UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023 Vojtěch Janda

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie

Analytické metody pro monitorování mikroplastů v životním prostředí

Bakalářské práce

AUTOR PRÁCE: Vojtěch Janda
VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Milan Sýs, Ph.D.

(2023)

Univerzity of Pardubice
Faculty of chemical technology
Department of analytical chemistry

Analytical methods for monitoring microplastics in the environment

Bachelor thesis

AUTHOR: Vojtěch Janda
SUPERVISOR: Ing. Milan Sýs, Ph.D.

(2023)

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Vojtěch Janda**
Osobní číslo:	**C19116**
Studijní program:	**B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce:	**Analytické metody pro monitorování mikroplastů v životním prostředí**
Zadávající katedra:	**Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma problematika mikroplastů v životním prostředí. Popište možnosti kontaminace potravin mikroplasty a uveďte zdravotní rizika. V poslední řadě vypracujte přehled analytických metod vyvinutých pro monitorování mikroplastů v životním prostředí a potravinách. Stručně popište princip jednotlivých analytických metod a kriticky zhodnoťte jejich výhody a nevýhody. Celou bakalářskou práci ilustrujte příslušnými obrázky, grafy a přehledovými tabulkami.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Analytické metody pro monitorování mikroplastů v životním prostředí, jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen 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 směrnicí 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 29. 6. 2023

Vojtěch Janda

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu bakalářské práce Ing. Milanovi Sýsovi, Ph.D. za užitečné informace, odporné vedení, ochotu, vstřícnost a trpělivost při zpracování této práce. V neposlední řádě jsem velmi vděčný mé rodině a přítelkyni za psychickou podporu a trpělivost během celého mého studia.

Název

Analytické metody pro monitorování mikroplastů v životním prostředí

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou mikroplastů v životním prostředí a možnostmi sekundární kontaminace potravin s ohledem na jejich toxicitu. V úvodu jsou zmíněná rizika pro lidský organismus a legislativa týkající se plastového odpadu. Tato rešeršní práce nabízí detailní přehled doposavad vyvinutých analytických metod, která se používají pro monitorování mikroplastů v enviromentálních vzorcích. Důraz je kladen především na kritické hodnocení jednotlivých analytických přístupů, přičemž pro praktické účely se musí používat vždy jejich kombinace.

Klíčová slova

Mikroplasty; polymery; legislativa; životní prostředí; analytické metody.

Tittle

Analytical methods for monitoring microplastics in the environment

Annotation

This bachelor's thesis deals with the problematics of microplastics in the environment and the possibilities of their secondary contamination of food, regarding to their toxicity. In the introduction, the risks for the human organism and the legislation related to the management of plastic waste are mentioned. This scientific work offers a detailed overview of the analytical methods developed so far for the monitoring of microplastics in environmental samples. The emphasis is mainly placed on the critical evaluation of individual analytical approaches, whereas their combination must always be used for practical purposes.

Keywords

Microplastics; polymers; legislation; environment; analytical methods.

Obsah

1. Úvod 12
2. Mikroplasty 13
2.1. Legislativa 14
2.1.1. Mezinárodní dohody 14
2.1.2. Evropské právo 15
2.2. Mikroplasty v potravinách 15
2.3. Rizika mikroplastů pro lidské zdraví 17
2.3.1. Absorpce mikroplastů do těla 17
2.3.2. Toxicita pro lidi 19
2.3.3. Onemocnění způsobené intoxikací mikroplasty 20
3. Monitorování mikroplastů 25
3.1. Požadavky analytických metod pro monitorování mikroplastů 26
3.2. Odběr a příprava vzorků 27
3.2.1. Odběr vzorků z vodních zdrojů 27
3.2.2. Vzorkování sedimentů 29
3.2.3. Odběr živých organismů pro analýzu 30
3.2.4. Vzorkování půdy 31
3.2.5. Izolace mikroplastů z enviromentálních vzorků 32
3.2.6. Analytické metody používané pro identifikaci a kvantifikaci mikroplastů 36
4. Závěr 51

Seznam ilustrací

Obrázek 1. Typy vlečných sítí pro odběr vzorků povrchových vod (vlevo nahoře) a samotný sběr planktonu s bongo sítě (vpravo). 28
Obrázek 2. Drapák Van Veen (vlevo) a Ekmanův drapák (vpravo). 30
Obrázek 3. Princip kvartace sypkých materiálů. 32
Obrázek 4. Sada testovacích sít. 33
Obrázek 5. Snímky z metody Sem 38
Obrázek 6. Snímky z metody TEM 39
Obrázek 7. Snímky vzorků barvené Nilskou červení 41
Obrázek 8. FTIR spektra plastů v transmisním a v ATR módu 43
Obrázek 9. Porovnání Ramanova spektra a FTIR spektra 44
Obrázek 10. Schématické znázornění přístroje pro diferenciální skenovací kalorimetrii 45
Obrázek 11. Průběh termografu pro různé polymery 46
Obrázek 12. Hmotnostní spektra produktů pyrolýzy 48
Obrázek 13. Schématické zobrazení přístroje používaného pro PY-GC-MS 48
Obrázek 14. Snímky pořízené metodou AFM 50

Seznam tabulek

Tabulka 1. Hustota roztoků solí a jejich výhody a nevýhody 35

Seznam zkratek a značek

ABS	kopolymer akrylonitril-butadien-styren
AFM	Mikroskopie atomárních sil
ATR	Oslabená celková odrazivost
BPA	Bisfenol A
BSE	Detektor vysokoenergetických zpětně rozptýlených elektronů
DSC	Diferenční skenovací kalorimetrie
EDX	Energetická disperzní rentgenová spektroskopie
FTIR	Infračervená spektroskopie
HDPE	Polyethylen s vysokou hustotou
LDPE	Polyethylen s nízkou hustotou
MP	Mikroplasty
N6	Nylon-6
N66	Nylon-6,6
NIR	Spektroskopie v blízké infračervené oblasti
NOAA	Národní úřad pro oceán a atmosféru
NTA-AFM	Nano termální analýza
PC	Polykarbonát
PE	Polyethylen
PET	Polyethylen tereftalát
PMMA	Polymethylmethakrylát
POP	Perzistentní organické polutanty
PP	Polypropylen
PS	Polystyren
PU	Polyuretan na bázi methylen difenyl diisokyanátu
PUA	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PVC	Polyvinylchlorid
PY-GC-MS	Pyrolytická plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SE	Detektor sekundárních elektronů
SPE	Extrakce na pevné fázi
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TGA	Termogravimetrická analýza

1. Úvod

Jak je všeobecně známo, dnes žijeme v „době plastové“, kdy spotřeba plastů každý rok roste a s tím se také zvětšuje množství plastového odpadu v přírodě, a to zejména v oceánech, a proto se musí plasty recyklovat, aby se předcházelo kontaminaci životního prostředí. Bohužel v dnešní době se setkáváme s problematikou mikroplastů, jejichž přítomnost (sekundární kontaminace) v potravinách má neblahé účinky na lidské zdraví.

Problematika mikroplastů se diskutuje od roku 2017, kdy byla provedena pilotní studie pitných vod z různých kontinentů. Procesy, kterými se mikroplasty dostávají do životního prostředí, nejsou zcela objasněny, a tudíž nelze s jistotou říci, které činnosti člověka nesou největší podíl na kontaminaci přírody. Kromě samotné přítomnosti mikroplastů se také sleduje jejich toxicita, včetně adsorbovaných toxických látek na jejich površích. Přestože již byla nesčetněkrát dokázána přítomnost mikroplastů v životním prostředí a dokonce i v potravinách, není do dnešního dne zavedena žádná legislativa týkající se mikroplastů.

Na základě výše uvedených skutečností tato bakalářská práce pojednává o rizicích výskytu mikroplastů, jak v životním prostředí, tak i v potravinách, a o analytických metodách, které se doposud vyvinuly pro monitorování mikroplastů. Největší důraz je kladen na způsoby odběru vzorků (vzorkování), jejich úpravu a závěrečnou analýzu.

Celá práce je rozdělena do sedmi dílčích kapitol. Práce vymezuje pojem mikroplasty a podává informaci o legislativě, která nepřímo reguluje mikroplasty v životním prostředí. Dále jsou zmíněna rizika pro lidský organismus spojena s těmito částicemi. V další části jsou pak popsány postupy pro správný odběr vzorků a přístupy používané k izolaci mikroplastů od balastního materiálu, který by mohl následně rušit vlastní stanovení. U analytických metod je v úvodu popsán princip a jsou zohledněny jejich výhody a nevýhody.

Ze získaných poznatků vyplývá, že dosavadní legislativa týkající mikroplastů je zcela nedostačující. Jelikož doposud nejsou objasněny mechanismy (biochemické procesy) vzniku onemocnění vyvolanými mikroplasty, je zcela zásadní nejdříve tomuto zdravotnímu riziku předcházet. V životním prostředí způsobují mikroplasty vymíraní planktonu, na kterém jsou závislé ryby a nich zas vyšší savci. Doposud bylo vyvinuto několik nedestruktivních (mikroskopické a spektrální) a destruktivních (teplená degradace) metod, jejichž kombinace se ukazuje být slibným univerzálním nástrojem v monitorování mikroplastů. Nicméně platí, že je lepší rizikům předcházet, než je analyzovat a vyhodnocovat.

2. Mikroplasty

Množství antropogenního odpadu ve vodních a suchozemských prostředích se v posledních několika desetiletích výrazně zvýšilo, přičemž 60 až 80 % z antropogenního odpadu tvoří právě plasty. Samotná výroba plastů započala v 50. letech 20. století a v současné době přesahuje množství plastů 280 milionů tun. Odhaduje se, že 4,8 až 12,7 milionů tun plastu, kterým bylo nesprávně nakládáno, se dostává každoročně do oceánů [1].

MP se dají definovat jako drobné plastové částice o velikosti menší než 5 mm pocházející z primárních a sekundárních plastů. Primárními zdroji jsou polyethylen, polypropylen a částice polystyrenu v kosmetických a zdravotních výrobcích. V několika zemích, včetně Spojených států a Kanady, je prodej kosmetických výrobků obsahující mikroplasty zakázán. Sekundární mikroplasty pocházejí z fyzikálních, chemických a biologických procesů, jejichž výsledkem je fragmentace plastů. Vystavení ultrafialovému záření katalyzuje foto-oxidaci plastů, což způsobuje jejich křehnutí a fragmentaci na mikroplasty [1,2].

V mořském prostředí dochází k degradaci plastů abiotickými nebo biotickými procesy. Abiotický proces je vyvolán termicky, hydrolyticky a UV zářením. Biotická degradace je definována jako rozklad, na kterém se podílejí mikroorganismy. Zatímco teplo, sluneční záření a provzdušněné podmínky napomáhají ke vzniku mikroplastů prostřednictvím fragmentačních procesů. Naopak chladné a anoxické podmínky ve vodě a v sedimentech způsobují zpomalení degradace, která v těchto podmínkách může trvat i celá staletí. Různé zdroje mikroplastů zapříčiňují že se vyskytují v různých tvarech, jako jsou pelety, vlákna a úlomky. Primární mikroplasty se s největší pravděpodobností dostávají do vodního prostředí vypouštěním odpadních vod z domácností nebo rozlitím plastových pryskyřic v prášku. Dalším významným zdrojem je tzv. aplikace čistírenských kalů obsahující syntetická vlákna nebo sedimentované mikroplasty z výrobků pro osobní hygienu nebo výrobků pro domácnost. Vlákna jsou nejčastěji hlášenou formou mikroplastů, v důsledku neustálého otěru oděvů a čalounění ze syntetických textilií a vypouštění odpadních vod z praček. Odhaduje se, že jeden předmět může uvolnit až 1900 vláken. V této souvislosti se dá textilní průmysl považovat za největším zdrojem mikroplastů. Tato teorie nebyla dosud prokázaná. Mikroplasty ze sekundárních zdrojů se uvolňují z odhozených odpadků a při zpracování a likvidaci komunálního odpadu. Nedávno zveřejněné studie naznačují, že zemědělství je jednou z hlavních antropogenních činností, které přispívají ke znečistění půdy mikroplasty. Toto

znečištění vzniká v důsledku používání kalů z čistíren odpadních vod k úpravě vody, ale i v důsledku používání půdních substrátů ke zvýšení úrodnosti půdy [1].

2.1. Legislativa

V celosvětovém měřítku došlo k značnému vývoji v právních předpisech týkajících se plastového odpadu. Dále se zvýšily dotace na recyklaci a využitelnost plastového odpadu. S plastovým odpadem je nakládáno v závislosti na jeho velikosti, a to podle toho, zda se jedná o mikroplasty, střední plasty nebo makroplasty. V roce 1991 byla zavedena první vyhláška s cílem snížit spotřebu plastových tašek. Tyto vyhlášky ustanovovaly poplatky a zákazy pro používání plastových tašek. Na regionální úrovni měla tato strategie velmi pozitivní dopad na snížení používání tašek z polyethylenu. Wales jako první ve Velké Británii zavedl poplatek ve výši 5 pencí za jednorázové tašky. Ve Spojených státech bylo přijato nejméně 471 místních vyhlášek týkajících se používání plastových pytlů. V roce 2019 bylo představeno 28 státy 95 návrhů zákonů s cílem zcela zakázat plastové tašky a zlepšit jejich recyklaci. Osm amerických státu zakázalo používání jednorázových plastových tašek počínaje Havajskými ostrovy v roce 2011 [3].

Kromě zavedení poplatků, daní a zákazů, další strategií k regulaci plastového odpadu jsou dobrovolné kampaně, kterých se účastnily obchodní řetězce. Závěrečná zpráva Kodexu ARA uvedla, že supermarkety a další obchodní řetězce, které se zúčastnily iniciativy, dosáhly snížení plastových tašek o 26,9 % V roce 2018 na setkání G7 byla podepsána dohoda *„Ocean Plastic Charter“* s cílem zabránit růstu plastového odpadu v oceánech, a tak zamezit zbytečnému používání jednorázových plastových sáčků a zlepšit jejich recyklaci. Zejména přijetím konkrétních opatření ve spolupráci s průmyslovým odvětvím je snaha dosáhnout 100% recyklovatelnosti a využitelnosti plastů do roku 2030. Dále se udává, že do roku 2030 by mělo být 55 % plastových obalů recyklovatelných a do roku 2040 už 100 % plastových obalů. Kromě toho dohoda umožňuje podporu kampaně na zvýšení povědomí o mořských odpadech, a to prostřednictvím sběru dat o znečištění a odstraňování odpadků [4].

2.1.1. Mezinárodní dohody

Do dnešní doby neexistují dohody zabývající se problematikou mikroplastů a dále nejsou dohody o určitých typech mikroplastů, např. mikrogranulkách v kosmetických produktech. V některých ohledech se dá považovat ke vztahu k MP za směrodatnou Úmluvu Spojených národů o mořském právu z 10.12.1982. Podstatná jsou hlavně ustanovení čl. 192 a 194 ÚSNMP, kdy dle čl. 192 jsou smluvní státy povinny uchovávat a chránit mořské prostředí a dle čl. 194 odst. 1 učinit všechna nezbytná opatření k předcházení, omezení a kontrole

znečišťovaní mořského prostředí z jakéhokoli zdroje. I když nejsou mikroplasty v ustanovení přímo zmíněny, lze odvodit, že by se měla vztahovat i na mikroplasty.

Konkrétnější právní regulace o nakládání s mikroplasty zahrnují zejména dvě mezinárodní dohody, a to Basilejskou úmluvu o kontrole pohybu nebezpečných odpadů přes hranice států z roku 1989 a Stockholmskou úmluvu o perzistentních polutantech. Obě tyto úmluvy obsahují ustanovení, která by mohla být použita jako základ pro mezinárodní úpravy pro nakládání s MP. Kromě výše zmíněných úmluv, které pojednávají o nakládaní s primárními mikroplasty, existují další mezinárodní dokumenty, které mohou být aplikované na znečištění vyvolané plastovým odpadem, a tím i znečištění způsobené sekundárními MP.

V tomto případě se jedná o Mezinárodní úmluvu o zamezení znečištění moří z lodí z roku 1973. V tomto dokumentu je zmíněn plastový odpad a je stanoven zákaz jeho odstraňování do moře. Jde tedy o právo, které se nepřímo zaměřuje na sekundární MP. Další úmluva, která zakazuje znečišťování moří plastovým odpadem je Úmluva o ochraně před znečišťováním moří v důsledku ukládání odpadů a jiných látek z roku 1972. V příloze I odst. 4 jsou jednoznačně zmíněny perzistentní plasty a další syntetické materiály, které by mohly ovlivňovat navigaci na moři, zasahovat do rybaření nebo jiných zákonem povolených činností na moři [5,6,7].

2.1.2. Evropské právo

V současné době neexistuje v EU právní předpis, který by se zabýval problematikou mikroplastů. Právní předpis, jenž by se měl věnovat tomuto problému se naštěstí připravuje. Tato právní regulace by však pojednávala jen o primárních MP. Právní regulace, která by se věnovala sekundárním MP, není ani ve formě návrhu, a navíc je možné, že nepůjde regulovat nakládání se sekundárními MP pomocí jediného předpisu, a to z důvodu různorodosti sekundárních plastů. Na druhou stranu existuje mnoho právních předpisů na úrovni EU, které nepřímo regulují nebo mohou regulovat uvolňování sekundárních MP. Mnoho z těchto předpisů výslovně popisují MP [8].

2.2. Mikroplasty v potravinách

Mikroplasty se akumulují v oceánech hlavně proto, že jsou příliš malé na to, aby byly filtrovány (odstraněny) při čištění odpadních vod. Plastový odpad se ve vodě nerozpouští, ale rozpadá se na ještě menší částice, které jsou pak pohlcovány planktonními organismy a měkkýši a poté se dostávají výše do potravního řetězce. Experimentální důkazy naznačují, že u mořských organismů mají mikroplasty potenciál k přenosu mezi trofickými úrovněmi.

Rybí moučka se používá při krmení drůbeže a prasat, a proto můžeme mikroplasty nalézt i v potravě suchozemských živočichů. Mikroplasty pravděpodobně pocházejí i z jiných zdrojů než ze samotných potravin např. z pomocných látek při zpracování vody, vzduchu, nebo se mohou uvolňovat ze strojů a zařízení pro zpracování potravin. Vliv dalších procesů, např. vaření a pečení, na obsah MP není dosud znám. O výskytu MP v potravinách je k dispozici jen velice málo informací. Na základě výzkumů bylo odhadnutu, že průměrný člověk zkonzumuje 5 g plastů (ekvivalent kreditní karty) za týden. Pokud vezme v potaz průměrnou délku lidského života (79 let), může člověk spotřebovat 20 kg plastů za celý život. Níže jsou popsány obsahy MP v některých potravinách [9].

Ve studii bylo odebráno 47 vzorků medu z německých supermarketů a od drobných včelařů. Tyto vzorky byly podrobeny analýze na přítomnost MP. Z výsledků z této studie vyplívá, že ve všech 47 vzorcích medu byly nalezeny jak vlákna, tak i úlomky MP. Počet vláken se pohyboval mezi 10 až do 336 vláken/kg a počet úlomků se pohyboval mezi 2 až do 82 fragmentů/kg. Ve vzorcích jednoznačně převažovala vlákna s délkou 40 μm do několika milimetrů. Fragmenty byly obecně menší a dosahovaly velikostí jen asi deseti mikrometrů. Z výsledků lze usoudit, že sběr medu, zpracování a balení medu nepřispívá ve velké míře ke kontaminaci MP [10].

Při zkoumání kontaminace piva bylo zakoupeno 12 značek piva. Všichni výrobci piva používali vodu z jednoho z pěti jezer v oblasti Luarentian Great Lakes. Bohužel všechny vzorky vykazovaly přítomnost antropogenních nečistot. Počet částic v jednotlivých vzorcích se pohyboval mezi 0 až 14,3 částic/l. Průměrný počet částic ve všech vzorcích piva byl 4,05 částic/l. Ve vzorcích byla ze 189 částic většina identifikována jako vlákna a zbývající částice jako fragmenty [11].

V práci, kterou publikoval Kutralam-Muniasamy a kol., byla zkoumána kontaminace mléka. Ke studii se získalo 23 vzorků mléka z 5 zemí a testovaly se na přítomnost mikroplastů. Výsledky ukázaly všudypřítomnost MP v mléce, a to v průměrném množství 6,5 částic na jeden litr mléka. Mikročástice měly různé barvy (modrou, hnědou, červenou) a různé tvary (vlákna a úlomky). Z těchto částic převažovala modrá vlákna o velikosti <0,5 mm.

Vzhledem k tomu, že kuchyňská sůl se nejčastěji vyrábí destilací mořské vody, je obtížné se vyhnout přítomnosti MP v konečném produktu. V případě mořské soli byl obsah MP mezi 0,007 až 0,68 částic na gram [9].

Jak lze předpokládat, největší množství MP obsahuje zažívající trakt mořských organismů. Tyto části se však před konzumací obvykle odstraní. Nicméně pří konzumaci mořských korýšů se tato část neodstraňuje a může být škodlivá. Ve studii, která byla

publikována v roce 2020, se výzkumníci zabývali mořskými plody, které běžně konzumuje tchajwanská společnost. Studie se zaměřovala na Tchaj-wan, protože vody, které tyto ostrovy obklopují, jsou silně znečištěny makroplasty a MP. K analýze byly zakoupeny dvě nezávislé šarže mořský plodů, jmenovitě tvrdé škeble *Meretrix Iusoria*, ústřice *Crassostrea gigas* a chobotnice *Kolego Lolignidae*, které se běžně konzumují. Výsledky studie udávají, že tvrdé škeble obsahovaly průměrně 116,7 MP/kg, ústřice obsahovaly průměrně 107,9 MP/kg a chobotnice *Loligo* obsahovala průměrně 39 MP/kg. Nejběžnějšími typy polymeru byly ve vzorcích polypropylen, poly(ethylen-propylen-dien) a polyethylen tereftalát [12].

2.3. Rizika mikroplastů pro lidské zdraví

Existuje jen omezený počet studií na téma přímých účinků mikroplastů na lidské zdraví. Rizika, která mohou být způsobená MP, závisí na způsobu vstupu (intoxikace) MP do těla, době expozice a na kondici jedince. Většina studií se zabývá hlavně způsobem vstupu MP do těla a jejich hromaděním v těle. Avšak dlouhodobější účinky akumulace mikroplastů v těle nejsou známy. Existují hlavně dva způsoby, kterými mohou lidé přijímat mikroplasty, a to v dechnutím a požitím. Dalším možným způsobem je vstup přes kůži, ale tato možnost není zcela popsána [13].

2.3.1. Absorpce mikroplastů do těla

Inhalace probíhá především prostřednictvím kontaminovaného vzduchu. Zdrojem kontaminace vzduchu mohou být syntetické oděvy, textilie, stavební materiály a spalovaní odpadů a jejich skladovaní. Dris a kol. v roce 2017 stanovili ve venkovním (0,3-1,5 částic na metr krychlový) a vnitřním (0,4-56,5 částic na metr krychlový) prostředí koncentraci MP [14]. Prata v roce 2018 odhadl, že denně člověk vdechuje průměrně mezi 26 až 130 částic [15]. Další výzkum, který provedli Vianello a kol., prokázal, že sedavě žijící muž může denně vdechnout až 272 částic MP [16]. Tyto rozdíly nejsou nijak překvapivé, protože odhady byly závislé na tom, jak často byl povrch čištěn, na metodikách odběru vzorků a dalších faktorech, jako např. sezónní změny, materiál nábytku a celková kvalita ovzduší [13,17].

To, zda vláknité MP vstoupí do našeho dýchacího systému, je závislé na velikosti samotných částic. Je důležité rozlišovat mezi pojmy inhalovatelný a dýchatelný. Částice, které vstoupí do nosu a úst a ukládají se v horních dýchacích cestách, jsou inhalovatelné, zatímco částice, které jsou schopny se dostat a uložit v plicích, se označují za dýchatelné [18].

Příjem MP inhalací může způsobit záněty a chemickou toxicitu. Lidské plíce mají rozsáhlý alveolační povrch s tkáňovou bariérou menší než 1 μm, kterou mohou snadno prostoupit nanočástice. Po vstupu do dýchacího systému jsou MP pohlceny makrofágy a poté

jsou přemístěny do oběhu a lymfatického systému. V roce 2012 Kelly a Fussel a také Valavanidis a kol. (2013) podali zprávu o tom, že MP mohou způsobit chronický zánět v plicích [19,20]. U pracovníků, kteří pracovali v továrnách na textilie, vzniklo zánětlivé onemocnění dýchacích cest. Prata v roce (2018) zase uvádí, že akutní a chronické vystavení MP může být spojeno s okamžitým astmatem podobným bronchiálním reakcím a zánětlivým a granulomatózním změnám ve tkáních [15]. Tyto změny pak mohou posléze vyústit v chronickou pneumonii, a to v závislosti na úrovni expozice a individuálních podmínkách. Zánět plic také může vést k sekundární genotoxicitě v důsledku nadměrné tvorby reaktivních forem kyslíku. Fibróza, a v některých případech i rakovina, se může projevit po dlouhodobém zánětu plic. Toxicitu způsobují hlavně velká a dlouhá vlákna, které nemohou být odstraněna fagocytózou. Tyto částice pak stimulují buňky k uvolňování zánětlivých mediátorů, a to přispívá k fibróze [17,18].

Vstřebávání mikroplastů probíhá hlavně požitím kontaminovaných potravin, jako jsou balené vody, balené potraviny nebo ovoce a zelenina, které se pěstují v kontaminovaných půdách. Jedná se o hlavní zdroj expozice u člověka. Některé studie uvádějí, že průměrné množství, které lidé pozřou prostřednictvím potravin, se pohybuje v rozmezí 39000 až 52000 částic za rok [21]. Tento počet se zvýší v okamžiku, kdy vezmeme v úvahu i částice přítomné v kontaminovaném vzduchu, který vdechujeme. Zjistilo se také, že osoba, která pije jen balenou vodu, přijímá 90000 částic MP, ve srovnání s člověkem, který přijímá 4000 částic MP konzumací vody z vodovodu. Byla provedena studie, kdy bylo zjištěno množství mikroplastů, které byly vstřebány díky konzumaci *Mytilus edulis* a *Crassostrea gigas*. Studie ukázala, že konzument, který jí měkkýše, může spotřebovat 11000 mikroplastů za rok [22]. K nejběžnějším MP v potravinářských výrobcích řadíme polyetylén-tereftalát, polypropylen, polyethylen, polystyren, polyester, polyuretan a polyvinylchlorid. Salim a další v roce 2013 uvedli, že MP se do gastrointestinálního systému dostávají přímo prostřednictvím konzumace kontaminovaných potravin [23]. Bylo popsáno několik mechanismů vstupu MP přes střevní sliznici. Ensign a kol. zmiňují, že MP mohou být pohlceny např. specializovanými M-buňkami střední lymfoidní tkáně, které jsou součástí střevní lymfatické tkáně [24]. Další skupina vědců prokázala, že MP mohou procházet přímo střevní sliznicí, když jsou smíchány s jiným střevním obsahem [25]. Expozice prostřednictvím požití MP by mohla vést k zánětlivé rekci, snížení sekrece střevního hlenu, poškození střevní sliznice, poškození střevní testinální bariérové funkce, což může zapříčinit zvýšení propustnosti střeva a změnu metabolismu [17,26].

Zprávy o možnosti vstupu MP do těla přes pokožku jsou relativně nové. K dnešnímu dni nejsou k dispozici žádné studie o expozici člověka MP prostřednictvím dermálního kontaktu, tak jako studie hodnotící rizika vyplývající z dermální expozice. Díky všudypřítomným MP v prachu, atmosférickém vzduchu, jakož i používání mikroperliček v přípravcích osobní hygieny a neustálému rozkladu mikrovláken z textilií, je relevantní považovat dermální kontakt za možnou cestu vystavení člověka MP. Několik studií se pokusilo odhadnout spotřebu mikrokuliček na obyvatele prostřednictvím výrobků osobní hygieny. Výzkum, který byl proveden ve Spojeném Království, odhalil obsah MP v rozmezí 10-100 g/l v peelingových přípravcích na obličej, z čehož vyplívá spotřeba 40,5-215 mg MP na obyvatele za den [27]. Gouin a kol. odhadli průměrnou spotřebu 2,4 mg MP na obyvatele za den v USA při používání tekutých mýdel [28]. V roce 2018 Revel a kol. zmiňuje ve svém článku, že částice o velikosti 100 nm se nedostanou přes pokožku, avšak nanočástice už ano [29]. Zdravotní rizika vyplívající z kožního kontaktu s MP v čistících prostředcích na ruce, mycích prostředcích na obličej a zubních pastách posuzoval Federal Institute for Risk v Německu. Zjistil, že MP používané ve výrobcích pro osobní hygienu mohou být spojeny s poškozením kůže v důsledku lokálního zánětu a cytotoxicity. Bohužel i plastové výrobky používané při chirurgických zákrocích a protetické náhrady mohou také vyvolat zánětlivou reakci [14,30].

2.3.2. Toxicita pro lidi

O vlivu MP na lidské zdraví je pak důležité rozlišovat mezi fyzikálními a chemickými účinky. Ačkoliv nejsou MP charakterizovány jako chemické látky, a obecně jsou považovány za chemicky inertní, mohou nakonec mít podobné účinky jako chemické látky, což vyplývá ze skutečností uvedených v následujících podkapitolách.

2.3.2.1. Potenciální fyzikální účinky mikroplastů

Vylučovací systém lidského těla eliminuje 90 % MP ze všech požitých částic. Faktory ovlivňující zadržovaní a vylučování jsou velikost, tvar, typ polymeru a aditivní chemikálie v MP přijímaných lidmi. Závažnost nepříznivých účinků závisí na povaze toxické chemické látky, charakteristikách vystavení MP a individuální citlivosti jedinců. Fyzické účinky nahromaděných MP v lidském organismu jsou méně popsány než distribuce a skladování toxických látek v lidském těle. Předběžné výzkumy prokázaly potenciální dopady, včetně zvýšené zánětlivosti, toxicity plastových částic související s jejich velikostí, chemickým přenosem adsorbovaných chemických látek a s narušením střevní mikroflóry [26].

2.3.2.2. Potenciální chemické účinky mikroplastů

MP mohou mít chemické účinky, i když jsou považovány za inertní, a to díky chemickým látkám, které se do plastů přidávají kvůli zlepšení jejich vlastností. Schopnost MP hromadit perzistentní polutanty vyvolává obavy, že se tyto látky mohou dostat do lidského organismu požitím mořských ryb a plodů. K těmto látkám se řadí pesticidy (např. dichlordifenyltrichlorethan (DDT), průmyslové chemické látky (např. polychlorované bifenyly) nebo vedlejší produkty pocházející ze spalovaní, rozkladu nebo z průmyslu (např. dioxiny a furany). Přímé vystavení perzistentním polutantům a jiným chemickým látkám, které MP mohou přenášet, může významně narušit lidský metabolismus, a tím vyvolat závažná onemocnění [26].

2.3.3. Onemocnění způsobené intoxikací mikroplasty

Jak již bylo výše zmíněno, plasty jsou chemicky inertní materiály a dosud nebyl prokázán jejich biologický rozklad v lidském těle. Přestože lidské tělo MP nemetabolizuje, určitý vliv MP na metabolismus byl zdokumentován. MP mohou fungovat jako přenašeči toxických látek, které mohou být metabolizovány a způsobovat poškození organismu.

Epidemiologická šetření uvádějí výskyt intersticiálního plicního onemocnění mezi pracovníky továren na výrobu polymerů v Nizozemsku. Dále se také objevují podobné symptomy u pracovníků v továrnách na nylonové floky v Kanadě a USA. Nedávné důkazy také potvrdily, že požité MP mají určitou souvislost se závažností zánětlivých střevních onemocnění. Tyto studie o zdravotních rizicích jsou však stále v počátcích a toxický účinek mikroplastů na lidský organismus není zcela probádán, jsou neustále prováděny výzkumy s cílem odhalit biologické interakce MP *in-vitro* a *in-vivo* [31].

2.3.3.1. Oxidační stres a cytotoxicita mikroplastů

Oxidační stres je obecně charakterizován generováním reaktivních forem kyslíku. Studie u inhalační expozice prokázaly, že MP mohou způsobit oxidační stres a následný zánět sliznice dýchacích cest nebo její cytotoxicitu. MP mohou způsobovat oxidační stres uvolňováním oxidačních látek, adsorbovaných na jejich povrch, nebo v důsledku zvýšené koncentrace reaktivních forem kyslíku. MP obsahují reaktivní formy kyslíku jako produkt polymerace při zpracování. Tyto reaktivní formy kyslíku mohou být významně zvýšeny následnou interakcí s UV zářením nebo s reaktivními kovy. Zvětrávání MP také vede ke vniku volných radikálů, které způsobují oxidaci v cílových tkáních.

Inkielewicz a kol. v roce 2018 prokázali interakci mezi nanočásticemi polyesteru a povrchem gastrointestinálního epitelu [32]. Studie uvádí, že nanoplasty mohou vyvolat

oxidační destrukci v epitelových buňkách. Ve studiích na zvířatech byl oxidační stres způsobený MP prokázán u myší a dánia pruhovaného (*Brachydanio rerio*). U končetinových a kloubních protéz obsahujících MP bylo pozorováno uvolňování toxinů a volných radikálů způsobující silné zánětlivé reakce. Bylo prokázáno, že tyto MP indukované kyslíkové radikály způsobují hydrolýzu, která vede k degradaci polymeru a porušení samotné protézy. Tento proces má pak za následek odmítnutí náhrady.

Mikroplasty mohou být internalizovány specifickými buňkami, konkrétně makrofágy. Tento proces byl prokázán ve studii na zvířatech *in-vitro* [33]. Jelikož MP nebyly vázány na membránu, mohly by snadno reagovat s intracelulárními organelami, což potenciálně může způsobit poškození. Studie provedená Schrinzim a kol. ukázala, že pokud je člověk vystaven MP v koncentraci 0,05-10 mg na litr, tak se zvýší koncentrace reaktivního kyslíku, který může přispět k cytotoxicitě u lidských cerebrálních a epiteliálních buněk. MP tedy mohou u lidí vést k cytotoxicitě způsobené oxidačním stresem, avšak u několika studií *in-vitro* nebyly zaznamenány cytotoxické účinky, a to ani při vysokých koncentracích (100-200 μg/ml) [17,31,34,35].

2.3.3.2. Změna metabolismu a energetické bilance

MP mohou buď přímo ovlivnit metabolismus změnou metabolických enzymů, nebo nepřímo narušením energetické rovnováhy. Výzkumy u myší a ryb ukázaly, že pokud se MP dostanou s těmito organismy do styku, mohou způsobit zvýšení laktát dehydrogenázy, a anaerobních enzymů. U ryb nanočástice plastů mohou vyvolat metabolismus lipidů a tím potencionálně narušit využívání energetických zásob. Obdobný jev byl pozorován u myší, kdy docházelo ke snížení hladiny ATP a ke snížení metabolismu lipidů v játrech [36].

Energetická homeostáza je ovlivněna rovnováhou mezi dostupnou energií, příjmem, energetickými rezervami a výdaji energie. MP narušují tuto rovnováhu tím, že snižují příjem potravy u krabů, mlžů a mořských červů, snižují dravý výkon, což pravděpodobně vyplívá z neurotoxicity, a snižují trávicí schopnosti prostřednictvím změny aktivit trávicích enzymů s následným snížením příjmu živin. Naopak u myší, mohou MP zvyšovat příjem potravy v důsledku vyšších energetických nároků nebo nižší účinnosti vstřebávání živin [37]. U lidí je situace hůře definovatelná, jelikož MP mohou zvyšovat, tak i snižovat energetický výdej, protože lidé mají vyšší energetické nároky a komplexnější metabolické aktivity než zkoumané organismy, což může mít za následek různé metabolické účinky MP [17,34,35].

2.3.3.3. Narušení imunitní funkce

MP dále mají schopnost vyvolat lokální nebo systémovou imunitní odpověď, která závisí na citlivosti jedince. U citlivějších jedinců může dojít k narušení imunitních funkcí, což může vést až k autoimunitnímu onemocnění nebo imunosupresi. Autoimunitní onemocnění vyvolána MP jsou způsobena oxidačním stresem buněk, uvolňováním imunitních modulátorů a nevhodnou aktivací imunitního systému [38]. To by mohlo vést až k produkci protilátek, které by působily proti vlastním antigenům. Uvažuje se i o souvislostech mezi MP a systémovým *lupus erythematosus* nebo s autoimunitním revmatickým onemocněním.

U mlžů bylo zjištěno, že se projevuje imunosuprese a změny v imunitní reakci. To samé bylo zjištěno i u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), který byl vystaven kationtovým polystyrenovým MP. Kromě sladkovodních ryb a mlžů, byla imunosuprese dokázaná i u myší.

U nižších živočichů zřejmě způsobují MP pokles sekrece mucinu 1, což je hlavní gen pro imunitní systém [39]. Podobně další výzkumy odhalily významné snížení sekrece mucinu po expozici právě polystyrenovými MP [40]. Tyto částice v ovzduší by pravděpodobně mohly narušovat imunitní funkce u lidí, ale tato souvislost zatím nebyla prokázána. Proto je potřeba dalších zkoumání, týkajících se účinků na imunitní systém člověka [17,31,34,35].

2.3.3.4. Translokace do vzdálených tkání

Lze předpokládat, že po vstupu do těla se MP přemísťují do vzdálených tkání prostřednictvím oběhového systému. MP v oběhovém systému pak způsobují zánětlivou reakci, cytotoxicitu krevních buněk, zánět cév a plicní hypertenzi. Testy *in-vitro* ukázaly, že vystavení MP zapříčiní koagulaci červených krvinek a přilnavost na endoteliální stěnu. Částice o velikosti 20-200 μm urychlují hemolýzu a díky tomu zapříčiní produkci histaminu, což pak vede k protizánětlivé reakci [41]. Zvyšování permeability epiteliální membrány v důsledku zánětu, je nejvýznamnějším mechanismem pro translokaci MP [42]. Dále bylo prokázáno u krys a potkanů po inhalaci a vstřebání MP, že dochází k přesunu do vzdálenějších orgánu, jako jsou játra nebo slezina, prostřednictvím oběhového systému.

Alarmující je, že částice o velikosti 240 nm mohou jednoduše procházet lidskou placentou [43]. I když došlo k perfuzi placenty *ex-vivo*, částice polystyrenu neměly vliv na životaschopnost explantátu. Částice byly přenášeny přes placentu difúzí a pomocí vnitrobuněčných a mimobuněčných proteinů. Dále *in-vitro* testy ukázaly, že lidské ledvinové buňky po expozici nanoplasty je internalizovaly bez pročištění, a to i po 90 minutách. Nicméně kumulace nanočástic v ledvinách vedla k výraznému zhoršení funkce ledvin.

Přesouvání MP do vzdálených tkání může vyvolat chronický zánět v místě ukládání, snížení funkcí zasažených orgánů a zvýšení rizika vzniku nádorových onemocnění. Výzkumy také ukázaly, že pokud se MP, jako jsou polystyren a polyethylen, dostanou do kostí, mohou být zodpovědné za ztrátu kostní hmoty v důsledku zvýšené aktivity osteoklastů [17,34,35].

2.3.3.5. Neurotoxické účinky mikroplastů

Bohužel o neurotoxických účincích MP existuje velmi málo informací. Neurotoxicita byla zjištěna po chronické expozici MP, a to pravděpodobně v důsledku aktivace imunitních buněk v mozku a díky oxidačnímu stresu. Studie toxicity *in-vivo* prokázaly, že MP mohou ovlivnit neuronální funkce a chování. Například mozek mořského ďasa evropského (*Lophius piscatorius*) vykazoval pokles acetyl-cholinesterázy. U stejného druhu ryb bylo prokázáno, že expozice MP ovlivňuje výkon v plavání, což se považuje za indikátor neuronálního chování [44]. Expozice lidí mikroplasty pocházející z dopravy bývá spojována s mírným kognitivním poškozením, což u straších osob zvyšuje riziko vzniku Alzheimerovy choroby a jiných forem stařecké demence [17,34].

2.3.3.6. Účinky mikroplastů na reprodukční systém

Reprodukční toxicita se týká škodlivých dopadů na kteroukoli fázi reprodukčního cyklu (např. gametogeneze, plodnost, produkce vajec, rychlost spermií, atd). Účinky na reprodukční systém byly prokázány u sladkovodních nezmarů obecných (*Hydra vulgaris*) a malých korýšů jako hrotnatky velké (*Daphnia magna*) při působení MP o velikosti 70 nm po dobu 21 dní [45]. Za zmínku stojí práce z roku 2016, ve které Sussarellu a kol. sledovali dopady expozice polystyrenových MP u ústřic *Crassostrea gigas* na reprodukci, a posléze zkoumali jejich potomky po dobu 2 měsíců, kdy dosáhli reprodukční zralosti. Kvalita gamet a oocytů, plodnost a rychlost spermií byla snížena po expozici MP. Tyto negativní účinky MP pak zásadně ovlivňovaly kvalitu potomstva a snížily růst jejich larev. Důkazy, které dnes máme jsou sice omezené, avšak podporují názor, že MP vyvolávají širokou škálu toxických účinků na reprodukční systém vodních organismů [46].

2.3.3.7. