS ECOSYSTEM ENGINEERS. *OIKOS* [online]. 69(3), 373–386. ISSN 0030-1299. Dostupné z: doi:10.2307/3545850

JU, Hui, Dong ZHU a Min QIAO, 2019. Effects of polyethylene microplastics on the gut microbial community, reproduction and avoidance behaviors of the soil springtail, *Folsomia candida*. *Environmental Pollution* [online]. 247, 890–897 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENVPOL.2019.01.097

JUNHAO, Cao, Chen PENG PENG, Gao XIAODONG, Zou QIFANG, Fang YUNJIE, Gu XIAOBO, Zhao XINING a Li YUANNONG, 2022. Effects of plastic film residue and emitter flow rate on soil water infiltration and redistribution under different initial moisture content and dry bulk density. *Science of The Total Environment* [online]. 807, 151381. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.151381

- KADER, Mohammad Abdul, Ashutus SINGHA, Mili Amena BEGUM, Arif JEWEL, Ferdous Hossain KHAN a Nazrul Islam KHAN, 2019. Mulching as water-saving technique in dryland agriculture: review article. *Bulletin of the National Research Centre* [online]. 43(1). Dostupné z: doi:10.1186/s42269-019-0186-7
- KAMAL, Ibtisam, Antony GELICUS a Karim ALLAF, 2012. Impact of Instant Controlled Pressure Drop (DIC) Treatment on Drying Kinetics and Caffeine Extraction from Green Coffee Beans. *Journal of Food Research* [online]. 1. Dostupné z: doi:10.5539/jfr.v1n1p24
- KARSTEN, Gudrun R. a Harold L. DRAKE, 1997. Denitrifying Bacteria in the Earthworm Gastrointestinal Tract and In Vivo Emission of Nitrous Oxide (N₂O) by Earthworms. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* [online]. 63(5), 1878–1882. Dostupné z: doi:10.1128/aem.63.5.1878-1882.1997
- KASIRAJAN, Subrahmaniyan a Mathieu NGOUAJIO, 2012. Polyethylene and biodegradable mulches for agricultural applications: A review [online]. 2012. B.m.: Springer-Verlag France. ISSN 17730155. Dostupné z: doi:10.1007/s13593-011-0068-3
- KHALIL, Abdelmonem M., 2016. Physiological and genotoxic responses of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* exposed to sublethal concentrations of AgNPs. *The Journal of Basic & Applied Zoology* [online]. 74, 8–15 [vid. 2024-04-08]. ISSN 2090-9896. Dostupné z: doi:10.1016/J.JOBAZ.2015.12.004
- KIM, Seung Kyu, Ji Su KIM, Hwang LEE a Hee Jee LEE, 2021. Abundance and characteristics of microplastics in soils with different agricultural practices: Importance of sources with internal origin and environmental fate. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 403, 123997 [vid. 2024-04-07]. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2020.123997
- KOUBOVÁ, Anna, Marta GOBERNA, Miloslav ŠIMEK, Alica CHROŇÁKOVÁ, Václav PIŽL, Heribert INSAM a Dana ELHOTTOVÁ, 2012. Effects of the earthworm *Eisenia andrei* on methanogens in a cattle-impacted soil: A microcosm study. *European Journal of Soil Biology* [online]. 48, 32–40 [vid. 2024-03-24]. ISSN 1164-5563. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJSOBI.2011.09.007
- KRISHNASWAMY, Veena Gayathri, Mariyam Fathima JAFFAR, Rajalakshmi SRIDHARAN, Shruthi GANESH, Suryasri KALIDAS, Vignesh PALANISAMY a Kabilan MANI, 2021. Effect of chlorpyrifos on the earthworm *Eudrilus euginae* and their gut microbiome by toxicological and metagenomic analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 37(5), 76. ISSN 1573-0972. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-021-03040-3
- KRIŠTŮFEK, V, V PIŽL a K RAVASZ, 1995. Epifluorescent microscopy of earthworms' intestinal bacteria. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 42(1), 39–44.
- KUIPA, Pardon, Reagan MUDZIWAPASI, Sibonani MLAMBO, Nomathemba CHIGU, Pardon KUIPA a Tendai SANYIKA, 2016. Isolation and molecular characterization of bacteria from the gut of *Eisenia fetida* for biodegradation of 4,4 DDT. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* [online]. 4, 41–47. Dostupné z: doi:10.7324/JABB.2016.40507
- KUTSCHERA, Ulrich, 2023. Antonie van Leeuwenhoek (1632–1723): Master of Fleas and Father of Microbiology [online]. 1. srpen 2023. B.m.: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). ISSN 20762607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms11081994
- KWAK, Jin Il a Youn Joo AN, 2021. Microplastic digestion generates fragmented nanoplastics in soils and damages earthworm spermatogenesis and coelomocyte viability. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 402, 124034 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2020.124034

KWAK, Jin Il a Youn Joo AN, 2022. Length- and polymer-dependent ecotoxicities of microfibers to the earthworm *Eisenia andrei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* [online]. 257, 109354 [vid. 2024-04-09]. ISSN 1532-0456. Dostupné z: doi:10.1016/J.CBPC.2022.109354

KWAK, Jin Il, Shin Woong KIM a Youn Joo AN, 2014. A new and sensitive method for measuring in vivo and in vitro cytotoxicity in earthworm coelomocytes by flow cytometry. *Environmental Research* [online]. 134, 118–126 [vid. 2024-04-12]. ISSN 0013-9351. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENVRES.2014.07.014

KWAK, Ji Hyun, Hongsuk KIM, Janghee LEE a Seokhwan LEE, 2013. Characterization of non-exhaust coarse and fine particles from on-road driving and laboratory measurements. *Science of The Total Environment* [online]. 458–460, 273–282 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2013.04.040

LAHIVE, Elma, Richard CROSS, Aafke I. SAARLOOS, Alice A. HORTON, Claus SVENDSEN, Rudolf HUFENUS a Denise M. MITRANO, 2022. Earthworms ingest microplastic fibres and nanoplastics with effects on egestion rate and long-term retention. *Science of The Total Environment* [online]. 807, 151022 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2021.151022

LARSEN, Thomas, Melanie M. POLLIERER, Martin HOLMSTRUP, Alessandra D'ANNIBALE, Kristine MARALDO, Nils ANDERSEN a Jørgen ERIKSEN, 2016. Substantial nutritional contribution of bacterial amino acids to earthworms and enchytraeids: A case study from organic grasslands. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 99, 21–27 [vid. 2024-03-24]. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:10.1016/J.SOILBIO.2016.03.018

LASSEN C., HANSEN S., MAGNUSSON K., HARTMANN NANNA B., JENSEN P.R., NIELSEN T. a BRINCH ANNA, 2015. *Microplastics : occurrence, effects and sources of releases to the environment in Denmark*. B.m.: Danish Environmental Protection Agency. ISBN 9788793352803.

