

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Martina Skalová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Studium toxicity cigaretových nedopalků

Bakalářská práce

2023

Martina Skalová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Martina Skalová**
Osobní číslo: **C20154**
Studijní program: **B0588A130001 Chemie a technologie ochrany životního prostředí**
Téma práce: **Studium toxicity cigaretových nedopalků**
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši na zadané téma, zaměřte se na složení cigaret, jejich výrobu a na studium toxicity pomocí ekotoxikologických testů.
2. Na vybraném vzorku cigaretových nedopalků proveďte test akutní imobilizace dafnií dle platných metod EU nebo OECD.
3. Výsledky experimentů vhodným způsobem zpracujte, vyhodnoťte toxické účinky a proveďte hodnocení cigaretových nedopalků z hlediska jejich ekotoxicity.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směnicí UPa č. 7/2019 „Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací“ v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Jaroslava Kořínková, Dr.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Monika Roupcová**
VÚOS, Ekotoxikologie

Datum zadání bakalářské práce: **25. února 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Anna Krejčová, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 25. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Studium toxicity cigaretových nedopalků jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnici Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Martina Skalová v.r.

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych poděkovala svojí vedoucí práce Ing. Jaroslavě Kořínkové, Dr. za odbornou pomoc a ochotu při psaní práce a Mgr. Monice Roupkové za vedení při vypracování experimentální části práce. Poděkování patří také mojí rodině, za umožnění studia a v neposlední řadě mému příteli Radkovi za obrovskou psychickou podporu.

ANOTACE

Práce je zaměřena na studium ekotoxicity cigaretových nedopalků pro vodní organismus *Daphnia magna*. Rozvádí vznik nedopalků počínaje tabákem, jeho zpracováním na cigarety a legislativou, která se tematikou zabývá. V práci jsou popsány principy ekotoxikologických testů a zabývá se také testem akutní imobilizace *Daphnia magna* výluhem z cigaretových nedopalků.

KLÍČOVÁ SLOVA

tabák, cigarety, cigaretové nedopalky, ekotoxikologické testy, dafnie

TITLE

The study of the toxicity of cigarette butts

ANNOTATION

The work is focused on the study of the ecotoxicity of cigarette butts on the aquatic organism *Daphnia magna*. It elaborates on the creation of cigarette butts, starting with tobacco, its processing into cigarettes and the legislation that deals with the topic. The thesis describes the principles of ecotoxicological tests, and a test of acute immobilization of *Daphnia magna* by leachate from cigarette butts is carried also out.

KEY WORDS

tobacco, cigarettes, cigarette butts, ecotoxicological tests, daphnia

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD.....	13
1. TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1. Tabák.....	14
1.1.1. Stručný popis rostliny	14
1.1.2. Pěstování tabáku	15
1.1.3. Zpracování tabáku.....	17
1.2. Tabákové výrobky.....	17
1.2.1. Výroba cigaret.....	17
1.2.2. Popis cigarety.....	19
1.2.3. Legislativa tabákových výrobků.....	21
1.3. Problematika cigaretových nedopalků	21
1.3.1. Toxicita cigaretových nedopalků.....	21
1.3.2. Možnosti řešení problematiky nedopalků.....	24
1.4. Ekotoxikologické testy	26
1.4.1. Rozdělení ekotoxikologických testů.....	26
1.4.2. Legislativa ekotoxikologických testů	31
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34

2.1. Test toxicity výluhu z cigaretových nedopalků	34
2.1.1. Kritéria platnosti	34
2.1.2. Testovaný organismus	36
2.1.3. Použité vybavení	38
2.1.4. Příprava testu – organismy	38
2.1.5. Příprava testu – výluh z nedopalků	39
2.1.6. Průběh testu	41
2.2. Výsledky testování	43
2.2.1. Výsledky testu toxicity	43
2.2.2. Vyhodnocení	44
ZÁVĚR	47
POUŽITÁ LITERATURA	48

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 – <i>Nicotiana tabacum L.</i> [6]	14
Obrázek 2 – <i>Nicotiana rustica L.</i> [6]	15
Obrázek 3 – Linka na výrobu cigaret [8]	19
Obrázek 4 – Části cigarety [8] (překlad autora)	20
Obrázek 5 – Přehled četnosti různých druhů odpadu posbíraných v roce 2021 [24] (překlad autora)	22
Obrázek 6 – Propozice pro recyklaci CN [33] (překlad autora)	25
Obrázek 7 – Výstražné symboly podle REACH [54]	32
Obrázek 8 – <i>Daphnia magna</i> [58]	36
Obrázek 9 – Výluh z CN po 24 hodinách míchání [58]	40
Obrázek 10 – Výluh z CN po zfiltrování [58]	40
Obrázek 11 – Koncentrační řada výluhů z CN [58]	41
Obrázek 12 – Testované organismy rozdělené do dvou řad [58]	42
Obrázek 13 – Závislost imobilizace dafnií na koncentraci výluhu CN po 24 hodinách	44
Obrázek 14 – Závislost imobilizace dafnií na koncentraci výluhu CN po 48 hodinách	44
Obrázek 15 – Dafnie z kontrolní skupiny [57]	45
Obrázek 16 – Dafnie z koncentrace 1/8 CN/l [58]	46
Obrázek 17 – Dafnie z koncentrace 1 CN/l [58]	46
Obrázek 18 – Dafnie z koncentrace 2 CN/l [58]	46

Tabulka 1 – Kategorie klasifikace pro látky nebezpečné pro vodní prostředí.....	33
Tabulka 2 – Některé chemické charakteristiky přijatelné zředovací vody	34
Tabulka 3 – Příklady vhodné rekonstituované zkušební vody – Zkušební voda ISO	35
Tabulka 4 – Imobilizace dafnií	43
Tabulka 5 – Koncentrace rozpuštěného kyslíku	43
Tabulka 6 – pH roztoku	43

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

OECD – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj

REACH – registrace, evaluace a autorizace chemických látek

EU – Evropská unie

ČSN – Česká (státní) technická norma

ISO – International Organization for Standardization/Mezinárodní organizace pro normalizaci

LC₅₀ – koncentrace toxické látky, která zahubí 50 % pokusných živočichů

LD₅₀ – dávka toxické látky, která zahubí 50 % pokusných živočichů

EC₅₀ – efektivní koncentrace toxické látky, která zahubí 50 % pokusných živočichů (korýši)

ED₅₀ – efektivní dávka toxické látky, která zahubí 50 % pokusných živočichů (korýši)

NOAEL – no observed adverse effect level/nejvyšší dávka toxické látky, při níž nebyl pozorován negativní účinek na organismus v porovnání s kontrolní skupinou

LOAEL – lowest observed adverse effect level/nejnižší dávka toxické látky, při níž je ještě pozorován nepříznivý účinek na organismus v porovnání s kontrolní skupinou

CN – cigaretový nedopalek

ÚVOD

Kryštof Kolumbus objevil Ameriku v roce 1492. Tím se také stal prvním Evropanem, který kdy kouřil tabák [1]. Hned po importu tabáku do Evropy se kouření stalo oblíbeným zlozvykem, který se po vynálezu cigaret v roce 1800 [2] rychle rozšířil a z různých důvodů přetrvává v lidské společnosti dodnes. Realita jeho negativního vlivu na zdraví kuřáků a jejich blízkého okolí, zejména z důvodu karcinogenních látek, které jsou při kouření vdechovány, je všeobecně známá. Problematice kuřáctví proto věnují zejména zdravotnické organizace hodně pozornosti. I díky nim vlády na celém světě v posledních desetiletích zvyšují protikuřácká opatření, navzdory všeobecnému úsilí tento zlozvyk vymýtit, je ale každoročně celosvětově vyprodukováno (a zkonsumováno) zhruba 5,3 bilionů cigaret [3]. Na odpad, který při kouření vzniká, má veřejnost tendenci zapomínat.

Nedopalky jsou hned po jednorázových plastech jedním z nejvyhazovanějších odpadů vůbec [4]. Kuřáci je často nechávají na zemi hned po konzumaci, takže putují přímo do životního prostředí. Vzhledem k jejich malému objemu a nízké hmotnosti se potom snadno šíří jeho složkami, ve velké míře i do řek a oceánů, kde se postupně rozkládají a uvolňují chemické látky, které do sebe zachytily (jen v cigaretovém kouři jich bylo detekováno 7000 [5]), stejně jako mikroplasty pocházející z acetátových filtrů, které tvoří hlavní část nedopalků. Toxicita cigaretového kouře je dobře probádané téma. Lze usuzovat, že i výluh z cigaret má toxický účinek.

Práce se zaměřuje na studium negativního vlivu cigaretových nedopalků na vodní mikroorganismy. Představuje tabák jako rostlinu a jeho zpracování až do podoby cigaret, stejně jako testovaný organismus. Následně je provedena studie akutní toxicity výluhu cigaretových nedopalků podle standardní metodiky OECD pro vodní mikroorganismus *Daphnia magna*.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Tabák

1.1.1. Stručný popis rostliny

Tabák je jednoletá i víceletá rostlina z čeledi lilkovitých, přirozeně se vyskytující zejména v Jižní a Střední Americe [6], odkud byla také v 16. století poprvé přivezena do Evropy. Dorůstá do výšky od 0,3 až po 3 metry. Z kořene vyrůstá obvykle jedna přímá lodyha, na kterou sbíhavě nebo s krátkým řapíkem přisedají listy. Květy, kterých může být na jedné rostlině až 300, mají zvonkovitý zelený kalich a bílou až karmínovou pěticípou korunu [1]. Plody dozrávají jako dvoupouzdré vejčité tobolky s velkým počtem semen (až 150 000 na rostlinu), která mohou být menší než semena máku [6].



Obrázek 1 – *Nicotiana tabacum* L. [6]

Rod *Nicotiana* zahrnuje 91 [6] uznaných druhů, intenzivně pěstované jsou ale jen dva – *Nicotiana tabacum* (Obrázek 1) a *Nicotiana rustica* (Obrázek 2), případně jejich vyšlechtěné odrůdy [2]. Nejvýznamnější částí rostliny, která je také jako jediná průmyslově využívána, jsou její listy. Tabák je na listy velmi výnosný – jedna rostlina vyprodukuje až 2 m² listů [1]. Vzhledem k jejich důležitosti se podle velikosti listů odrůdy dělí na velkolisté (délka listu 30-80 cm) a malolisté (délka listu 6-25 cm). Podle intenzity růstu a tím i vhodného klima pro

pěstování se dělí na vysokokmenné typy s krátkou vegetační dobou a malou výtěžností listů (sem spadají orientální odrůdy), růžicové typy vhodné do vlhkého klimatu (americké tabáky) a polokmenné typy vhodné do krajín s kolísavým klimatem [2].



Obrázek 2 – *Nicotiana rustica* L. [6]

Díky velké schopnosti přizpůsobit se podmínkám ve kterých roste lze tabák označit za eurytop [2], v místě původu tedy jde v podstatě o plevel. Tabák má navíc dobře vyvinutou schopnost při nepříznivých podmínkách přejít do stavu asphyxie a setrvat v daném stádiu růstu až do opětovného zlepšení podmínek [2].

Celá rostlina obsahuje celou řadu alkaloidů, které se v rostlině vyvinuly především jako repelent proti herbivorům, zejména hmyzu. Pro lidskou konzumaci je z nich nejvýznamnější nikotin, jehož nejvyšší obsah se nalézá v listech (0,17-4,93 %) [1].

1.1.2. Pěstování tabáku

Druh *Nicotiana rustica* neboli selský tabák se vzhledem ke své vysoké odolnosti a nízké náročnosti na podmínky pěstování prosadil všude tam, kde se neklade příliš velký důraz na kvalitu produkovaného tabáku a na objem jeho roční produkce. Z tohoto důvodu se s ním lze setkat především v Bangladéši, Pákistánu, Íránu, Iráku a Turecku, před rokem 1994 se také

pěstoval v Čechách jak pro oficiální, tak neoficiální produkci tabáku (především ve válečných letech, tzv. tabák „domovina“ [2]).

Nicotiana tabacum je nejrozšířenější a nejpěstovanější druh tabáku [2]. Šlechtěním a křížením vzniklo mnoho odrůd pododrůd. Dnes se rozlišují určité typy tabáků podle specifických charakteristických vlastností, které se vžily zejména historicky a kulturně [1]. Tyto typy sdružují různá místa produkce zejména podle chuti, aroma, způsobu zpracování a typického použití.

Viržinské tabáky jsou nejčastějším typem. Obvykle dosahují výšky do 2 m, mají 28-35 listů dlouhých 20-50 cm a širokých až 20 cm. Listy se vyznačují silnou žilou, která představuje až 25 % hmotnosti listu. Obsah nikotinu se pohybuje kolem 2 % [2]. Tabáky Burley dosahují také výšky do 2 m, a celková tonáž produkce listů na hektar je srovnatelná s viržinskými tabáky. Tento typ tabáku se navíc vyznačuje větší aromaticností, než viržinské tabáky [2]. Posledním často pěstovaným typem jsou orientální tabáky, které lze díky jejich specifickým vlastnostem pěstovat i v hornatých oblastech. Vyznačují se zejména obsahem pryskyřic a vosků, díky kterým jsou nejaromatictější z těchto tří typů. Obvykle se proto nepoužívají v tabákových směsích samostatně ale ve spojení s méně výraznými typy [1].

Při pěstování je nejprve tabák vyset do skleníku, kde se po počátečním vyklíčení rostliny poseká sekačkou na trávu (aby bylo dosaženo jednotné výšky vzrůstu). Následně se rostliny nechají dorůst do požadované velikosti (8-15 cm podle typu půdy) a jsou přesazeny na plantáže [2]. Pokud se objeví odnože, důsledně se odstraňují, stejně jako květy, aby se rostlina nevyšilovala. V některých zemích jsou rostliny také zakrývány mušelínovými sítěmi, aby byly chráněny před přímým slunečním svitem, který by způsobil olejnatění listů a tím snižování jejich kvality. Celý růst rostliny trvá 75-100 dní v závislosti na odrůdě a podmínkách prostředí. Při pěstování jsou rostliny ošetřovány různými pesticidy, protože ačkoli obsahují jedovaté alkaloidy, trpí řadou škůdců a chorob [1].

Tabákové listy dozrávají od spodních částí rostliny směrem nahoru a jsou proto obvykle ručně periodicky sklizeny (průměrně v pěti cyklech) [1]. Po sklizni jsou napichovány jehlou do žíly a nataženy na provaz, aby byly připraveny na sušení.

1.1.3. Zpracování tabáku

Sušení tabáku je velmi důležitá část jeho úpravy, která většinou probíhá přímo u pěstitele. Tato součást celého zpracování má totiž rozhodující vliv na degustační vlastnosti tabáku. Při sušení na slunci (sun curing), jsou tabákové listy vertikálně zavěšeny v konstrukcích připomínajících stany tak, aby byly celý den vystaveny nepřímému slunečnímu záření – takto se zpracovávají zejména orientální tabáky [1]. Obvyklé je také sušení vzduchem (air curing), používané pro burley tabáky. To využívá přirozené cirkulace vzduchu v sušárnách s bočními stěnami z pevné folie, které lze v případě potřeby srolovat. Naproti tomu sušení vhnáným vzduchem (flue curing) se odehrává v neprodyšně uzavřených sušárnách, kde je vysušení listů dosaženo umělým vytápěním při přesně stanovených teplotách. Takto se suší viržinské tabáky. Nakonec existuje ještě sušení ohněm, vzhledem ke zvýšení obsahu dehtu a nikotinu v listech se ale takto upravený tabák nepoužívá do cigaretových směsí [2].

Po vysušení jsou tabákové listy zabaleny do balíků o stanovené váze. Ty přímo od pěstitelů vykupují zpracovatelské firmy podle požadavků na fyzikálně-chemické i organoleptické vlastnosti. Než se dostanou ke zpracování u finálního výrobce, zpracovatelé tabákové listy odžilují, nařezou na části a potom leží ve skladech 1–3 roky, aby byla dodržena standardní kvalita a vlastnosti tabákových výrobků [2].

1.2. Tabákové výrobky

1.2.1. Výroba cigaret

Největším výrobcem cigaret je firma Philip Morris [7]. Výroba probíhá v kontrolovaných procesech, které jsou takřka plně automatizované. Základem cigaret je tabáková směs (tzv. blend), která se liší u různých výrobců zejména v poměrech použitých typů tabáku. Nejběžnější blend je takzvaný americký, se kterým se lze setkat např. v cigaretách značky Marlboro [2] – obsahuje 35-60 % viržinských tabáků, 20-28 % Burley tabáků, 7-14 % orientálních tabáků a 7-25 % vedlejších produktů. Jako vedlejší produkty se označuje rekonstituovaný tabák (vzniklý chemickým spojením odřezků a tabákového prachu do jedné dlouhé folie, která se následně řeže na proužky požadované velikosti), expandované žíly (žíly tabákového listu roztržené na menší částice působením vakua) případně expandovaný scrap (částice, které při zpracování tabáku představují podsítnou frakci – stejně jako žíly byly podrobené působení vakua a vlhkosti pro zvětšení objemu) [2].

Konkrétní blend je obchodním tajemstvím každé tabákové společnosti a je v průběhu produkce upravován tabákovými odborníky podle specifických charakteristik každé sklizně (i z jedné oblasti má jeden druh tabáku v průběhu let různé aroma, ostrost a sílu podle počasí a konkrétních podmínek zpracování podobně jako třeba víno) [8]. Pro dodržení stejných parametrů cigaret jsou míchány tabáky z různých oblastí i ročníků (tabák je před finálním zpracováním skladován i několik let pro vyvrání chuti a zjemnění dráždivosti kouře) [1].

Při zpracovávání tabáku do podoby cigaret jsou výrobci dodávány balíky tabákových lamin, které jsou na začátku procesu podle typu zpracovávány odděleně. Nejprve se při specifických teplotách (běžný tabák až při 65 °C, orientální pro zachování aroma maximálně při 45 °C) vlhčí vodní parou [2]. Následně jsou listy očištěny od cizích částic proudem vzduchu a provádí se tzv. casing. Konkrétně se jedná o postřik různými chemickými látkami, které mají především za úkol zajistit dlouhodobé zachování vlhkosti tabákových směsí a také zvýšit jejich pružnost (používá se např. glycerol nebo propylenglykol), čímž se prodlouží trvanlivost tabákové směsi.

Součástí tohoto procesu ale jsou i postřiky nejrůznějšími aditivy pro zlepšení chuti a aroma tabáku ale také dráždivosti kouře [8]. Pro tyto účely se používají především cukry, ale i extrakty z máty peprné, zázvoru nebo lékořice (způsobují částečné znecitlivění hrtanu a tím omezí nutkání kašlat) [9]. Závěrem celého casingu je tzv. toasting – tepelný proces, který uzavře póry v listech (aby aditiva z tabáku nevytékala) [2].

Po úpravě jsou skupiny z částí tabákových listů ponechány několik hodin v zásobníku, aby se vyrovnaly hladiny vlhkosti, míchací zařízení je rovnoměrně smíchá a řezačka je rozřeže na určitou velikost podle výrobce (0,686-0,907 mm) [1]. Následně se odpaří přebytečná vlhkost a smíchají se jednotlivé druhy tabáků pro vznik požadovaného blendu. Do tabákové směsi se podle potřeby přidá i scrap nebo tabák ze zmetkových cigaret, aby byla dodržena požadovaná chuť, obsah nikotinu a dehtu. Na závěr mohou být do tabákové směsi přidána další aditiva a příchuti rozpuštěné v lihu, tento krok ale není prováděn u všech typů cigaret [2].

Připravená tabáková směs je balena do formy cigaret nejčastěji na balících linkách, řízených počítači (Obrázek 3), může ale být prodávána i samostatně (pro ručně balené cigarety).



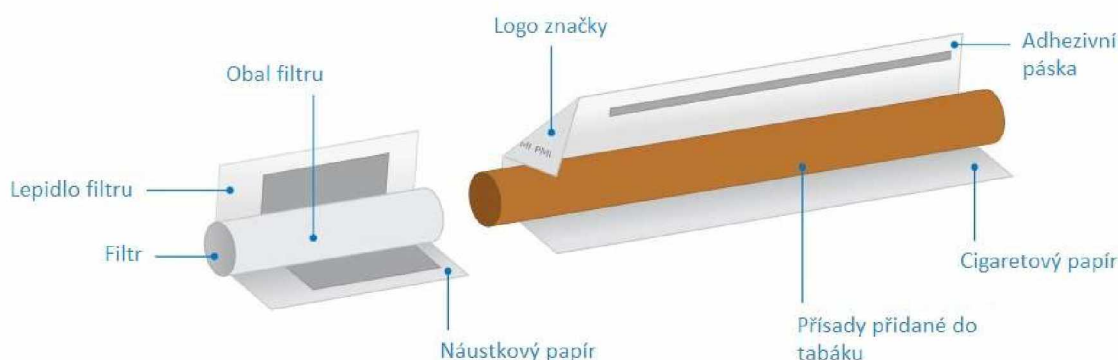
Obrázek 3 – Linka na výrobu cigaret [8]

Při výrobě balených cigaret je nejprve směs roz distribuována na silikonovou pásku, kde dojde ke zformování tabákového provazce. Ten putuje přes formovací kužel na cigaretový papír, který je kolem něj zabalen a zalepen pomocí lepidla (PVA). Vznikne tzv. nekonečná cigareta, která je nařezána na požadovanou délku [8]. K jednotlivým provazcům jsou následně přilepeny filtry dvojnásobné délky, než má finální produkt a zabaleny do náustkového papíru. Nakonec se dvojcigareta rozřízne v půlce. Automat na dopravníku kontroluje kvalitu cigaret a při zjištění defektu provede vyřazení zmetků, které jsou později rozpárány a tabák z nich se vrací zpět do výroby. Hotové výrobky nakonec putují do krabiček a mohou být distribuovány [2].

1.2.2. Popis cigarety

Cigareta se skládá ze dvou hlavních částí – smotek tabáku a filtr (Obrázek 4) [8]. Obě části jsou zabaleny v tenkém cigaretovém papíře a slepeny, aby držely pohromadě.

Přítomnost filtru v cigaretách je příčinou debat ve vědeckých kruzích. Zdá se totiž, že jejich používání má zejména psychologický efekt na konzumenty, nikoli reálný vliv na zdravotní rizika spojená s kouřením [10]. Ačkoli některé studie po zavedení používání filtrů u cigaret (původně marketingový tah pro přilákání ženské části populace zavedením dámské cigarety – filtry byly obalené červeným papírkem, aby maskovaly stopy rtěnky), prokazovaly, že tímto krokem došlo ke snížení negativních dopadů na zdraví kuřáků [11; 12], pozdější studie se přiklání k opačnému závěru [10; 13].



Obrázek 4 – Části cigarety [8] (překlad autora)

Cigaretové filtry umožňují odstranit nejhrubší částice prachu, které při spalování tabáku vznikají, čímž snižují nutkání ke kašli při kouření. Dále snižují teplotu kouře, který kuřák vdechuje. Díky iluzi bezpečí konzumenti filtrovaných cigaret necítí potřebu s kouřením přestávat. Kvůli většímu odporu vůči procházejícímu vzduchu musí kuřák vyvíjet vyšší tah, aby udržel hoření a cítil chuť tabáku. To znamená, že vdechuje hluboko do plic (nikoli pouze do dutiny ústní, jak je tomu při kouření doutníků), kam se dostávají všechny částice $PM_{2,5}$, které již z dýchacího ústrojí nelze odstranit vykašláním, a které také pronikají až do plicních sklípků odkud můžou vniknout do krevního oběhu a způsobovat různá vážná onemocnění cévní soustavy nebo i kostní dřeně [14].

Dehet, který je nejsledovanější ze škodlivin obsažených v tabáku, je sice v kouři filtrovaných cigaret obsažen v menším množství, na riziku vzniku rakoviny se ale tento fakt neprojevuje [10]. Tabák je často upraven různými extrakty a aditivami pro zlepšení chuti ale i pro kontrolu hoření [9]. Filtry jsou s obalovým papírem a tabákovou směsí spojeny lepidly. Všechny tyto látky mohou při hoření cigarety vytvářet nové, oxidované formy, jejichž toxicita jen prohlubuje negativní zdravotní efekt samotného tabáku [4].

1.2.3. Legislativa tabákových výrobků

Nejdůležitějšími zákony, které upravují výrobu a nakládání s tabákovými výrobky, včetně jejich nutných parametrů jsou zákon č. 174/2021 Sb. (kterým se mění zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů) [15] a zákon č. 353/2003 Sb. (o spotřebních daních) [16]. Na tyto zákony navazují vyhlášky ministerstva zemědělství a ministerstva financí.

Tabákové výrobky jsou ale z jiných úhlů pohledu řešeny i jinými zákony, např. zákonem č. 65/2017 Sb. (o ochraně zdraví před škodlivými účinky návykových látek) [17], nebo zákonem č. 242/2022 Sb. (o službách platform pro sdílení videonahrávek) [18] a zákonem č. 186/2016 Sb. (o hazardních hrách) [19].

Pro účely této práce je ale rozhodující zejména zákon č. 174/2021 Sb., na který navazuje vyhláška č. 261/2016 Sb. (vyhláška o tabákových výrobcích), která určuje maximální přípustné hodnoty emisí tří sledovaných látek – nikotinu, dehtu a oxidu uhelnatého, na 10 mg/cigaretu pro dehet a oxid uhličitý a 1 mg/cigaretu pro nikotin [20].

1.3. Problematika cigaretových nedopalků

1.3.1. Toxicita cigaretových nedopalků

Cigaretové nedopalky obsahují z větší části jak samotný filtr, tak také zbytek nevykouřeného tabáku. Podle několika studií je tato kombinace silně toxická [4]. Tabák je především zdrojem těžkých kovů, které se během růstu v rostlině přirozeně akumulují. I nikotin, kterého tabákové listy obsahují několik procent [21], působí zejména pro mikroorganismy jako jed (to je koneckonců jeho evoluční význam). Tabák také obsahuje dehet, který je nejen toxický, ale také karcinogenní. V cigaretovém kouři bylo nalezeno přes 7000 chemických látek, z nichž alespoň 69 má nezanedbatelný toxický účinek [5]. Tyto látky většinou obsahují i nedopalky [22].

Významné skupiny látek v cigaretách představují kovy, polyaromatické uhlovodíky a další aromatické sloučeniny, alkoholy, heterocyklické sloučeniny, uhlovodíky a další [22]. Mezi nejtoxičtější chemické sloučeniny, které se v cigaretách, a potažmo tedy i v nedopalcích, vyskytují lze zařadit buta-1,3-dien, acetaldehyd, akrolein, 2-aminonaftalen, benzen,

benzo[a]pyren, isopren nebo methanal [22]. Ačkoli především nízkomolekulární sloučeniny v nedopalcích nejsou v tak vysokých koncentracích jako je lze detekovat v kouři, naopak sloučeniny s vyšší molekulovou hmotností a kovy v nich zůstávají ve větším množství [22].

Při cestě do životního prostředí je rozhodující okamžik vyhození nedopalku. Kuřáci mají statisticky velmi významnou tendenci nedopalky odhazovat po konzumaci přímo na zem, tam, kde dokouří cigaretu [23]. Ve městech sice často funguje úklidový servis, který má za úkol pouliční smetí včetně nedopalků odstraňovat, vzhledem k jejich množství ale nelze předpokládat, že jsou takto úspěšně do komunálního odpadu sklizeny všechny. Kvůli k jejich nízké hmotnosti a objemu jsou tak z ulic a silnic následně snadno unášeny větrem do městské kanalizace, případně na trávníky.



Obrázek 5 – Přehled četnosti různých druhů odpadu posbíraných v roce 2021 [24] (překlad autora)

Nedopalky se šíří všude tam, kde se běžně pohybují lidé, tedy nejen ve městech ale i přímo v přírodě [23]. Světové organizace pořádající úklidy pláží každý rok zaznamenávají nedopalky jako nejčastější odpad, který se ve sběru nalézá (Obrázek 5) [24; 25].

Filtr nedopalku v sobě do určité míry koncentruje a zachycuje škodliviny z cigaret. Současně je také vyroben z plastu, takže umožňuje, aby se tyto látky uvolňovaly do prostředí dlouho potom co jsou ostatní části nedopalku již rozložené (filtr se v přírodních podmínkách rozkládá velmi pomalu [26]). Na toxicitu nedopalků ve vodním prostředí mají samozřejmě vliv látky, které jsou rozpustné ve vodě, dominantní efekt je připisován nikotinu (potažmo dehtu) a ethylfenolu [27]. Degradací acetátu navíc vznikají nové škodliviny a mikroplasty [28], které mohou také přispět k celkovému negativnímu vlivu [29].

Studiem ekotoxicity výluhu z cigaretového nedopalku se zabývalo již několik odborných studií s poněkud odlišnými výsledky. Při testech na rodu *Daphnia* byly dokumentovány hodnoty EC₅₀ pro 48-hodinový test výluhu mezi 0,125 a 0,25 nedopalku, 1 a 2 nedopalky a více než 16 nedopalků na litr zředovací vody [4]. Rozdíly v dosažených hodnotách mohou být vysvětleny z jedné strany rozdílnou výslednou hodnotou, z druhé strany rozdíly v postupu realizace testů. Ovlivňujícími faktory by mohlo být například zda byly použity nedopalky získané sběrem (tedy různého stáří), nebo nedopalky „vyrobené“ v laboratoři pomocí speciálních nakuřovacích strojů. Rozdíly ve výsledcích jsou popsány i v souvislosti s různými značkami použitých cigaret.

Neobvyklé nejsou ale ani testy na jiných živočišných druzích. Pro ilustraci lze uvést testy na *Atherinops affinis*, *Pimephales promelas* [4] nebo *Periophthalmus waltoni* [30], u kterých je hodnota obvykle vyšší než u rodu *Daphnia*. Tyto výsledky lze vysvětlit vyšší resiliencí vyšších organismů, zejména proti insekticidům. Zdá se, že i na řasy a bakterie (*Vibrio fischeri*) [27] nemá výluh nedopalků tak negativní vliv. U těchto organismů je ale vyšší předpoklad bioakumulace škodlivin z nedopalků (např. těžkých kovů v tukových tkáních), které by na vyšší organismy následně mohly mít v dlouhodobém časovém horizontu výraznější vliv než samotný výluh. Pro vyšší organismy je kromě toxických látek uvolněných do vody nebezpečný i nedopalek v celku. Je známo, že například ryby [31] (nebo želvy [32], ptáci, případně mořští savci [25]) si mohou nedopalek splést s potravou a zkonzumovat ho, v jejich žaludcích se ale nerozloží, takže nakonec zemřou hladu [32].

1.3.2. Možnosti řešení problematiky nedopalků

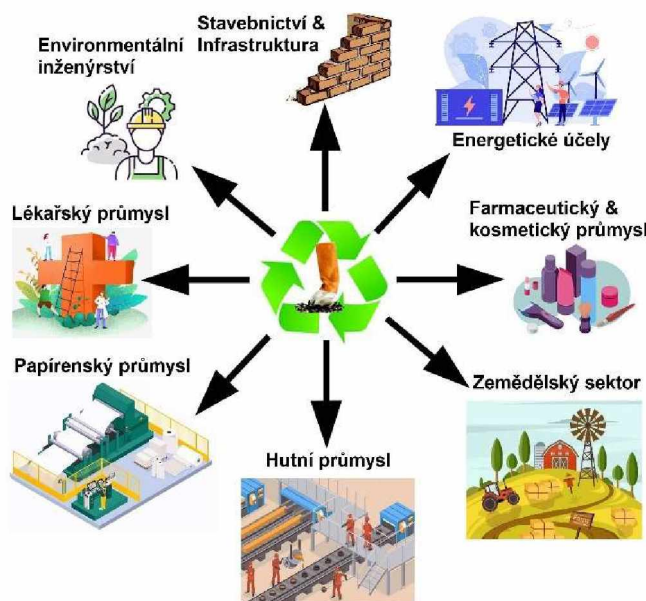
Možností, jak řešit rizika spojená s cigaretovými nedopalky v životním prostředí, je několik [10].

- sběr nedopalků v prostředí
- použití biodegradabilních filtrů/recyklace filtrů v cigaretách
- omezení kuřáctví legislativními nástroji
- spalování nedopalků spolu s nebezpečným odpadem
- převedení odpovědnosti za odstranění nedopalků na tabákové společnosti
- zákaz filtrovaných cigaret

Jednou z nich je dosavadní nejčastěji využívaná – sběr uklízacími čety. Tato možnost z hlediska dlouhodobého řešení problému není optimální. Pro komunity, kterých se týká přednostně, tedy zejména přímořské oblasti, znamená podstatné výdaje. Vzhledem k procentu kuřáků v běžné populaci a turismu, navíc takový úklid musí probíhat velmi často proto, aby daná oblast zůstávala čistá [33]. Z výdajů navíc nevzniká žádný užitek – slouží pouze k sanaci nastalé situace, nikoli k prevenci jejího opakování [34].

Další možností je vývoj zcela biodegradabilních filtrů (objevil se například návrh cigaretových filtrů vyrobených čistě z celulózy, případně z bavlny). I tento způsob má ale svá úskalí. Některé studie ukazují, že výluhy z takovýchto filtrů jsou pro vodní organismy ještě toxičtější než výluhy z těch klasických, vzhledem k tomu, že se z nich toxické látky uvolňují rychleji. V porovnání s klasickými filtry se tedy nejeví jako řešení problému. Navíc biodegradabilita cigaretových filtrů by umožnila zneužití dobrého záměru pro marketing tabákového průmyslu a tím nový vzestup jeho popularity. Lze také očekávat, že by umocnila dojem kuřáků, že odhazovat nedopalky v přírodě je v pořádku, čímž by jen podpořila negativní vliv celého problému na ekosystémy [10].

Objevily se i snahy o recyklaci filtrů (Obrázek 6). V tomto ohledu je několik návrhů, které stojí za zmínku. Jedním z nich je objev Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, že lze materiál z filtrů repolymerovat a využít k zachytu látek estrogenního typu znečišťujících vody [35]. Dalším je studie navrhuující použití uhlíkatého zbytku po spálení nedopalku k ukládání energie [36], nebo celého nedopalku jako adsorbentu pro sanaci ropných havárií [37]. V USA existuje firma TerraCycle, která cigaretové nedopalky využívá jako zdroj plastu pro výrobu městských laviček a přepravních kontejnerů [29].



Obrázek 6 – Propozice pro recyklaci CN [33] (překlad autora)

Otázkou u těchto iniciativ ovšem zůstává, jaký objem nedopalků by byly schopny zužitkovat stejně jako, jak by sběr nedopalků pro tato využití probíhal (v minulosti se objevily snahy o zavedení speciálních košů pro jejich sběr, konzumenti cigaret ale preferují odhodit nedopalek na zem tam, kde ho zrovna dokouřili, místo jeho transportu do košů) [23].

Na nedopalek se lze dívat jako na nebezpečný odpad. Podle evropské legislativy vykazuje dostatečné množství nebezpečných vlastností proto, aby byl takto klasifikován [38]. Otázkou ovšem zůstává, jak přimět konzumenty cigaret, aby nedopalky třídili do košů na nebezpečný odpad, a zda existují kapacity pro jejich spálení, protože umístění nedopalků na skládky pouze odsouvá problém mimo pozornost veřejnosti.

Existují samozřejmě i ekonomické a právní nástroje k omezení kuřáctví. Těmi je například zavedení vyšších spotřebních daní na tuto komoditu, nebo zákazy kouření na veřejných prostranstvích [10]. Při dostatečné politické vůli by bylo možné i zavést větší množství osvěty

proti kuřáctví ve školách (třeba i s environmentální tematikou). Velmi radikálním krokem by potom mohla být i úplná prohibice na všechny tabákové výrobky. Kuřáků je ale mnoho a historie ukazuje, že radikální zákazy obvykle nebývají velmi efektivní k potírání problémů (kdyby byly, tak by pravděpodobně neexistoval problém s tvrdými drogami v západním světě).

Někteří vědci se také přiklánějí k názoru, že jakožto za produkt tabákového průmyslu by za cigaretové nedopalky neměl odpovídat spotřebitel cigaret ale jejich producent, tedy tabákový průmysl [34]. Představitelé tabákového průmyslu ale argumentují tím, že nemohou ovlivnit chování jednotlivých konzumentů a nemohou za ně tedy být odpovědní. V tomto směru tedy nelze očekávat v dohledné době větší posun.

Poslední často diskutovanou variantou řešení problému je úplný zákaz filtrů na cigaretách. Jak bylo zmíněno výše, jejich pozitivní efekt na zdraví kuřáků nebyl prokázán. Je známo, že tento jednorázový odpad stojí za estetickými i ekologickými problémy. Aby se tato varianta ale stala realitou, podnět musí vzejít od politického představenstva nejen jednotlivých států, ale možná i na mezinárodní úrovni. Představitelé tabákového průmyslu totiž oponují, že kuřáci jsou tak zvyklí na cigarety s filtry, že pokud jedna z tabákových společností zavede cigarety bez filtrů, kuřáci budou kupovat u konkurence [10].

Z dostupných informací je tedy zřejmé, že teoretická řešení tohoto skutečně globálního problému existují, pro jejich uskutečnění je ale zapotřebí velké politické vůle a pravděpodobně i nemalých finančních prostředků.

1.4. Ekotoxikologické testy

1.4.1. Rozdělení ekotoxikologických testů

Ekotoxikologických testů je mnoho nejrůznějších druhů v závislosti na potřebách výzkumu. Nejčastěji zohledňovaná je časová náročnost a náročnost na počet testovaných organismů, protože tyto dva aspekty přímo souvisejí s cenou testu. V moderních testech je také zohledňováno etické hledisko – utrpení zvířat, které bude testem způsobeno. Je snaha co nejvíce omezit potřebu testovat látky přímo na zvířatech. Proto jsou vyvíjeny programové aplikace, které zvládají simulovat interakci látek s DNA, případně testy na tkáních získaných z jatek. Testování přímo na živých organismech je ale dosud nenahraditelnou součástí

výzkumu toxicity. Často aplikované testy mají v evropském prostředí zavedené standardní OECD metodiky, které rozpracovávají jejich provedení.

Vzhledem k vysokému počtu různých testů je vhodné pro snazší orientaci dobré testy uspořádat do skupin podle jejich charakteristik. Nejběžnější dělení testů je z časového hlediska [39].

- krátkodobé testy
 - testy akutní toxicity
 - subchronické testy
- dlouhodobé testy
 - chronické testy
 - testy karcinogenity

Takto lze testy rozdělit na krátkodobé a dlouhodobé testy toxicity. Krátkodobé testy jsou nejčastěji provozované testy, vzhledem k jejich uplatnění v monitorování kvality médií. Do této skupiny se řadí testy akutní toxicity a subchronické testy. Testy akutní toxicity trvají obvykle 24-96 hodin při jednorázové aplikaci, sledování organismů může následovat i po dobu 2 týdnů, v závislosti na organismu. Testy subchronické jsou delší, s trváním od 2 týdnů do 10 % délky života daného druhu. Dlouhodobé testy zahrnují chronické testy a testy karcinogenity. Tyto testy trvají velmi dlouhou dobu – celý život organismu nebo alespoň 1 rok. Z časového hlediska lze dělit i všechny testy (například testy teratogenity nebo oční dráždivosti), ty se ale obvykle zařazují do jiných skupin, protože časové hledisko v nich není hlavní určující parametr [39].

Další dělení, se kterým se lze setkat, je z hlediska média, ve kterém test probíhá. Nejobvyklejší jsou akvatické neboli vodní testy (těch je také největší počet). Probíhají buď na organismech žijících výlučně ve vodě nebo na obojživelnících. I přes jejich vysoký počet ale z ekotoxikologického hlediska nejsou dostačující, protože jiná média se vyznačují odlišnou biodostupností látek a jinou formou vstupu do organismu. Proto jsou rozpracovávány i terestrické testy, které probíhají buď na organismech žijících přímo v půdě či sedimentu, nebo na suchozemských organismech (ptáci, savci) [40].

Další rozdělení jsou používána stejně jako výše zmíněná, názvy jednotlivých skupin a jejich definice ale nefiguruje v žádných encyklopediích ani ve článcích o toxikologických testech.

Ačkoli v nich lze vysledovat všeobecně akceptované zákonitosti použité terminologie, souhrnná literatura, která by ji vysvětlovala, chybí. Pro definici a charakteristiku představených skupin bylo čerpáno z publikace Bohuslava Maršálka [41].

Biotesty lze dělit také dle pokročilosti designu testovacího systému na testy:

1. generace – klasické (standardní)
2. generace – tzv. mikrobiotesty
3. generace – využívají biosenzory, biosondy a biomarkery
4. generace – v nich se uplatňují online systémy s dálkovým přenosem dat

Každá generace testů přináší určité výhody a nevýhody. Klasické testy poskytují velmi kvalitní informace, na jejichž vyhodnocení jsou vypracovány vzorce, často mají standardizované provedení a poskytují tedy určitou záruku minimalizace vstupu individuální chyby. Jsou ověřeny generacemi vědců. Na druhou stranu jsou často časově náročné a jejich provedení představuje velké požadavky na lidské zdroje vzhledem k potřebě častých kontrol, nemluvě o etickém aspektu (utrpení mnoha testovaných zvířat) [42].

Naproti tomu mikrobiotesty vyžadují pouze části těl sledovaných organismů a umožňují provozovat testy na několika různých druzích zvířat současně (ideálně z různých trofických úrovní). Vzhledem k malému objemu matrice šetří ekonomické prostředky vynaložené na jejich provedení. Využívají klidová stadia testovacích organismů, tj. vajíčka, cysty, ephipia, tkáně, lyofilizované a imobilizované kultury organismů. Organismy v této podobě jsou dodávány podle požadavku laboratoře v nejrůznějších kitech pojmenovaných podle daného druhu. V neposlední řadě je významnou výhodou, že evropská legislativa nevnímá vajíčka ryb jako obratlovce, takže není nutné pro jejich testování projít povolovacím procesem [43].

Třetí a čtvrtá generace testů jsou velmi nové. Jejich aplikace umožňuje menší časové vytížení pracovníků laboratoře. Biosenzory, popř. biosondy obvykle reagují na luminiscenci vyvolanou reakcí chemické sloučeniny nebo imobilizované populace bakterií s toxickou látkou [44]. Dálkový přenos dat naproti tomu umožňuje kontrolování parametrů bez fyzické přítomnosti pracovníka v místě testu. Pokud jsou tedy techniky obou generací využity společně mají potenciál usnadnit kontinuální monitoring toxických látek *in situ* [45; 46].

Dělení dle trofické úrovně organismů:

- producenti
- konzumenti
- destruenti

Je zřejmé, že testy se liší (zejména z hlediska jejich vyhodnocení) i podle typu organismu, na kterém se uskutečňují. Těmito organismy mohou být producenti, konzumenti a destruenti. Ve vodním prostředí se nejčastěji setkáváme s testy na producentech a konzumentech (testy na producentech *Lemma sp.* nebo *Desmodesmus subspicatus*, zástupci konzumentů mohou být *Daphnia sp.*). Půdní testy ale naopak zahrnují spíše destruenty (*Eisenia foetida*) [41].

Následuje dělení z hlediska výsledné informace neboli způsobu vyhodnocení.

- letální efekty → letální indexy
- subletální efekty
- hodnocení fyziologické aktivity
- reprodukční aktivita, malformace, teratogenita

Pro hodnocení ekotoxikologických testů se obvykle používají vypočtené hodnoty indexů, kvantifikujících různé aspekty zjištěných dat. Nejznámější (a dodnes zřejmě nejobvyklejší) jsou letální indexy – LC_{50} , LD_{50} , EC_{50} a ED_{50} určující dávku nebo koncentraci látky, která způsobí smrt, respektive imobilizaci 50 % testovaných organismů za určený čas (obvykle 24 nebo 48 hodin). Z křivky závislosti procenta imobilizovaných organismů na dávce lze také určit hodnoty NOAEL a LOAEL. Hodnota NOAEL udává nejvyšší dávku, při níž nebyl pozorován žádný nepříznivý účinek na organismy v porovnání s kontrolní skupinou. Naproti tomu hodnota LOAEL určuje nejnižší dávku, při níž ještě je pozorován negativní účinek na organismus [40].

Kromě těchto efektů lze hodnotit i subletální efekty, které popisují, jaký vliv na organismy mají dávky látky pod hodnotami letálních indexů. Vyhodnocují se změny v chování organismů např. změny pohyblivosti nebo snížení predační schopnosti. Dalším možným výsledkem testů je hodnocení fyziologické aktivity. Posuzuje například změny v enzymatické aktivitě, změny hmotnosti organismu, změny v aktivitě imunitního systému apod. Hodnotit

ale lze i různé další aspekty života organismů jako například reprodukční aktivitu, malformaci nebo teratogenitu [40].

Podle počtu druhů zkoumaných v jednom testu mohou být studie jednodruhové (single species) nebo vícedruhové (multi species). Jednodruhové testy jsou jednodušší na provedení, jsou ekonomicky méně náročné, a především jsou standardizované. Vícedruhové testy naproti tomu umožňují komplexnější pohled na vliv toxických látek – poskytují informace o vzájemných interakcích organismů, které z jednodruhových testů nelze vždy odhalit, ale v přirozeném prostředí k nim dochází [47]. Vícedruhové testy mohou využívat přírodní populace i laboratorní směsi kultur [41].

Testy lze dělit i podle typu testovaného vzorku.

- čisté chemické látky
- směs chemických látek
- přírodní vzorky

Zejména pokud se odehrávají na zakázku (třeba z důvodu legislativních požadavků) může se jednat o čisté chemické látky. Ty disponují známou chemickou strukturou a obvykle jsou známy i jejich fyzikálně-chemické vlastnosti (hydrofilita nebo naopak lipofilní charakter, těkavost, molekulová hmotnost atd.), což alespoň do určité míry umožňuje predikci jejich interakce s živými organismy. V ekotoxikologické oblasti ale nejsou výjimečné i testy směsí látek (známých i neznámých, například dehtu, jehož jednoznačné složení nelze určit). V některých případech jsou realizovány i testy přírodních vzorků, které nemají známé složení, nebo jsou směsí mnoha chemických látek, takže by jejich úplný chemický popis byl příliš komplikovaný pro běžné kapacity. V tomto typu vzorků také může docházet k nečekaným interakcím mezi jednotlivými složkami, takže predikce jejich vlivu na živé organismy je obvykle velmi složitá, stejně jako interpretace výsledků uskutečněných testů [41].

Dělit lze testy i v souvislosti se způsobem přípravy vzorku. Nejjednodušší na provedení jsou tzv. přímé testy, kdy jsou organismy vystaveny přímo zkoumané látce bez jakékoli úpravy (Direct Tests, Solid Phase Tests, Whole Effluent apod.). Postup získání vzorku ale častěji bývá složitější. Mohou být připraveny smísením vody a definované koncentrace chemických látek, nebo se může jednat o výluhy přírodních vzorků (žádané látky z nich jsou extrahovány organickými rozpouštědly, DMSO, nebo vodou za vhodné teploty a pH po zvolený čas, nebo

jinak). Vzorčky vzniklé zmíněnými postupy mohou být následně podrobeny filtraci přes semipermeabilní membrány [41].

Naposled lze testy dělit podle stupně komplexnosti detekčního systému (tedy biologické struktury, na které test probíhá). Zavedeným typem jsou testy na celém živém organismu, v poslední době (s rozvojem nejmodernějších generací ekotoxikologických testů) jsou ale žádané i testy na strukturách mnohem komplikovanějších i jednodušších. Na úrovni suborganismální se jedná o testy na enzymech, biosondách, nebo buněčných a tkáňových kulturách *in vitro*. Strukturami komplexnějšími, než je samotný organismus, jsou potom celé populace, micro/mezo kosmos, nebo terénní experimenty [41].

1.4.2. Legislativa ekotoxikologických testů

V České republice upravuje problematiku ekotoxikologických testů na *Daphnia magna* (konkrétně zkoušku inhibice pohyblivosti) norma ČSN EN ISO 6341 (75 7751) [48]. Tato norma je spolu s dalšími v kategorii rozborů jakosti vod aplikací evropské normy EN ISO 6341:2012, která vznikla z Nařízení komise (ES) č. 440/2008 [49]. V Evropské normě jsou ekotoxikologické testy pro rozbor jakosti vod na běžných zástupcích jednotlivých skupin živých organismů popsány společně. Přímý test na dafniích upravuje metoda C.2. – Zkouška akutní imobilizace dafnií (*Daphnia sp.*). V mezinárodním měřítku evropská metoda odpovídá standardizované metodice OECD Test Guideline No. 202 – *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation test (platná od roku 2004) [50].

Původní dokument tedy vytvořila OECD neboli Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD je organizace do níž je zapojeno 38 zemí ze všech kontinentů kromě Afriky (její vliv je ale díky kandidátským a partnerským zemím skutečně celosvětový) a jejím cílem je dosáhnout rovnosti příležitostí a prosperity všech. Tohoto cíle se snaží dosáhnout vytvářením metodik pro nejrůznější oblasti a tím i stanovováním mezinárodních standardů. Kromě environmentální oblasti se zabývá i problematikou sociální sféry (například kvalitou vzdělání v jednotlivých zemích a možnou nápravou tohoto sektoru) a ekonomiky (navrhuje opatření pro potírání korupce). Poznatky následně předává formou doporučení, ale umožňuje i setkávání lídrů pro efektivní výměnu zkušeností a cílí na jednotné mezinárodní standardy (v oblasti ekotoxikologie standardizovanými ekotoxikologickými testy) [51].

Cíle OECD odpovídají snahám Evropské unie o standardizaci v rámci evropského prostředí. Vyjde-li tedy metodika OECD, evropská komise zpracuje návrh standardizační žádosti, který zašle některému ze svých normalizačních úřadů (v oblasti obecné technologie to je některá z podjednotek Evropského výboru pro normalizaci), který žádost zreviduje a zašle ji zpět s komentáři. Upravená norma potom může být akceptována evropskou komisí [52]. Normy platné v evropské unii jsou závazné pro členské státy. Český Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví tedy danou evropskou normu aplikuje na české prostředí [53]. Lze tedy říci, že ekotoxikologické testy, tak jak je popisují české normy, jsou platné, akceptované a srozumitelné ve velké části světa.

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006, o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, které je lépe známé jako nařízení REACH, stanovuje pro produkty prodávané a vyráběné v EU povinnost označování podle jejich negativních fyzikálních vlastností, vlivů na zdraví nebo na životní prostředí. Látky, u nichž je zjištěna vlastnost podle tohoto nařízení, musí být označeny výstražným znakem (Obrázek 7) [54].

Výstražné symboly nebezpečnosti podle nařízení (ES) č. 1272/2008:



Obrázek 7 – Výstražné symboly podle REACH [54]

Z hlediska ekotoxikologie je nejdůležitější kategorií látek nebezpečných pro životní prostředí. Jako takové jsou vyhodnoceny látky, které jsou buď akutně nebo chronicky toxické pro vodní prostředí, mají pozorovanou nebo předpokládanou schopnost bioakumulace, případně jejich rozložitelnost (v průběhu degradace mohou organické látky poskytovat toxické produkty, všeobecně je ale rychlá degradace, nejlépe až na anorganické sloučeniny, žádoucí) [55].

Při posuzování ekotoxicity látek jsou primárním předpokladem data o akutní a chronické toxicitě. Pokud nejsou známa provádí se experimenty pro jejich zjištění podle výše zmíněných standardizovaných postupů. Odpovídají-li výsledky testů požadavkům pro klasifikaci látek nebezpečných pro vodní prostředí, látka může být zařazena na seznam a označena příslušným symbolem. Legislativní limity této klasifikace udává Tabulka 1 [55].

Tabulka 1 – Kategorie klasifikace pro látky nebezpečné pro vodní prostředí

Krátkodobá (akutní) nebezpečnost pro vodní prostředí	
Kategorie Akutní toxicita 1:	
96 h LC ₅₀ (pro ryby)	≤ 1 mg/l a/nebo
48 h EC ₅₀ (pro korýše)	≤ 1 mg/l a/nebo
72 nebo 96 h ErC ₅₀ (pro řasy nebo jiné vodní rostliny)	≤ 1 mg/l

Při klasifikaci látek do kategorie Akutní toxicita 1 nebo do kategorie Chronická toxicita 1 je nezbytné zároveň uvést příslušný multiplikační faktor nebo faktory. Klasifikace je založena na ErC₅₀ (= EC₅₀ (rychlost růstu)). Není-li základ EC₅₀ specifikován nebo není zaznamenána žádná ErC₅₀, zakládá se klasifikace na nejnižší dostupné EC₅₀.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Test toxicity výluhu z cigaretových nedopalků

2.1.1. Kritéria platnosti

Test akutní toxicity byl proveden v souladu s platnou legislativou (nařízení komise ES č. 40/2008) [49]. Ta stanovuje kritéria platnosti různých ekotoxikologických testů, zejména fyzikálně-chemické podmínky jejich realizace, požadavky na testované organismy a na laboratorní vybavení pro vyhodnocení testu. Jedním z kritérií je chemické složení zásobní vody – základního zředovacího roztoku. Tím může být rekonstituovaná zkušební voda, ale i přírodní, případně odchlorovaná vodovodní voda. Důležitý je ale předpoklad, že použité médium splňuje nároky na kvalitu (resp. pokud v něm dafnie přežívají bez známek stresu).

U přírodní a vodovodní vody musí být zajištěna neměnná kvalita (tvrdost) v průběhu roku a je nutné v nich kontrolovat obsah těžkých kovů (mohly by zkreslit výsledky experimentů s látkami, které je mají zabudované ve své chemické struktuře). U vodovodní vody navíc musí být každý den stanoven obsah chloru. Ve vodě ale nemusí být obsah sledovaných látek nulový. Povolené znečištění udává Tabulka 2.

Tabulka 2 – Některé chemické charakteristiky přijatelné zředovací vody

Látka	Koncentrace
Hmotné částice (prach)	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Volný (neiontový) amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organické chlorované pesticidy a polychlorované bifenylly	< 50 ng/l
Celkový organicky vázaný chlor	< 25 ng/l

Pokud je použita rekonstituovanou zkušební vodou, její základ tvoří deionizovaná nebo demineralizovaná vody (s konduktivitou do 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Do ní se v přesně stanoveném poměru přidávají anorganické soli pro doplnění přirozené hladiny iontů (aby neměla voda na dafnie negativní vliv). Obsah těchto solí udává Tabulka 3.

Tabulka 3 – Příklady vhodné rekonstituované zkušební vody – Zkušební voda ISO

Zásobní roztok (jednotlivé látky)		K přípravě rekonstituované vody přidejte následující objem zásobních roztoků k 1 litru vody
Látka	Navážka přidaná k 1 litru vody	
Chlorid vápenatý $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11,76 g	25 ml
Síran hořečnatý $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,93 g	25 ml
Hydrogenuhličitan sodný NaHCO_3	2,59 g	25 ml
Chlorid draselný KCl	0,23 g	25 ml

Ať je voda přírodní či rekonstituovaná, musí splňovat celkové požadavky na tvrdost vody (doporučených je 140-250 mg/l), obsah kyslíku (musí být na počátku i na konci zkoušky větší nebo roven 3 mg/l v kontrolní i zkušební koncentraci) a pH (po celý test mezi 6 a 9). Pokud pH neodpovídá požadavkům, může být upraveno přidávkem HCl nebo NaOH. Nedostatek kyslíku v zásobním roztoku může být před začátkem testu kompenzován sycením (ne již ale v průběhu testu).

Požadavky na standardizaci se týkají nejen ředícího média ale i použité aparatury. Laboratorní nádoby musí být vyrobeno ze skla nebo jiného inertního materiálu a před každým použitím vymyto dle běžných laboratorních postupů.

Ve standardním testu by mělo být použito alespoň 5 koncentrací s dělicím faktorem nejvýše 2,2, přičemž nejvyšší koncentrace by měla způsobit imobilizaci 100 % organismů a nejnižší koncentrace by neměla způsobit žádné negativní účinky oproti kontrolní skupině. Použití menšího počtu koncentrací než pěti, by mělo být zdůvodněno. Nádoby s dafniemi by měly být překryty, aby se zamezilo ztrátám roztoku odparem a jeho znečištění prachem. Pokud ale není testováno těkavé médium, nemusí být uzavřeny vzduchotěsně (aby dafnie netrpěly

nedostatkem kyslíku). V každé koncentraci by mělo být použito alespoň 20 organismů (rozdělených buď do 2 skupin po deseti nebo do čtyř skupin po 5). Na každý organismus by měly být předloženy nejméně 2 ml roztoku. Všechna zjištěná data, (nejen imobilizace ale i nestandardní chování a vzhled) by měla být zaznamenána.

2.1.2. Testovaný organismus

Testovaný organismus *Daphnia magna* (česky perloočka nebo hrotnatka) se řadí mezi členovce, konkrétně korýše. Je to druh v přírodě se vyskytující ve sladkých vodách. Pro ekotoxikologické testy jsou dafnie vhodné proto, že jsou poměrně citlivé na změny prostředí, a přitom se rod *Daphnia* vyskytuje v mnoha druzích téměř po celém světě, takže jsou testy na nich snadno přenositelné na reálné ekosystémy [56].

Dafnie jsou několik milimetrů dlouhé a jsou průhledné, ačkoli je pokrývá dvoudílná schránka (karapax). Právě díky průhlednosti celého organismu jde o druh, který je velmi vhodný jako testovací organismus (pouhým okem lze zřetelně spatřit trávicí trubici a pod mikroskopem i procesy probíhající uvnitř organismu, včetně tlukotu srdce) (Obrázek 8).



Obrázek 8 – *Daphnia magna* [58]

Jejich hlava a trup jsou nepohyblivě spojeny v jeden celek. Velmi prominentním znakem, především při pohledu seshora, jsou jejich tykadla (respektive druhý pár tykadel). Tykadla jsou velmi prodloužená a pokrytá brvami – hrotnatky je používají k typickému skákavému

pohybu. První pár tykadel se nachází přímo u ústního otvoru a slouží k posunu potravy do úst. Ačkoli mají nohy, nepoužívají je k pohybu (nohy jsou uvnitř karapaxu), ale k filtrování vody pro získání potravy nebo k dýchání (kyslík mohou přijímat celým povrchem těla) [57].

Dafnie získaly svoje české jméno – perloočka – podle jednoho složeného oka, kterým se orientují v prostoru. Oko jim umožňuje reagovat na změny intenzity světla – pokud světlo svítí velmi intenzivně, dafnie migrují do hlubin, aby se vyhnuly predátorům, kteří ve dne míří vzhůru, v noci lze pozorovat opačný proces. Díky prvnímu páru tykadel jsou také schopné rozeznávat ve vodě chemické signály (ty je upozorňují na blížící se ryby) [56].

Ve stálých chovech je snaha udržovat populaci pouze samičí, která se rozmnožuje partenogeneticky (naráz rodí obvykle zhruba 10 dafnií, nicméně jich může být i 100). V přírodních podmínkách se ale střídá nepohlavní i pohlavní rozmnožovací cyklus. Když populace zaznamená zhoršené životní podmínky (například krátké dny, snižující se teplotu nebo nedostatek potravy), začnou samice produkovat samčí haploidní vajíčka. Z tohoto důvodu je přítomnost samců v chovu známkou stresu a na populaci obsahující velký počet samců by neměly být prováděny ekotoxikologické testy [57].

Samci jsou menší než samice a mají prodloužený první pár tykadel přizpůsobený k tomu, aby se mohli při páření přichytit k samici. Samci oplodní nepřibuzné samice, které již neporodí malé dafnie, ale dvě vajíčka umístěná v ephippiu, která samice odloučí při svlékání schránky. Vajíčka v ephippiu jsou velmi rezistentní. Vydrží sucho a zvládnou vyčkat na vhodnou příležitost i několik let. Následující jaro se z nich potom vylíhnou samice, které se budou rozmnožovat znovu nepohlavně [57].

Ve stálém chovu je třeba pro zajištění optimálního vývoje chovu udržovat teplotu kolem 20 °C, v přírodních podmínkách jsou ale hrotnatky relativně odolné a dokáží se díky stádiím hibernace přizpůsobit výkyvům teplot v prostředí i nedostatku potravy. Krmí se většinou řasami, ale mohou vystupovat i jako predátoři nižších organismů. V přirozených podmínkách se z důvodu velkého množství přirozených predátorů dožívají nejvýše několika měsíců, v chovu mohou přežít i více než rok [56].

2.1.3. Použité vybavení

Přístroje a zařízení:

- oximetr WTW OXI 730 s membránovou sondou Cellox 325
- pH metr WTW pH 539 s elektrodou SenTix 81
- konduktometr FE 30
- analytické váhy A6 135 (Mettler Toledo)
- zařízení pro úpravu vody Goro
- zařízení pro udržování teploty ve zkušebním prostoru
- teploměr
- kádinky, odměrné baňky, pipety, sítko na výlov

2.1.4. Příprava testu – organismy

Testy ekotoxicity mají standardizovaný průběh a probíhají pouze v kontrolovaném prostředí laboratoří. Z toho důvodu je experimentální část této bakalářské práce realizována ve Výzkumném ústavu organických syntéz v Rybitví. Test byl proveden podle normy ČSN EN ISO 6341 (75 7751) [48].

V testu imobilizace dafnií se pracuje s dafniemi, které nejsou starší než 24 hodin. Pro tento účel si laboratoř drží stálý chov jedinců *Daphnia magna*. Ty jsou chované celoročně při teplotě $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, ve standardním zřed'ovacím roztoku a jsou krmené zelenými řasami. Jedinci jsou dvakrát ročně kontrolováni zkouškou s referenční látkou (pro tento účel je předepsaný dichroman draselný) kvůli možnosti změny sensitivity na testování. Díky příhodným podmínkám se chov drží pouze samičí – samice se množí partenogeneticky. Dafnie jsou chovány při normálních světelných podmínkách (16 hodin světlo, 8 hodin tma), aby byly minimalizovány sezónní výkyvy v plodnosti.

Pro účely testování je před každým testem připraven zásobní roztok rekonstituované zřed'ovací vody. Pro jeho přípravu se používá demineralizovaná voda, do níž jsou v poměru 2,5 ml roztoku v 1 litru demineralizované vody přidány roztoky A, B, C a D. Roztok A je roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (117,6 g pevné látky v 1 litru demineralizované vody), roztok B obsahuje 49,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, roztok C 25,9 g NaHCO_3 v 1 litru vody a roztok D 2,3 g KCl v 1 litru

vody. V této zředovací vodě je těsně před testováním změřen obsah kyslíku, pH (podle zvyklosti v rozmezí $7,8 \pm 0,2$) a teplota (20 ± 2 °C).

Den před začátkem testu jsou samice připravené k porození mláďat odebrány z chovu do mělké nádoby s odlitým zásobním roztokem zředovací vody pro aklimatizaci a pro snadnější odlov mláďat. Do nádoby je také přidán roztok řas, aby měly samice optimální podmínky pro rození mláďat.

2.1.5. Příprava testu – výluh z nedopalků

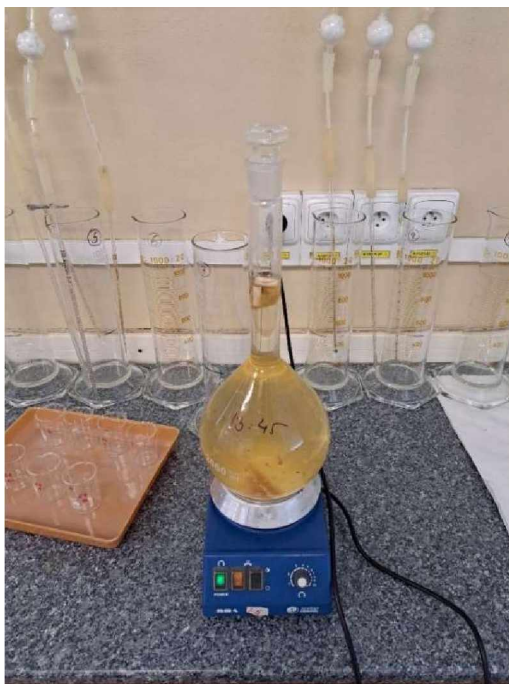
Vzhledem k povaze testu bylo také nutné před testem připravit výluh z nedopalků. Pro tento účel byly sbírány nedopalky v různých částech města Pardubice (nádraží, okolí univerzity, prostor zastávek MHD). Sběr vyžadoval důraz na čerstvost nedopalku, aby z nich nebyl nějaký podíl škodlivin již vyloužen, a tím zkreslen výsledek testování. Pro test byly použity pouze nedopalky od cigaret značky Marlboro, zejména pro známý obsah sledovaných škodlivin, tedy nikotinu a dehtu, a dalších aditiv.

Základní koncentrace byla po konzultaci odborné literatury – [4; 27; 34] – zvolena na 2 nedopalky na litr. Výluhu byly připraveny 2 litry. Z posbíraného materiálu tedy byly vybrány 4 nedopalky s podobnou velikostí (průměrná váha 1,296 g). Byly vybírány takové, které obsahovaly část použitého filtru i část tabáku.

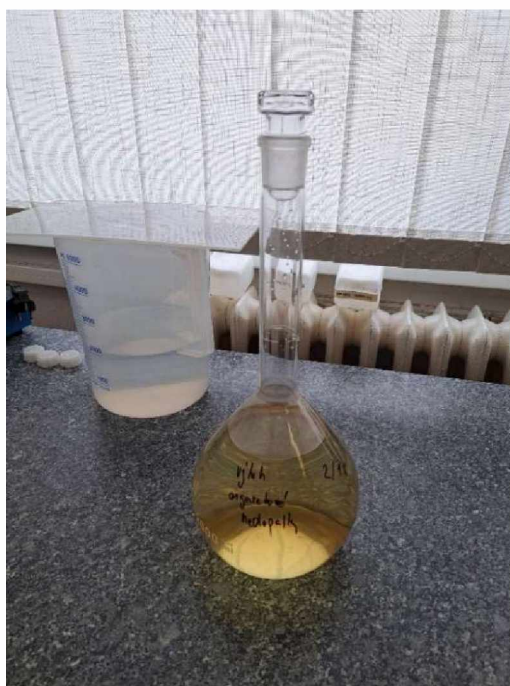
Do odměrné baňky byly umístěny 4 nedopalky a doplněny předem připravenou zředovací vodou po rysku. Následně byla směs za pokojové teploty 24 hodin míchána magnetickým míchadlem (Obrázek 9).

Po uplynutí této doby byly z nádoby pinzetou vybrány nedopalky a výluh byl zfiltrován na papírovém filtru (díky míchání se nedopalky rozložily a voda tak obsahovala papírová vlákna a kousky tabáku, které nebylo pinzetou možné vyjmout) (Obrázek 10).

Výluh byl až do použití umístěn do lednice a skladován při 4 °C.



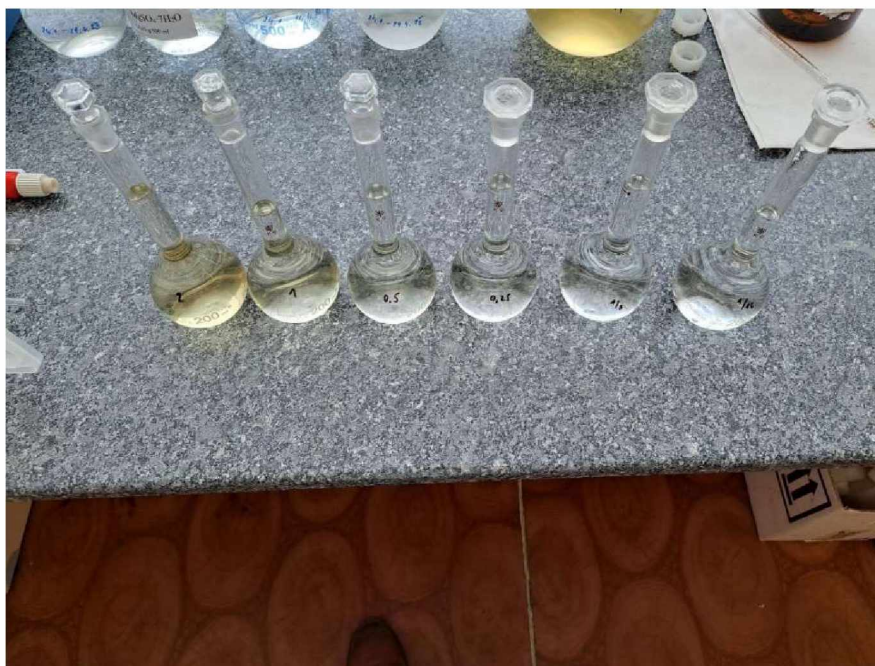
Obrázek 9 – Výluh z CN po 24 hodinách míchání [58]



Obrázek 10 – Výluh z CN po zfiltrování [58]

2.1.6. Průběh testu

Test byl nasazen se šesti koncentracemi, které byly připraveny ředěním základního roztoku. Tyto koncentrace tvoří geometrickou řadu s dělicím koeficientem 2. Pro jednoduchost je koncentrace vyjadřována v dílech cigaretových nedopalků na litr zředovací vody (2, 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ a kontrolní roztok obsahující pouze zředovací vodu) (Obrázek 11).



Obrázek 11 – Koncentrační řada výluhů z CN [58]

Každá koncentrace byla testována na 20 dafniích, které byly po 24 hodinách odebrány z nádoby, kam byly o den dříve umístěny samice s vajíčky. Pro přesné počítání imobilizovaných jedinců byl tento počet rozdělen do 2 řad (2 sad kádinek) s 10 dafniemi na koncentraci (Obrázek 12).

Po připravení koncentrační řady byl v každém roztoku změřen obsah kyslíku a pH. Roztoky odpovídaly požadavkům, byly tedy rozlity do kádinek (do každé přišlo 50 ml) a následně do nich byly vyloveny perloočky v požadovaném počtu. Kádinky byly překryty ochranným sklem a umístěny do temperované místnosti.

Po 24 hodinách proběhlo přepočítání imobilizovaných dafnií a překontrolování laboratorní teploty. Po 48 hodinách byly hodnoty odečteny znovu, v jednotlivých kádinkách byl přeměřen obsah kyslíku a pH a test byl ukončen. Všechna data byla průběžně zaznamenávána do protokolu (Tabulka 4, 5, 6). Dosažené výsledky vyhodnotil program ToxRatPro Version 3.3.0, který také spočítal EC_{50} .



Obrázek 12 – Testované organismy rozdělené do dvou řad [58]

2.2. Výsledky testování

2.2.1. Výsledky testu toxicity

Tabulka 4 – Závislost imobilizace dafnií na koncentraci výluhu cigaretového nedopalku

koncentrace výluhu cigaretového nedopalku [ks/l]		2	1	1/2	1/4	1/8	1/16	K
počet dafnií	24 h – 1 řada	0	6	6	10	10	10	10
počet dafnií	24 h – 2 řada	0	5	7	10	10	10	10
počet dafnií	24 h – celkem	0	11	13	20	20	20	20
imobilizace %	24 h	100	45	35	0	0	0	0
počet dafnií	48 h–1 řada	0	0	4	7	9	10	10
počet dafnií	48 h–2 řada	0	1	5	8	9	10	10
počet dafnií	48 h – celkem	0	1	9	15	18	20	20
imobilizace %	48 h	100	95	55	25	10	0	0

Tabulka 5 – Obsah kyslíku ve výluzích cigaretových nedopalků

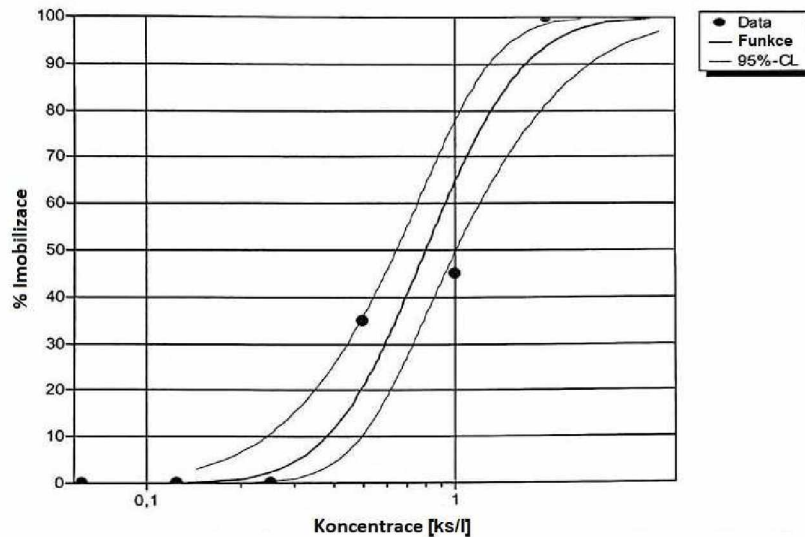
koncentrace výluhu cigaretového nedopalku [ks/l]		2	1	1/2	1/4	1/8	1/16	K
O ₂ (mg/l)	0 h	4,38	5,97	7,28	7,74	8,17	8,14	8,15
O ₂ (mg/l)	48 h	8,56	8,45	8,57	8,78	8,71	8,76	8,65

Tabulka 6 – Hodnoty pH roztoku výluhu cigaretových nedopalků

koncentrace výluhu cigaretového nedopalku [ks/l]		2	1	1/2	1/4	1/8	1/16	K
pH	0 h	7,1	7,28	7,47	7,66	7,74	7,79	7,76
pH	48 h	7,72	7,68	7,68	7,69	7,67	7,67	7,56

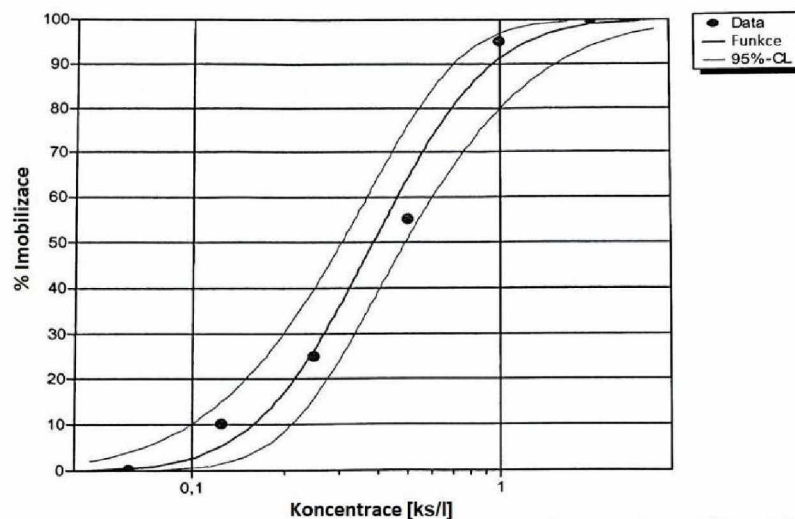
2.2.2. Vyhodnocení

Z uvedených dat vypočítal program ToxRat pro data po 24 hodinách závislost procenta imobilizovaných dafnií na koncentraci nedopalků (Obrázek 13):



Obrázek 13 – Závislost imobilizace dafnií na koncentraci výluhu CN po 24 hodinách

Pro data po 48 hodinách byla závislost následující (Obrázek 14):



Obrázek 14 – Závislost imobilizace dafnií na koncentraci výluhu CN po 48 hodinách

Z uvedených závislostí je zřejmé, že test proběhl v pořádku a poskytl data, která lze vyhodnotit pomocí matematické funkce. Program umožňuje výpočet hodnot EC_{50} .

Výsledkem výpočtu jsou hodnoty:

24 hodin – EC₅₀ = 0,81 CN ks/l

48 hodin – EC₅₀ = 0,39 CN ks/l

Výsledky odpovídají vstupnímu předpokladu a informacím získaným z odborné literatury.

Při pozorování organismů, které byly výluhem z nedopalků imobilizovány, byl zaznamenán jistý vliv vyloužených látek. Organismy z kontrolní skupiny odpovídaly vzhledem organismům z původního chovu – jejich tykadla byla dobře vyvinuta, brvy čisté, a vzhledem k nepřítomnosti potravy v testovaných roztocích měly v trávicí trubici pouze zbytky řas z matečného roztoku (Obrázek 15).



Obrázek 15 – Dafnie z kontrolní skupiny [57]

Na rozdíl od nich u organismů, u nichž koncentrace výluhu z CN činila alespoň $\frac{1}{8}$, bylo možné zaznamenat vznik úsad žlutých kapének na brvách, případně jejich přítomnost v jejich trávicí trubici (Obrázek 16).

Se zvyšujícím se podílem CN v roztoku se tento efekt zvyšoval (Obrázek 17, 18). Imobilizace dafnií byla viditelně způsobena touto sloučeninou. Slepovala brvy na tykadlech k sobě, případně tykadla k tělu organismu, některé exempláře byly i přilepeny k sobě zájem ve skupinách po dvou nebo i více a nebyly vlastními silami schopny se oddělit.

Při bližším prozkoumání jednoho takového organismu bylo možné vidět odtrženou schránku jiného, přilepenou k jeho tykadlům. Ačkoli chemické složení této sloučeniny nebylo zkoumáno, lze předpokládat, že se jedná o dehtovitou látku. Její lepicí vlastnosti byly pravděpodobně příčinou usmrcení některých organismů, protože jim zamezily pohyb končetinami i celým tělem a tím způsobily jejich udušení.



Obrázek 16 – Dafnie z koncentrace 1/8 ks/l [58]



Obrázek 17 – Dafnie z koncentrace 1 ks/l [58] **Obrázek 18** – Dafnie z koncentrace 2 ks/l [58]

ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala studiem ekotoxicity cigaretových nedopalků. Na základě ekotoxikologických testů, které byly realizovány ve spolupráci s Výzkumným ústavem organických syntéz v Rybitví, provedených podle standardizovaných metodik (OECD [50], resp. ČSN ISO 6341 [48]), byla zjištěna hodnota EC_{50} , která odpovídala hodnotě 0,81 nedopalku na 1 litr standardní vody pro 24 hodin a hodnotě 0,39 nedopalku pro 48-hodinový test. Přepočtem dat pomocí průměrné hmotnosti použitých nedopalků a porovnáním s požadavky pro zařazení do skupiny ekotoxických látek podle nařízení REACH, bylo zjištěno, že podle platné legislativy nedopalky nelze zařadit na seznam akutně ekotoxických látek. Jejich toxicita je ale zjevná a vzhledem k roční produkci tohoto odpadu nepochybně dává důvod se touto externalitou tabákového průmyslu zabývat.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] TSO, T. C. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry: Tobacco*. 5th. Weinheim: VCH, 1985. ISBN 3-527-20104-1.
- [2] KUBÁNEK, Vladimír. *Tabák a tabákové výrobky: (historie, pěstování, zpracování, legislativa)*. 1. Brno: Tribun EU, 2009. ISBN 978-80-7399-898-1.
- [3] VAN GELDER, Koen. Cigarettes - Worldwide: Tobacco Products. *Statista: Consumer Market Insights* [online]. Amsterdam (The Netherlands): Statista Inc., 2023 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: <https://www.statista.com/outlook/cmo/tobacco-products/cigarettes/worldwide>.
- [4] SLAUGHTER, E., R. GERSBERG, K. WATANABE, J. RUDOLPH, C. STRANSKY a T. NOVOTNY. Toxicity of cigarette butts, and their chemical components, to marine and freshwater fish. *Tobacco Control* [online]. 2011, **20**(1), 25-29 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1136/tc.2010.040170. ISSN 0964-4563.
- [5] RODGMAN, Alan a Thomas PERFETTI. *The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke*. Florida, USA: CRC Press, 2008. ISBN 9781466515482.
- [6] Nicotiana L.: Solanaceae. *Plants of the World Online: Royal Botanic Gardens, Kew* [online]. Richmond, UK: Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew, © 2022 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:325974-2>.
- [7] VAN GELDER, Koen. Leading tobacco companies worldwide in 2021, based on market value: Tobacco. *Statista: Consumer Goods & FMCG* [online]. Amsterdam (The Netherlands): Statista Inc., 2023 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: <https://www.statista.com/statistics/942132/leading-10-tobacco-companies-worldwide-based-on-net-sales/>.
- [8] Making cigarettes: What's in a cigarette?. In: *Philip Morris International* [online]. Stamford (Connecticut): Philip Morris Products S.A. [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: <https://www.pmi.com/faq-section/smoking-and-cigarettes/how-cigarettes-are-made>.
- [9] Additives used in tobacco products: Tobacco Additives I. *European Commission* [online]. Brussel (Belgium): Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks [cit. 2023-05-17]. Dostupné z:

- https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_051.pdf.
- [10] NOVOTNY, Thomas, Kristen LUM, Elizabeth SMITH, Vivian WANG a Richard BARNES. Cigarettes Butts and the Case for an Environmental Policy on Hazardous Cigarette Waste. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2009, **6**(5), 1691-1705 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph6051691. ISSN 1660-4601.
- [11] TANG, J.-L., J. MORRIS, N. WALD, D. HOLE, M. SHIPLEY a H. TUNSTALL-PEDOE. Mortality in relation to tar yield of cigarettes: a prospective study of four cohorts. *BMJ* [online]. 1995, **311**(7019), 1530-1533 [cit. 2023-02-17]. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.311.7019.1530. ISSN 0959-8138.
- [12] ENGELAND, A., T. HALDORSEN, A. ANDERSEN a S. TRETTLI. The impact of smoking habits on lung cancer risk: 28 years' observation of 26,000 Norwegian men and women. *Cancer Causes and Control* [online]. 1996, **7**(3), 366-376 [cit. 2023-02-17]. Dostupné z: doi:10.1007/BF00052943. ISSN 0957-5243.
- [13] HARRIS, J. E.. Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8. *BMJ* [online]. 2004, **328**(7431), 72-0 [cit. 2023-02-17]. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.37936.585382.44. ISSN 0959-8138.
- [14] FONGSODSRI, K., S. CHAMNANCHANUNT, V. DESAKORN, V. THANACHARTWET, D. SAHASSANANDA, P. ROJNUCKARIN a T. UMEMURA. Particulate Matter 2.5 and Hematological Disorders From Dust to Diseases: A Systematic Review of Available Evidence. *Frontiers in Medicine* [online]. 2021, **8** [cit. 2023-02-17]. Dostupné z: doi:10.3389/fmed.2021.692008. ISSN 2296-858X.
- [15] ČESKO. Zákon č. 174/2021 Sb., kterým se mění zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a další související zákony. In: *Sbírka zákonů České republiky*, 2021, částka 71, číslo 174. Dostupné také z: https://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=174/2021&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy. ISSN 1211-1244.
- [16] ČESKO. Zákon č. 353/2003 Sb., Zákon o spotřebních daních. In: *Sbírka zákonů České republiky*, 2003, částka 118, číslo 353. Dostupné také z: https://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=353/2003&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy. ISSN 1211-1244.

- [17] ČESKO. Zákon č. 65/2017 Sb., o ochraně zdraví před škodlivými účinky návykových látek. In: *Sbírka zákonů České republiky*, 2017, částka 21, číslo 65. Dostupné také z: https://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=65/2017&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy. ISSN 1211-1244.
- [18] ČESKO. Zákon č. 242/2022 Sb., o službách platform pro sdílení videonahrávek a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o službách platform pro sdílení videonahrávek). In: *Sbírka zákonů České republiky*, 2022, částka 111, číslo 242. Dostupné také z: https://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=242/2022&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy. ISSN 1211-1244.
- [19] ČESKO. Zákon č. 186/2016 Sb., o hazardních hrách. In: *Sbírka zákonů České republiky*, 2016, částka 71, číslo 186. Dostupné také z: https://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=186/2016&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy. ISSN 1211-1244.
- [20] ČESKO. Vyhláška č. 261/2016 Sb., o tabákových výrobcích. In: *Sbírka zákonů České republiky*, 2016, částka 101, číslo 261. Dostupné také z: https://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=261/2016&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy. ISSN 1211-1244.
- [21] WEI, X., Y. LIU a Y. TANG. Nicotine content of tobacco leaf estimated by UV spectrum. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [online]. 2018, **185** [cit. 2023-02-18]. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/185/1/012017. ISSN 1755-1315.
- [22] SOLEIMANI, Farshid, S. DOBARADARAN, G. DE-LA-TORRE, T. SCHMIDT a R. SAEEDI. Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review. *Science of The Total Environment* [online]. 2022, **813** [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.152667. ISSN 00489697.
- [23] SMITH, E. a T. NOVOTNY. Whose butt is it? tobacco industry research about smokers and cigarette butt waste. *Tobacco Control* [online]. 2011, **20**(1), 2-9 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1136/tc.2010.040105. ISSN 0964-4563.
- [24] JONES, Janis Searles. Connect + Collect. *Ocean Conservancy* [online]. Washington, D.C: Ocean Conservancy, 2023 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: <https://oceanconservancy.org/wp-content/uploads/2022/09/Annual->

Report_FINALWebVersion.pdf.

- [25] ARAÚJO, Maria a Monica COSTA. A critical review of the issue of cigarette butt pollution in coastal environments. *Environmental Research* [online]. 2019, **172**(1), 137-149 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2019.02.005. ISSN 00139351.
- [26] BONANOMI, G., G. INCERTI, G. CESARANO, S. GAGLIONE, V. LANZOTTI a A. SINGER. Cigarette Butt Decomposition and Associated Chemical Changes Assessed by ¹³C CPMAS NMR. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(1) [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0117393. ISSN 1932-6203.
- [27] MICEVSKA, T., M. WARNE, F. PABLO a R. PATRA. Variation in, and Causes of, Toxicity of Cigarette Butts to a Cladoceran and Microtox. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 2006, **50**(2), 205-212 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1007/s00244-004-0132-y. ISSN 0090-4341.
- [28] BELZAGUI, F., V. BUSCIO, C. GUTIÉRREZ-BOUZÁN a M. VILASECA. Cigarette butts as a microfiber source with a microplastic level of concern. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, **762**(1) [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144165. ISSN 00489697.
- [29] YADAV, Nisha a Minna HAKKARAINEN. Degradable or not? Cellulose acetate as a model for complicated interplay between structure, environment and degradation. *Chemosphere* [online]. 2021, **265** [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128731. ISSN 00456535.
- [30] SOLEIMANI, F., S. DOBARADARAN, A. VAZIRIZADEH et al. Chemical contents and toxicity of cigarette butts leachates in aquatic environment: A case study from the Persian Gulf region. *Chemosphere* [online]. 2023, **311** [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2022.137049. ISSN 00456535.
- [31] COMPA, M., A. VENTERO, M. IGLESIAS a S. DEUDERO. Ingestion of microplastics and natural fibres in *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) and *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) along the Spanish Mediterranean coast. *Marine Pollution Bulletin* [online]. 2018, **128**, 89-96 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2018.01.009. ISSN 0025326X.
- [32] MACEDO, G., T. PIRES, G. ROSTÁN, D. GOLDBERG, D. LEAL, A. GARCEZ NETO a C. FRANKE. Ingestão de resíduos antropogênicos por tartarugas marinhas no litoral norte do estado da Bahia, Brasil. *Ciência Rural* [online]. 2011, **41**(11), 1938-1941

- [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: doi:10.1590/S0103-84782011001100015. ISSN 0103-8478.
- [33] CONRADI, M. a J. SÁNCHEZ-MOYANO. Toward a sustainable circular economy for cigarette butts, the most common waste worldwide on the coast. *Science of The Total Environment* [online]. 2022, **847** [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.157634. ISSN 00489697.
- [34] NOVOTNY, Thomas E. Environmental accountability for tobacco product waste. *Tobacco Control* [online]. San Diego (USA): British Medical Journal, 2020, **29**(2), 138-139 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1136/tobaccocontrol-2019-055023. ISSN 0964-4563.
- [35] Nanotechnologie využívající cigaretové nedopalky napomůže při odstraňování hormonů z odpadních vod. *Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně* [online]. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2023 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: <https://zpravy.utb.cz/2023/01/20/nanotechnologie-vyuzivajici-cigaretove-nedopalky-napomuze-pri-odstranovani-hormonu-z-odpadnich-vod/>.
- [36] LEE, M., G.-P. KIM, H. DON SONG, S. PARK aj. YI. Preparation of energy storage material derived from a used cigarette filter for a supercapacitor electrode. *Nanotechnology* [online]. 2014, **25**(34) [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/25/34/345601. ISSN 0957-4484.
- [37] XIONG, Q., Q. BAI, C. LI, H. LEI, C. LIU, Y. SHEN a H. UYAMA. Cost-Effective, Highly Selective and Environmentally Friendly Superhydrophobic Absorbent from Cigarette Filters for Oil Spillage Clean up. *Polymers* [online]. 2018, **10**(10) [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.3390/polym10101101. ISSN 2073-4360.
- [38] REBISCHUNG, F., L. CHABOT, H. BIAUDET a P. PANDARD. Cigarette butts: A small but hazardous waste, according to European regulation. *Waste Management* [online]. 2018, **82**, 9-14 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2018.09.038. ISSN 0956053X.
- [39] PROKEŠ, Jaroslav et al. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE. *Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 248 s. ISBN 80-7262-301-X.
- [40] KOČÍ, Vladimír a Klára MOCOŮVÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky*. 1. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2009, 180 s. Dostupné také z:

- https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-699-9. ISBN 978-80-7080-699-9.
- [41] MARŠÁLEK, Blahoslav. *Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití* [online]. Brno: RECETOX – Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii, Masarykova univerzita, 2008 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/sci/jaro2008/Bi5620/um/5135634/>.
- [42] WILLIAMS, Phillip, Robert JAMES a Stephen ROBERTS. *Principles of toxicology: environmental and industrial applications*. 2nd ed. New York: Wiley, 2000. ISBN 0-471-29321-0.
- [43] JIA, H., Y. ZHAO, H. DENG, H. YU, D. FENG, Y. ZHANG, C. GE a J. LI. Significant contributions of biochar-derived dissolved matters to ecotoxicity to earthworms (*Eisenia fetida*) in soil with biochar amendment. *Environmental Technology & Innovation* [online]. 2023, **29** [cit. 2023-05-31]. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2022.102988. ISSN 23521864.
- [44] YANG, Yajie, Y. LIU, Y. CHEN, Y. WANG, P. SHAO, R. LIU, G. GAO a J. ZHI. A portable instrument for monitoring acute water toxicity based on mediated electrochemical biosensor: Design, testing and evaluation. *Chemosphere* [online]. 2020, 255 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126964. ISSN 00456535.
- [45] LEE, J., R. MITCHELL, B. KIM, D. CULLEN a M. GU. A cell array biosensor for environmental toxicity analysis. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2005, **21**(3), 500-507 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2004.12.015. ISSN 09565663.
- [46] ROVIDA, Costanza. Toxicity testing in the 21st century beyond environmental chemicals. *ALTEX* [online]. 2015, **32**(3), 171-181 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: doi:10.14573/altex.1506201. ISSN 1868596X.
- [47] BAUTISTA-CHAMIZO, E., M. SENDRA, M.R. DE ORTE a I. RIBA. Comparative effects of seawater acidification on microalgae: Single and multispecies toxicity tests. *Science of The Total Environment* [online]. 2019, **649**, 224-232 [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.225. ISSN 00489697.
- [48] ČSN EN ISO 6341 (757751). *Kvalita vod - Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Zkouška akutní toxicity*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2013. ICS 13.060.70. C.2.

- Zkouška akutní imobilizace dafnií (*Daphnia sp.*).
- [49] Nařízení Komise (ES) č. 440/2008 ze dne 30. května 2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (Text s významem pro EHP). Brusel: Komise Evropských společenství, 2008.
- [50] Test No. 202: *Daphnia sp. Acute Immobilisation Test* [online]. Paris: OECD, 2004 [cit. 2023-05-16]. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Dostupné z: doi:10.1787/9789264069947-en. ISBN 9789264069947.
- [51] About. *OECD* [online]. Organisation for Economic Co-operation and Development [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: <https://www.oecd.org/about/>.
- [52] EUROPEAN STANDARDIZATION: CEN and CENELEC. *CEN CENELEC* [online]. CEN-CENELEC, 2023 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: <https://www.cencenelec.eu/european-standardization/cen-and-cenelec/>.
- [53] Úřad: O Úřadu. *ÚNMZ* [online]. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2023 [cit. 2023-05-16]. Dostupné z: <https://www.unmz.cz/obecne/o-uradu/>
- [54] CHEMICKÉ LÁTKY A SMĚSI. *Fssystem* [online]. Brno: FS system s.r.o., 2015 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: <https://www.fssystem.cz/cs/aktuality/17-chemicke-latky-a>
- [55] 4.1.2: Kritéria klasifikace pro látky. *REACH Online* [online]. [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: <https://reachonline.eu/clp/cs/priloha-i-4-4.1-4.1.2.htm.1>
- [56] KOLÁČEK, Tomáš. Využití hrotnatky *Daphnia magna* v ekotoxikologických biotestech. *Živa* [online]. Praha: Academia, 2015, 6 [cit. 2023-05-31]. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/2015-6/vyuziti-hrotnatky-daphnia-magna-v-ekotoxikologicky-ch-biotestech.html>.
- [57] DIETER, Ebert. *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia* [online]. 1st. Bethesda (Maryland): National Library of Medicine (US): National Center for Biotechnology Information, 2005, 110 s. [cit. 2023-05-31]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2036/>. ISBN 1-932811-06-0.
- [58] SKALOVÁ, Martina. *Vlastní fotografie*. Pardubice, 2023.