LATTAUDL, Claude, Philippe MORA2, Marta GARVÍN3, Sylvain LOCATIL a Corinne ROULAND2, 1999. Enzymatic digestive capabilities in geophagous earthworms-origin and activities of cellulolytic enzymes [online]. B.m.: Urban zyxwvutsr & Fischer Verlag. Dostupné z: <http://www.urbanfischer.de/journals/pedozyxwvuPedobiologiaz>

LAVELLE, Patrick, David BIGNELL, Pierre Armand ROGER, Michel LEPAGE, Volkmar WALTERS, Pierre ROGER, Philip INESON, W HEAL a Shivcharn DHILLION, 1997. Soil function in a changing world: The role of invertebrate ecosystem engineers *Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers 1* [online]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/221754102>

LI, Hu, Xiao Ru YANG, Juan WANG, Guo Wei ZHOU, Yu Sen ZHANG, Simon Bo LASSEN, Yong Guan ZHU a Jian Qiang SU, 2021. Earthworm gut: An overlooked niche for anaerobic ammonium oxidation in agricultural soil. *Science of the Total Environment* [online]. 752. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141874

LI, Junbo, Kai YIN, Lulu HOU, Yue ZHANG, Hongmin LU, Chengxue MA a Mingwei XING, 2023a. Polystyrene microplastics mediate inflammatory responses in the chicken thymus by Nrf2/NF-κB pathway and trigger autophagy and apoptosis. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 100, 104136 [vid. 2024-02-21]. ISSN 1382-6689. Dostupné z: doi:10.1016/J.ETAP.2023.104136

LI, Luen Luen, Rachid AMARA, Sami SOUISSI, Alexandre DEHAUT, Guillaume DUFLOS a Sébastien MONCHY, 2020a. Impacts of microplastics exposure on mussel (*Mytilus edulis*) gut microbiota.

Science of The Total Environment [online]. 745, 141018 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2020.141018

LI, Ruixuan, Jingjing NIE, Denggao QIU, Shuangshuang LI, Yingxue SUN a Chun WANG, 2023b. Toxic effect of chronic exposure to polyethylene nano/microplastics on oxidative stress, neurotoxicity and gut microbiota of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* [online]. 339, 139774 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.139774

LI, Tongtong, Mengtian LU, Baohua XU, Hao CHEN, Jun LI, Zhenzhen ZHU, Mengwei YU, Jiaoyang ZHENG, Peilong PENG a Shijin WU, 2022. Multiple perspectives reveal the gut toxicity of polystyrene microplastics on *Eisenia fetida*: Insights into community signatures of gut bacteria and their translocation. *Science of The Total Environment* [online]. 838, 156352 [vid. 2024-04-03]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2022.156352

LI, Tongtong, Baohua XU, Hao CHEN, Ying SHI, Jun LI, Mengwei YU, Shaohui XIA a Shijin WU, 2024. Gut toxicity of polystyrene microplastics and polychlorinated biphenyls to *Eisenia fetida*: Single and co-exposure effects with a focus on links between gut bacteria and bacterial translocation stemming from gut barrier damage. *Science of The Total Environment* [online]. 908, 168254 [vid. 2024-03-19]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2023.168254

LI, Wenfeng, Rehemanjiang WUFUER, Jia DUO, Shuzhi WANG, Yongming LUO, Daoyong ZHANG a Xiangliang PAN, 2020. Microplastics in agricultural soils: Extraction and characterization after different periods of polythene film mulching in an arid region. *Science of The Total Environment* [online]. 749, 141420 [vid. 2024-02-21]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2020.141420

LINDSAY, W.L., 1979. *Chemical Equilibria in Soils*. John Wiley & Sons, New York

LIU, Dianfeng, Bin LIAN, Chunhao WU a Peijun GUO, 2018. A comparative study of gut microbiota profiles of earthworms fed in three different substrates. *Symbiosis* [online]. 74(1), 21–29. ISSN 18787665. Dostupné z: doi:10.1007/s13199-017-0491-6

LIU, Yin, Wen HU, Qing HUANG, Jiemin QIN, Yingrui ZHENG, Junfeng WANG, Xiaohui LI, Qingqing WANG, Genmao GUO a Shan HU, 2022. Plastic mulch debris in rhizosphere: Interactions with soil-microbe-plant systems. *Science of The Total Environment* [online]. 807, 151435 [vid. 2024-02-21]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2021.151435

LOWE, Christopher N. a Kevin R. BUTT, 2003. Influence of food particle size on inter- and intra-specific interactions of *Allolobophora chlorotica* (Savigny) and *Lumbricus terrestris*: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002. *Pedobiologia* [online]. 47(5–6), 574–577 [vid. 2024-04-10]. ISSN 0031-4056. Dostupné z: doi:10.1078/0031-4056-00231

LOWE, Christopher N. a Kevin R. BUTT, 2005. Culture techniques for soil dwelling earthworms: A review. *Pedobiologia* [online]. 49(5), 401–413 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0031-4056. Dostupné z: doi:10.1016/J.PEDOBI.2005.04.005

LOWE, Christopher N. a Kevin R. BUTT, 2007. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review. *European Journal of Soil Biology* [online]. 43(SUPPL. 1). ISSN 11645563. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejsobi.2007.08.028

LU, Liang, Zhiqin WAN, Ting LUO, Zhengwei FU a Yuanxiang JIN, 2018. Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Science of The Total*

Environment [online]. 631–632, 449–458 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.03.051

LU, Yifeng, Yan ZHANG, Yongfeng DENG, Wei JIANG, Yanping ZHAO, Jinju GENG, Lili DING a Hongqiang REN, 2016. Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver. Environmental Science & Technology [online]. 50(7), 4054–4060. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.6b00183

LUI, S.X., XIONG, D.Z., WU, D.B. 1991. Studies on the effect of earthworms on the fertility of red-arid soil. Advances in management and conservation of soil fauna, Proceedings of the 10th International Soil Biology Colloquium, held at Banglador, India, August 7–13

LV, Baoyi, Meiyan XING a Jian YANG, 2018. Exploring the effects of earthworms on bacterial profiles during vermicomposting process of sewage sludge and cattle dung with high-throughput sequencing. Environmental Science and Pollution Research [online]. 25(13), 12528–12537. ISSN 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-018-1520-6

MAGNI, Stefano, Andrea BINELLI, Lucia PITTURA, Carlo Giacomo AVIO, Camilla DELLA TORRE, Camilla Carla PARENTI, Stefania GORBI a Francesco REGOLI, 2019. The fate of microplastics in an Italian Wastewater Treatment Plant. Science of The Total Environment [online]. 652, 602–610. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.269

MAILHOT, B., S. MORLAT a J. L. GARDETTE, 2000. Photooxidation of blends of polystyrene and poly(vinyl methyl ether): FTIR and AFM studies. Polymer [online]. 41(6), 1981–1988 [vid. 2024-02-21]. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-3861(99)00204-9

MATTHIES, Carola, Anja GRIESSHAMMER, Martina SCHMITTROTTH a Harold L DRAKE, 1999. Evidence for Involvement of Gut-Associated Denitrifying Bacteria in Emission of Nitrous Oxide (N₂O) by Earthworms Obtained from Garden and Forest Soils [online]. Dostupné z: <https://journals.asm.org/journal/aem>

MEHR JACKIE a DILIP PRIYANKA, 2017. Annelida – Dissections Across the Phyla with Regard to the Digestive System. [online]. 3 June 2017. Dostupné z: <https://dismemberedwildlife.wordpress.com/annelida/> [accessed 18 April 2024].

MIKO, Ladislav, 2019. Život v půdě: příručka pro začínající půdní biology. Brno: Lipka – školské zařízení pro environmentální vzdělávání Brno, příspěvková organizace. ISBN 978-80-88212-17-1. (str.162, 163)

KANEHISA Minoru a Susumu GOTO, 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic Acids Research [online]. 28(1), 27–30 [vid. 2024-04-28]. Dostupné z: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>; <https://www.kegg.jp/pathway/hsa00053>; https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?C15930; KEGG REACTION: R09834 (genome.jp); https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?C17230; https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpd+C00836

MIRLEAU, Pascal, Fatina JOUNI, Juliette CHAPPAT, Christophe MAZZIA, Juan Carlos SANCHEZ-HERNANDEZ, Yvan CAPOWIEZ a Magali RAULT, 2024. Effect of an organophosphorus insecticide, soil texture and earthworm species on the turnover of soil, gut and cast microbiota during the earthworm's gut transit. Soil Biology and Biochemistry [online]. 190, 109293 [vid. 2024-04-11]. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:10.1016/J.SOILBIO.2023.109293

MOSLEH, Yahia Y., Saad M.M. ISMAIL, Mohamed T. AHMED a Yousery M. AHMED, 2003. Comparative toxicity and biochemical responses of certain pesticides to the mature earthworm *Aporrectodea caliginosa* under laboratory conditions. *Environmental Toxicology* [online]. 18(5), 338–346. ISSN 15204081. Dostupné z: doi:10.1002/tox.10134

MOURSY, Fatma, Fatma MUSTAFA a Nayera SOLIEMAN, 2015. Polyethylene and rice straw as soil mulching: reflection of soil mulch type on soil temperature, soilborne diseases, plant growth and yield of tomato. *Global journal of advanced research*. 2(10). ISSN 2394-5788.

MU, Jingli, Ling QU, Fei JIN, Shoufeng ZHANG, Chao FANG, Xindong MA, Weiwei ZHANG, Cheng HUO, Yi CONG a Juying WANG, 2019. Abundance and distribution of microplastics in the surface sediments from the northern Bering and Chukchi Seas. *Environmental Pollution* [online]. 245, 122–130. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2018.10.097

MUTETWA, Moses a Tuarira MTAITA, 2014. EFFECTS OF MULCHING AND FERTILIZER SOURCES ON GROWTH AND YIELD OF ONION. *Journal of Global Innovations in Agricultural and Social Sciences* [online]. 2(3), 102–106. ISSN 23125225. Dostupné z: doi:10.17957/jgiass/2.3.561

NAVARRO PACHECO, Natividad Isabel, Radka ROUBALOVA, Jaroslav SEMERAD, Alena GRASSEROVA, Oldrich BENADA, Olga KOFRONOVA, Tomas CAJTHAML, Jiri DVORAK, Martin BILEJ a Petra PROCHAZKOVA, 2021. In vitro interactions of TiO₂ nanoparticles with earthworm coelomocytes: Immunotoxicity assessment. *Nanomaterials* [online]. 11(1), 1–16. ISSN 20794991. Dostupné z: doi:10.3390/nano11010250

NCBI, National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 254630, 7-Methoxy-2,2,4-trimethyl-3-(4-methoxyphenyl)-2H-1-benzopyran.[vid April 28, 2024] Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/254630>.

NECHITAYLO, Taras Y, Kenneth N TIMMIS a Peter N GOLYSHIN, 2009. 'Candidatus Lumbricincola', a novel lineage of uncultured Mollicutes from earthworms of family Lumbricidae. *Environmental Microbiology* [online]. 11(4), 1016–1026. ISSN 1462-2912. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01837.x>

NEILSON, Roy a Brian BOAG, 2003. Feeding preferences of some earthworm species common to upland pastures in Scotland. *Pedobiologia* [online]. 47(1), 1–8 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0031-4056. Dostupné z: doi:10.1078/S0031-4056(04)70173-0

NOAA, 2008. C. Arthur, J.E. Baker, H.A. Bamford, Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris, 9-11 September 2008, NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-30, 2009

OBBARD, Rachel W, Saeed SADRI, Ying Qi WONG, Alexandra A KHITUN, Ian BAKER a Richard C THOMPSON, 2014. Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. *Earth's Future* [online]. 2(6), 315–320. ISSN 2328-4277. Dostupné z: doi:10.1002/2014EF000240

OLESEN, Kristina Borg, Diana A. STEPHANSEN, Nikki VAN ALST a Jes VOLLERTSEN, 2019. Microplastics in a stormwater pond. *Water (Switzerland)* [online]. 11(7). ISSN 20734441. Dostupné z: doi:10.3390/w11071466

OECD, 1984. Earthworm, acute toxicity tests. Guideline for testing chemicals. No. 207. OECD, Paris, France

OECD, 2004. Earthworm reproduction test. Guideline for testing chemicals. No. 222. OECD, Paris, France

OECD, 2022. Global Plastics Outlook: Policy Scenarios to 2060, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/aa1edf33-en>.

OLIVEIRA, M., A. RIBEIRO, K. HYLLAND a L. GUILHERMINO, 2013. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecological Indicators* [online]. 34, 641–647 [vid. 2024-04-03]. ISSN 1470-160X. Dostupné z: [doi:10.1016/J.ECOLIND.2013.06.019](https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2013.06.019)

OREN, Aharon a George M. GARRITY, 2021. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 71(10). ISSN 14665034. Dostupné z: [doi:10.1099/ijsem.0.005056](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056)

OWOJORI, O. J. a A. J. REINECKE, 2009. Avoidance behaviour of two eco-physiologically different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) in natural and artificial saline soils. *Chemosphere* [online]. 75(3), 279–283 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: [doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2008.12.051](https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2008.12.051)

PALMQVIST, Annemette, Monica HAMANN SANDGAARD a Jakob MAGID, 2019. MIKROPLAST I JORD Undersøgelse af langtidseffekter og undvigeadfaerd hos den naturligt forekommende, endogaeiske regnormeart *Aporrectodea caliginosa* [online]. [vid. 2024-04-29]. Dostupné z: <https://genanvendbiomasse.dk/nyheder/2019/mikroplast-i-jord>

PANDEY, Dipika, Tirthankar BANERJEE, Neha BADOLA a Jaspal Singh CHAUHAN, 2022. Evidences of microplastics in aerosols and street dust: a case study of Varanasi City, India. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 29(54), 82006–82013. ISSN 1614-7499. Dostupné z: [doi:10.1007/s11356-022-21514-1](https://doi.org/10.1007/s11356-022-21514-1)

PARKIN, Timothy B a Edwin C BERRY, 1999. Microbial nitrogen transformations in earthworm burrows [online]. Dostupné z: www.elsevier.com/locate/soilbio

PEEKEN, Ilka, Sebastian PRIMPKE, Birte BEYER, Julia GÜTERMANN, Christian KATLEIN, Thomas KRUMPEN, Melanie BERGMANN, Laura HEHEMANN a Gunnar GERDTS, 2018. Arctic sea ice is an important temporal sink and means of transport for microplastic. *Nature Communications* [online]. 9(1), 1505. ISSN 2041-1723. Dostupné z: [doi:10.1038/s41467-018-03825-5](https://doi.org/10.1038/s41467-018-03825-5)

PENG, X., M. CHEN, S. CHEN, S. DASGUPTA, H. XU, K. TA, M. DU, J. LI, Z. GUO a S. BAI, 2018. Microplastics contaminate the deepest part of the world's ocean. *Geochemical Perspectives Letters* [online]. 9, 1–5. ISSN 24103403. Dostupné z: [doi:10.7185/geochemlet.1829](https://doi.org/10.7185/geochemlet.1829)

PÉREZ-LOSADA, Marcos, Maigualida RICOY, Jonathon C. MARSHALL a Jorge DOMÍNGUEZ, 2009. Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta: Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]. 52(2), 293–302. ISSN 10557903. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ympev.2009.04.003](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.04.003)

PIŽL, Václav, 2018. Žížaly a jejich role v půdě. *Veronica: časopis pro ochranu přírody a krajiny*. č. 1, s. 22–24. ISSN 1213-0699

PLASTICSEUROPE, 2010. Plastics-the Facts 2010 An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2009 [online]. Dostupné z: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2010/> [accessed 29 April 2024].

PLASTICSEUROPE, 2022a. Plastics-the Facts 2022 OCTOBER 2022 [online]. Dostupné z : <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/> [accessed 29 April 2024].

PLASTICSEUROPE, 2022b. THE CIRCULAR ECONOMY FOR PLASTICS [online]. Dostupné z : https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2022/06/PlasticsEurope-CircularityReport-2022_2804-Light.pdf [accessed 29 April 2024].

POSPÍCHALOVÁ, Eliška. Mikroplasty v pevných vzorcích životního prostředí [online]. Praha, 2023 [cit. 2024-03-25]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/187836>. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D., DSc.

PRENDERGAST-MILLER, Miranda T., Andreas KATSIAMIDES, Mustafa ABBASS, Stephen R. STURZENBAUM, Karen L. THORPE a Mark E. HODSON, 2019. Polyester-derived microfibre impacts on the soil-dwelling earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environmental Pollution* [online]. 251, 453–459 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENVPOL.2019.05.037

PUGA-FREITAS, Ruben, Sébastien BAROT, Ludivine TACONNAT, Jean-Pierre RENOU a Manuel BLOUIN, 2012. Signal Molecules Mediate the Impact of the Earthworm *Aporrectodea caliginosa* on Growth, Development and Defence of the Plant *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* [online]. 7(12), e49504-. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049504>

QI, Yueling, Nicolas BERIOT, Gerrit GORT, Esperanza HUERTA LWANGA, Harm GOOREN, Xiaomei YANG a Violette GEISSEN, 2020a. Impact of plastic mulch film debris on soil physicochemical and hydrological properties. *Environmental Pollution* [online]. 266, 115097 [vid. 2024-04-07]. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENVPOL.2020.115097

QI, Yueling, Adam OSSOWICKI, Xiaomei YANG, Esperanza HUERTA LWANGA, Francisco DINI-ANDREOTE, Violette GEISSEN a Paolina GARBEVA, 2020b. Effects of plastic mulch film residues on wheat rhizosphere and soil properties. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 387, 121711 [vid. 2024-04-07]. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2019.121711

QIAO, R., Yongfeng DENG, Shenghu ZHANG, Marina Borri WOLOSKER, Qiande ZHU, Hongqiang REN a Yan ZHANG, 2019a. Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere* [online]. 236, 124334 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.07.065

QIAO, Ruxia, Cheng SHENG, Yifeng LU, Yan ZHANG, Hongqiang REN a Bernardo LEMOS, 2019b. Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. *Science of The Total Environment* [online]. 662, 246–253 [vid. 2024-04-12]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2019.01.245

RAFIQUE, Anam, Muhammad IRFAN, Mehvish MUMTAZ a Abdul QADIR, 2020. Spatial distribution of microplastics in soil with context to human activities: a case study from the urban center. *Environmental Monitoring and Assessment* [online]. 192(11). ISSN 15732959. Dostupné z: doi:10.1007/s10661-020-08641-3

RAGU PRASATH, Arunagiri, Kandasamy SELVAM a Chinnappan SUDHAKAR, 2024. Biodegradation of low-density polyethylene film by *Bacillus gaemokensis* strain SSR01 isolated from the guts of earthworm. *Environmental Geochemistry and Health* [online]. 46(5), 159. ISSN 1573-2983. Dostupné z: doi:10.1007/s10653-024-01925-4

RAHMAN, Md. Shazzadur, A H M Selim REZA, Md. Abu Bakar SIDDIQUE, Md. Ahedul AKBOR a Mehedi HASAN, 2023. Accumulation of arsenic and other metals in soil and human consumable foods of

- Meherpur district, southwestern Bangladesh, and associated health risk assessment. *Environmental Sciences Europe* [online]. 35(1), 47. ISSN 2190-4715. Dostupné z: doi:10.1186/s12302-023-00751-2
- RAMOS, Laura, Giselle BERENSTEIN, Enrique A. HUGHES, Anita ZALTS a Javier M. MONTSERRAT, 2015. Polyethylene film incorporation into the horticultural soil of small periurban production units in Argentina. *Science of The Total Environment* [online]. 523, 74–81 [vid. 2024-04-07]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2015.03.142
- RASTOGI, Gurdeep, Aditya BHALLA, Akash ADHIKARI, Kenneth M BISCHOFF, Stephen R HUGHES, Lew P CHRISTOPHER a Rajesh K SANI, 2010. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresource Technology* [online]. 101(22), 8798–8806. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.001
- RIBEIRO, Francisca, Ana R. GARCIA, Beatriz P. PEREIRA, Maria FONSECA, Nélia C. MESTRE, Tainá G. FONSECA, Laura M. ILHARCO a Maria João BEBIANNO, 2017. Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 122(1–2), 379–391 [vid. 2024-04-03]. ISSN 0025-326X. Dostupné z: doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2017.06.078
- RILLIG, Matthias C, Lisa ZIERSCH a Stefan HEMPEL, 2017. Microplastic transport in soil by earthworms. *Scientific Reports* [online]. 7(1), 1362. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-01594-7
- RODRIGUEZ-SEIJO, A., J. LOURENÇO, T. A.P. ROCHA-SANTOS, J. DA COSTA, A. C. DUARTE, H. VALA a R. PEREIRA, 2017. Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché. *Environmental Pollution* [online]. 220, 495–503 [vid. 2024-04-10]. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENVPOL.2016.09.092
- RODRÍGUEZ-SEIJO, Andrés, João P DA COSTA, Teresa ROCHA-SANTOS, Armando C DUARTE a Ruth PEREIRA, 2018. Oxidative stress, energy metabolism and molecular responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 25(33), 33599–33610. ISSN 1614-7499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-018-3317-z
- ROSYPAL, Stanislav, 2003. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia. ISBN 80-7183-268-5. (str. 496, 497)
- ROUSSET, Vincent, Laetitia PLAISANCE, Christer ERSÉUS, Mark E SIDDALL a Greg W ROUSE, 2008. Evolution of habitat preference in *Clitellata* (Annelida) [online]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/biolinnean/article/95/3/447/2701346>
- RUSSEL, J C, 1940. The Effect of Surface Cover on Soil Moisture Losses by Evaporation. *Soil Science Society of America Journal* [online]. 4(C), 65–70. ISSN 1435-0661. Dostupné z: doi:10.2136/sssaj1940.036159950004000C0012x
- RUZ-JEREZ, B E, P. Roger BALL a R W TILLMAN, 1992. Laboratory assessment of nutrient release from a pasture soil receiving grass or clover residues, in the presence or absence of *Lumbricus rubellus* or *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 24(12), 1529–1534. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90145-N
- RYAN, Anna C., Deonie ALLEN, Steve ALLEN, Vittorio MASELLI, Amber LEBLANC, Liam KELLEHER, Stefan KRAUSE, Tony R. WALKER a Mark COHEN, 2023. Transport and deposition of ocean-sourced microplastic particles by a North Atlantic hurricane. *Communications Earth and Environment* [online]. 4(1). ISSN 26624435. Dostupné z: doi:10.1038/s43247-023-01115-7

- SAMPEDRO, Luis, Richard JEANNOTTE a Joann K. WHALEN, 2006. Trophic transfer of fatty acids from gut microbiota to the earthworm *Lumbricus terrestris* L. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 38(8), 2188–2198 [vid. 2024-03-24]. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:10.1016/J.SOILBIO.2006.02.001
- SANTOCKI, Michal, A. John MORGAN a Barbara PLYTYCZ, 2016. Differential time course of restoration of experimentally depleted coelomocytes and fluorophores in the Earthworm *Eisenia andrei*. *Folia Biologica (Poland)* [online]. 64(2), 121–130. ISSN 17349168. Dostupné z: doi:10.3409/fb64_2.121
- SAPKOTA, Rumakanta, Susana SANTOS, Pedro FARIAS, Paul Henning KROGH a Anne WINDING, 2020. Insights into the earthworm gut multi-kingdom microbial communities. *Science of the Total Environment* [online]. 727. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138301
- SAVIGNY, Jules César, 1826. Analyse d'un memoire sur les Lombrics par Cuvier. *Mem Acad Sci Inst Fr*, 5: 176-184.
- SEMERÁD, Jaroslav, Natividad Isabel Navarro PACHECO, Alena GRASSEROVÁ, Petra PROCHÁZKOVÁ, Martin PIVOKOŇSKÝ, Lenka PIVOKOŇSKÁ a Tomáš CAJTHAML, 2020. In vitro study of the toxicity mechanisms of nanoscale zero-valent iron (Nzvi) and released iron ions using earthworm cells. *Nanomaterials* [online]. 10(11), 1–15. ISSN 20794991. Dostupné z: doi:10.3390/nano10112189
- SHASHOUA, Yvonne, 2012. *Conservation of Plastics* [online]. B.m.: Routledge. ISBN 978-1-136-41516-6. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=XTItBgAAQBAJ>
- SCHEU, S., 1993. Cellulose and lignin decomposition in soils from different ecosystems on limestone as affected by earthworm processing. *Pedobiologia* [online]. 37(3), 167–177. ISSN 00314056. Dostupné z: doi:10.1016/s0031-4056(24)00096-9
- SCHIRINZI, Gabriella F, Ignacio PÉREZ-POMEDA, Josep SANCHÍS, Cesare ROSSINI, Marinella FARRÉ a Damià BARCELÓ, 2017. Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environmental Research* [online]. 159, 579–587. ISSN 0013-9351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2017.08.043
- SCHULZ, Kristin, Sindy HUNGER, George G BROWN, Siu M TSAI, Carlos C CERRI, Ralf CONRAD a Harold L DRAKE, 2015. Methanogenic food web in the gut contents of methane-emitting earthworm *Eudrilus eugeniae* from Brazil. *The ISME Journal* [online]. 9(8), 1778–1792. ISSN 1751-7362. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2014.262
- SIMS, Reginald William; GERARD, Brian M., 1999. *Earthworms: keys and notes for the identification and study of the species*. Brill Archive
- SINGH, Dharambir, Parveen GILL, Ph D SCHOLAR, Shweta SHARMA, Dharambir ANSHU, Parveen SINGH, Shweta GILL a Sakshi SHARMA, 2020. Impact of Gyphosate and pendimethalin herbicides on qualitative and quantitative parameters of coelomocytes in earthworm *Eisenia fetida*. ~ 2043 ~ *Journal of Entomology and Zoology Studies* [online]. 8(5), 2043–2048. ISSN 2349-6800. Dostupné z: <http://www.entomoljournal.com>
- SINGLETON, David R, Paul F HENDRIX, David C COLEMAN a William B WHITMAN, 2003. Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae: Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 35(12), 1547–1555. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00244-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00244-X)
- SKIRTUN, Maggie, Matthias SANDRA, Wouter Jan STRIETMAN, Sander W K VAN DEN BURG, Fien DE RAEDEMAECKER a Lisa I DEVRIESE, 2022. Plastic pollution pathways from marine aquaculture

practices and potential solutions for the North-East Atlantic region. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 174, 113178. ISSN 0025-326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2021.113178

SOBHANI, Zahra, Yunlong LUO, Christopher T. GIBSON, Youhong TANG, Ravi NAIDU, Mallavarapu MEGHARAJ a Cheng FANG, 2021. Collecting Microplastics in Gardens: Case Study (i) of Soil. *Frontiers in Environmental Science* [online]. 9. ISSN 2296665X. Dostupné z: doi:10.3389/fenvs.2021.739775

SONG, Wenhui, Yankun DU, Dengtan LI, Zongyuan XIAO, Bing LI, Jinling WEI, Xinjie HUANG, Chuanwei ZHENG, Jinhua WANG, Jun WANG a Lusheng ZHU, 2023. Polyethylene mulch film-derived microplastics enhance the bioaccumulation of atrazine in two earthworm species (*Eisenia fetida* and *Metaphire guillelmi*) via carrier effects. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 455, 131603 [vid. 2024-04-07]. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2023.131603

SONG, Young Kyoung, Sang Hee HONG, Mi JANG, Jung-Hoon KANG, Oh Youn KWON, Gi Myung HAN a Won Joon SHIM, 2014. Large Accumulation of Micro-sized Synthetic Polymer Particles in the Sea Surface Microlayer. *Environmental Science & Technology* [online]. 48(16), 9014–9021. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es501757s

STACH, James E.M, Stephan BATHE, Justin P. CLAPP a Richard G. BURNS, 2006. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 36(2–3), 139–151. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00834.x

SUMAN, Anjali, Archisman MAHAPATRA, Priya GUPTA, Shubhendu Shekhar RAY a Rahul Kumar SINGH, 2023. Polystyrene microplastics modulated bdnf expression triggering neurotoxicity via apoptotic pathway in zebrafish embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* [online]. 271, 109699 [vid. 2024-02-23]. ISSN 1532-0456. Dostupné z: doi:10.1016/J.CBPC.2023.109699

SUNDT, Peter, Per-Erik SCHULZE, Frode SYVERSEN, 2014. Sources of microplastic-pollution to the marine environment. Report no M-321/2015. Asker: Mepex Consult, dostupné z: https://d3n8a8pro7vhm.cloudfront.net/boomerangalliance/pages/507/attachments/original/1481155578/Norway_Sources_of_Microplastic_Pollution.pdf?1481155578

SUZUKI, Michael M, Edwin L COOPER, George S EYAMBE, Arthur J GOVEN, Fitzpatrick C. LLOYD a Barney J. VENABLES, 1995. Polychlorinated biphenyls (PCBs) depress allogeneic natural cytotoxicity by earthworm coelomocytes [online]. Dostupné z: doi:10.1002/etc.5620141009

TAKAHASHI, Eizo, Haruka OZAKI, Yoshio FUJII, Hidetomo KOBAYASHI, Hiroyasu YAMANAKA, Sakae ARIMOTO, Tomoe NEGISHI a Keinosuke OKAMOTO, 2014. Properties of hemolysin and protease produced by *Aeromonas trota*. *PLoS ONE* [online]. 9(3). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0091149

TANG, Yu, Jiahuan RONG, Xiaofan GUAN, Shanjie ZHA, Wei SHI, Yu HAN, Xueying DU, Fangzhu WU, Wei HUANG a Guangxu LIU, 2020a. Immunotoxicity of microplastics and two persistent organic pollutants alone or in combination to a bivalve species. *Environmental Pollution* [online]. 258, 113845. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.113845

TANG, Yu, Weishang ZHOU, Shuge SUN, Xueying DU, Yu HAN, Wei SHI a Guangxu LIU, 2020b. Immunotoxicity and neurotoxicity of bisphenol A and microplastics alone or in combination to a bivalve species, *Tegillarca granosa*. *Environmental Pollution* [online]. 265, 115115. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2020.115115

- THAKURIA, Dwipendra, Olaf SCHMIDT, Dillon FINAN, Damian EGAN a Fiona M. DOOHAN, 2010. Gut wall bacteria of earthworms: A natural selection process. *ISME Journal* [online]. 4(3), 357–366. ISSN 17517362. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2009.124
- THOMPSON, Richard C, Ylva OLSEN, Richard P MITCHELL, Anthony DAVIS, Steven J ROWLAND, Anthony W G JOHN, Daniel MCGONIGLE a Andrea E RUSSELL, 2004. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science* [online]. 304(5672), 838. Dostupné z: doi:10.1126/science.1094559
- TIKHONOV, Vladimir, Julia ZAVGORODNYAYA, Vladimir DEMIN a Boris BYZOV, 2016. Transformation of soil humic acids by *Aporrectodea caliginosa* earthworm: Effect of gut fluid and gut associated bacteria. *European Journal of Soil Biology* [online]. 75, 47–53 [vid. 2024-03-25]. ISSN 1164-5563. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJSOBI.2016.04.010
- TILLINGHAST, Edward K., Ryan O'DONNELL, Daniel EVES, Elizabeth CALVERT a James TAYLOR, 2001. Water-soluble luminal contents of the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. and their physiological significance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* [online]. 129(2–3), 345–353 [vid. 2024-03-26]. ISSN 1095-6433. Dostupné z: doi:10.1016/S1095-6433(00)00352-4
- TITOV, Ivan. Studium sorpce farmak a látek z produktů osobní péče na mikroplasty v terénních podmínkách [online]. Praha, 2022 [cit. 2024-02-23]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/176507>. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D., DSc.
- TOMATI, U, A GRAPPELLI a E GALLI, 1988. The hormone-like effect of earthworm casts on plant growth. *Biology and Fertility of Soils* [online]. 5(4), 288–294. ISSN 1432-0789. Dostupné z: doi:10.1007/BF00262133
- TÓTH, Gergely, Tamás HERMANN, Gábor SZATMÁRI a László PÁSZTOR, 2016. Maps of heavy metals in the soils of the European Union and proposed priority areas for detailed assessment. *Science of The Total Environment* [online]. 565, 1054–1062 [vid. 2024-04-07]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2016.05.115
- TRAKIĆ, Tanja, Filip POPOVIĆ, Jovana SEKULIĆ a Davorka K. HACKENBERGER, 2024. Ecotoxicological Effects of Commercial Microplastics on Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Clitellata; Lumbricidae). *Agriculture* [online]. 14(2), 267. ISSN 20770472. Dostupné z: doi:10.3390/agriculture14020267
- VERSCHOOR, Anja J., 2015. Towards a definition of microplastics: Considerations for the specification of physico-chemical properties [online]. [vid. 2024-04-29]. Dostupné z: <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2015-0116.pdf>
- VĚTROVSKÝ, Tomáš a Petr BALDRIAN, 2013. Analysis of soil fungal communities by amplicon pyrosequencing: Current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED. *Biology and Fertility of Soils* [online]. 49(8), 1027–1037. ISSN 01782762. Dostupné z: doi:10.1007/s00374-013-0801-y
- VĚTROVSKÝ, Tomáš, Petr BALDRIAN a Daniel MORAIS, 2018. SEED 2: A user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. In: *Bioinformatics* [online]. B.m.: Oxford University Press, s. 2292–2294. ISSN 14602059. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/bty071

- VIANELLO, Alwise, Rasmus Lund JENSEN, Li LIU a Jes VOLLERTSEN, 2019. Simulating human exposure to indoor airborne microplastics using a Breathing Thermal Manikin. *Scientific Reports* [online]. 9(1), 8670. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-45054-w
- VIRŠEK, Manca Kovač, Marija Nika LOVŠIN, Špela KOREN, Andrej KRŽAN a Monika PETERLIN, 2017. Microplastics as a vector for the transport of the bacterial fish pathogen species *Aeromonas salmonicida*. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 125(1–2), 301–309 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0025-326X. Dostupné z: doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2017.08.024
- WAN, Zhiqin, Caiyun WANG, Jijie ZHOU, Manlu SHEN, Xiaoyu WANG, Zhengwei FU a Yuanxiang JIN, 2019. Effects of polystyrene microplastics on the composition of the microbiome and metabolism in larval zebrafish. *Chemosphere* [online]. 217, 646–658 [vid. 2024-04-12]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.11.070
- WANG, Hong Tao, Lei MA, Dong ZHU, Jing DING, Gang LI, Bing Jie JIN, Yuan Hu SHAO, Wei Xin ZHANG, Meng Ya SONG a Sheng Lei FU, 2022a. Responses of earthworm *Metaphire vulgaris* gut microbiota to arsenic and nanoplastics contamination. *Science of The Total Environment* [online]. 806, 150279 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2021.150279
- WANG, Hong Tao, Dong ZHU, Gang LI, Fei ZHENG, Jing DING, Patrick J. O'CONNOR, Yong Guan ZHU a Xi Mei XUE, 2019. Effects of Arsenic on Gut Microbiota and Its Biotransformation Genes in Earthworm *Metaphire sieboldi*. *Environmental Science and Technology* [online]. 53(7), 3841–3849. ISSN 15205851. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.8b06695
- WANG, Chunhui, Jian ZHAO a Baoshan XING, 2021a. Environmental source, fate, and toxicity of microplastics. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 407, 124357. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124357
- WANG, Jianlong, Xuan GUO a Jianming XUE, 2021b. Biofilm-Developed Microplastics As Vectors of Pollutants in Aquatic Environments [online]. 5. říjen 2021. B.m.: American Chemical Society. ISSN 15205851. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.1c04466
- WANG, Shuying, Tinglu FAN, Wanli CHENG, Lei WANG, Gang ZHAO, Shangzhong LI, Yi DANG a Jianjun ZHANG, 2022. Occurrence of macroplastic debris in the long-term plastic film-mulched agricultural soil: A case study of Northwest China. *Science of The Total Environment* [online]. 831, 154881 [vid. 2024-02-21]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2022.154881
- WANG, Ting, Yini MA a Rong JI, 2021c. Aging Processes of Polyethylene Mulch Films and Preparation of Microplastics with Environmental Characteristics. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 107(4), 736–740. ISSN 1432-0800. Dostupné z: doi:10.1007/s00128-020-02975-x
- WANG, Yanhua, Tao CANG, Xueping ZHAO, Ruixian YU, Liping CHEN, Changxing WU a Qiang WANG, 2012. Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 79, 122–128 [vid. 2024-03-19]. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/J.ECOENV.2011.12.016
- WANG, Yuanji, Li LIU, Shan CAO, Jing YU, Xiangyu LI, Yating SU, Gaochao LI, Hua GAO a Zhengyang ZHAO, 2023. Spatio-temporal variation of soil microplastics as emerging pollutant after long-term application of plastic mulching and organic compost in apple orchards. *Environmental Pollution* [online]. 328. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2023.121571
- World Health Organization (WHO) (1996) Permissible Limits of Heavy Metals in Soil and Plants. Geneva, Switzerland.

- WIEWEL, Barbara V é a Marja LAMOREE, 2016. Geotextile composition, application and ecotoxicology—A review. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 317, 640–655. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2016.04.060
- WILEN, Cheryl A, Ursula K SCHUCH a Clyde L ELMORE, 1999. Mulches and Subirrigation Control Weeds in Container Production. *Journal of Environmental Horticulture* [online]. 17(4), 174–180. ISSN 0738-2898. Dostupné z: doi:10.24266/0738-2898-17.4.174
- WINTER, Sebastian E., Maria G. WINTER, Mariana N. XAVIER, Parameth THIENNIMITR, Victor POON, A. Marijke KEESTRA, Richard C. LAUGHLIN, Gabriel GOMEZ, Jing WU, Sara D. LAWHON, Ina E. POPOVA, Sanjai J. PARIKH, L. Garry ADAMS, Renée M. TSOLIS, Valley J. STEWART a Andreas J. BÄUMLER, 2013. Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. *Science* [online]. 339(6120), 708–711. ISSN 10959203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1232467
- WISHART, David S., An Chi GUO, Eponine OLER, Fei WANG, Afia ANJUM, Harrison PETERS, Raynard DIZON, Zinat SAYEEDA, Siyang TIAN, Brian L. LEE, Mark BERJANSKII, Robert MAH, Mai YAMAMOTO, Juan JOVEL, Claudia TORRES-CALZADA, Mickel HIEBERT-GIESBRECHT, Vicki W. LUI, Dorna VARSHAVI, Dorsa VARSHAVI, Dana ALLEN, David ARNDT, Nitya KHETARPAL, Aadhavya SIVAKUMARAN, Karxena HARFORD, Selena SANFORD, Kristen YEE, Xuan CAO, Zachary BUDINSKI, Jaanus LIIGAND, Lun ZHANG, Jiamin ZHENG, Rupasri MANDAL, Naama KARU, Maija DAMBROVA, Helgi B. SCHIÖTH, Russell GREINER a Vasuk GAUTAM, 2022. HMDB 5.0: The Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Research* [online]. 50(D1), D622–D631. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkab1062
- WU, Yupeng, Muhammad SHAABAN, Jingsong ZHAO, Rong HAO a Ronggui HU, 2015. Effect of the earthworm gut-stimulated denitrifiers on soil nitrous oxide emissions. *European Journal of Soil Biology* [online]. 70, 104–110 [vid. 2024-04-03]. ISSN 1164-5563. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJSOBI.2015.08.001
- WÜST, Pia K, Marcus A HORN a Harold L DRAKE, 2011. Clostridiaceae and Enterobacteriaceae as active fermenters in earthworm gut content. *The ISME Journal* [online]. 5(1), 92–106. ISSN 1751-7362. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2010.99
- XIA, Bing, Dan HUANG, Mao YE, Hao QIU, Hongfeng CHEN, Keqiang ZHAO, Rongliang QIU a Rongrong YING, 2023. Effects of rhamnolipids on bacterial communities in a dioxin-contaminated soil and the gut of earthworms added to the soil. *Pedosphere* [online]. 33(6), 927–937 [vid. 2024-04-11]. ISSN 1002-0160. Dostupné z: doi:10.1016/J.PEDSPH.2022.11.005
- XU, Guanghui a Yong YU, 2021. Polystyrene microplastics impact the occurrence of antibiotic resistance genes in earthworms by size-dependent toxic effects. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 416, 125847 [vid. 2024-04-09]. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2021.125847
- XU, Ran, Jing wen CAO, Hong li LV, Yuan GENG a Meng yao GUO, 2024. Polyethylene microplastics induced gut microbiota dysbiosis leading to liver injury via the TLR2/NF-κB/NLRP3 pathway in mice. *Science of The Total Environment* [online]. 917, 170518 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2024.170518
- YANG, Huilin, Hong LAI, Jing HUANG, Liwei SUN, Jan Alexander MENNIGEN, Qiyu WANG, Yu LIU, Yuanxiang JIN a Wenqing TU, 2020. Polystyrene microplastics decrease F-53B bioaccumulation but induce inflammatory stress in larval zebrafish. *Chemosphere* [online]. 255, 127040 [vid. 2024-04-03]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.127040

YANG, Tong, Manqi GAO a Bernd NOWACK, 2023. Formation of microplastic fibers and fibrils during abrasion of a representative set of 12 polyester textiles. *Science of The Total Environment* [online]. 862, 160758. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.160758

YANG, Yang, Guanghui XU a Yong YU, 2022. Microplastics impact the accumulation of metals in earthworms by changing the gut bacterial communities. *Science of The Total Environment* [online]. 831, 154848 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2022.154848

YE, Guozhu, Xu ZHANG, Xinyu LIU, Xu LIAO, Han ZHANG, Changzhou YAN, Yi LIN a Qiansheng HUANG, 2021. Polystyrene microplastics induce metabolic disturbances in marine medaka (*Oryzias melastigma*) liver. *Science of The Total Environment* [online]. 782, 146885 [vid. 2024-04-12]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2021.146885

YIN, L., Haiyan LIU, Hongwu CUI, Bijuan CHEN, Lingli LI a Fan WU, 2019. Impacts of polystyrene microplastics on the behavior and metabolism in a marine demersal teleost, black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Journal of Hazardous Materials* [online]. 380, 120861 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2019.120861

YIN, Liyun, Bijuan CHEN, Bin XIA, Xiaotao SHI a Keming QU, 2018. Polystyrene microplastics alter the behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jacobever (*Sebastes schlegelii*). *Journal of Hazardous Materials* [online]. 360, 97–105 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2018.07.110

YU, Hong, Lingling SHI, Ping FAN, Beidou XI a Wenbing TAN, 2022. Effects of conventional versus biodegradable microplastic exposure on oxidative stress and gut microorganisms in earthworms: A comparison with two different soils. *Chemosphere* [online]. 307, 135940 [vid. 2024-04-09]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.135940

YU, Yunjiang, Shihui TAN, Dongli XIE, Hongyan LI, Haibo CHEN, Yao DANG a Mingdeng XIANG, 2023. Photoaged microplastics induce neurotoxicity associated with damage to serotonergic, glutamatergic, dopaminergic, and GABAergic neuronal systems in *Caenorhabditis elegans*. *Science of The Total Environment* [online]. 900, 165874 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2023.165874

ZAREITALABAD, Parva, Stefanie HEINZE, Nils ROTTMANN, Martin POTTHOFF, Jens DYCKMANS a Rainer Georg JOERGENSEN, 2010. Decomposition of ¹⁵N-labelled maize leaves in soil affected by endogeic geophagous *Aporrectodea caliginosa*. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 42(2), 276–282 [vid. 2024-03-24]. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:10.1016/J.SOILBIO.2009.11.002

ZEIBICH, Lydia, Oliver SCHMIDT a Harold L. DRAKE, 2019. Fermenters in the earthworm gut: Do transients matter? *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 95(2). ISSN 15746941. Dostupné z: doi:10.1093/femsec/fiy221

ZHANG, Fan, Mengyang HE, Chunlong ZHANG, Daohui LIN a Jianying ZHANG, 2021. Combined toxic effects of dioxin-like PCB77 with Fe-based nanoparticles in earthworm *Eisenia fetida*. *Science of The Total Environment* [online]. 766, 144347 [vid. 2024-04-12]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2020.144347

ZHANG, Jianying, Lei ZHANG, Mengyang HE, Yifan WANG, Chunlong ZHANG a Daohui LIN, 2023. Bioresponses of earthworm-microbiota symbionts to polychlorinated biphenyls in the presence of nano zero valent iron in soil. *Science of The Total Environment* [online]. 856, 159226 [vid. 2024-04-11]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2022.159226

ZHANG, Shuwu, Shan REN, Lei PEI, Yuhuan SUN a Fayuan WANG, 2022a. Ecotoxicological effects of polyethylene microplastics and ZnO nanoparticles on earthworm *Eisenia fetida*. *Applied Soil Ecology* [online]. 176. ISSN 09291393. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsoil.2022.104469

ZHANG, Weihong, Wenke YUAN, Lu CHEN, Chen YE, Ying JIANG a Yuyi YANG, 2022b. Uniqueness and Dependence of Bacterial Communities on Microplastics: Comparison with Water, Sediment, and Soil. *Microbial Ecology* [online]. 84(4), 985–995. ISSN 1432184X. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-021-01919-0

ZHANG, Yulan, Tanguang GAO, Shichang KANG a Mika SILLANPÄÄ, 2019. Importance of atmospheric transport for microplastics deposited in remote areas. *Environmental Pollution* [online]. 254, 112953. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.07.121

ZHAO, Shi-Wei a HUANG, Fu-Zhen, 1991. The nitrogen uptake efficiency from ¹⁵N labeled chemical fertilizer in the presence of earthworm manure (cast).

ZHAO, Yuanyuan, Huiting JIA, Hui DENG, Chengjun GE, Wenzhe XING, Huamei YU a Jiatong LI, 2024a. Integrated microbiota and multi-omics analysis reveal the differential responses of earthworm to conventional and biodegradable microplastics in soil under biogas slurry irrigation. *Science of The Total Environment* [online]. 907, 168191 [vid. 2024-04-09]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2023.168191

ZHAO, Yue, Xin LI, Huanyu BAO a Jun NAN, 2024b. Effects of biochar-derived dissolved organic matter on the gut microbiomes and metabolomics in earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Research* [online]. 245, 117932 [vid. 2024-04-11]. ISSN 0013-9351. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENVRES.2023.117932

ZHONG, Cheng, Gui Cai ZHANG, Miao LIU, Xin Tong ZHENG, Pei Pei HAN a Shi Ru JIA, 2013. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 97(14), 6189–6199. ISSN 01757598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-013-4908-8

ZHOU, Guo-Wei, Xiao-Ru YANG, An-Qi SUN, Hu LI, Simon Bo LASSEN, Bang-Xiao ZHENG a Yong-Guan ZHU, 2019a. Mobile Incubator for Iron(III) Reduction in the Gut of the Soil-Feeding Earthworm *Pheretima guillelmi* and Interaction with Denitrification. *Environmental Science & Technology* [online]. 53(8), 4215–4223. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.8b06187

ZHOU, Yanfei, Xiaoning LIU a Jun WANG, 2019b. Characterization of microplastics and the association of heavy metals with microplastics in suburban soil of central China. *Science of The Total Environment* [online]. 694, 133798 [vid. 2024-04-07]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2019.133798

ZHOU, Yanfei, Xiaoning LIU a Jun WANG, 2020. Ecotoxicological effects of microplastics and cadmium on the earthworm *Eisenia foetida*. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 392, 122273 [vid. 2024-04-07]. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHAZMAT.2020.122273

ZHU, Dong, Qing Lin CHEN, Xin Li AN, Xiao Ru YANG, Peter CHRISTIE, Xin KE, Long Hua WU a Yong Guan ZHU, 2018. Exposure of soil collembolans to microplastics perturbs their gut microbiota and alters their isotopic composition. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 116, 302–310 [vid. 2024-04-08]. ISSN 0038-0717. Dostupné z: doi:10.1016/J.SOILBIO.2017.10.027

ZHU, Lang, Jinbo LIU, Jinyi ZHOU, Xintong WU, Kangjie YANG, Zheng NI, Ze LIU a Hanzhong JIA, 2022. The overlooked toxicity of environmentally persistent free radicals (EPFRs) induced by anthracene

transformation to earthworms (*Eisenia fetida*). *Science of The Total Environment* [online]. 853, 158571 [vid. 2024-04-11]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2022.158571

ZHU, Liya, Kewen WANG, Xiaomeng WU, Hao ZHENG a Xiaojun LIAO, 2024. Association of specific gut microbiota with polyethylene microplastics caused gut dysbiosis and increased susceptibility to opportunistic pathogens in honeybees. *Science of The Total Environment* [online]. 918, 170642 [vid. 2024-02-23]. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2024.170642

ZIELIŃSKA, Magdalena, Paulina RUSANOWSKA, Joanna JARZĄBEK a Jeppe Lund NIELSEN, 2016. Community dynamics of denitrifying bacteria in full-scale wastewater treatment plants. *Environmental Technology (United Kingdom)* [online]. 37(18), 2358–2367. ISSN 1479487X. Dostupné z: doi:10.1080/09593330.2016.1150350

ZITKO, V. a M. HANLON, 1991. Another source of pollution by plastics: Skin cleaners with plastic scrubbers. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 22(1), 41–42 [vid. 2024-02-21]. ISSN 0025-326X. Dostupné z: doi:10.1016/0025-326X(91)90444-W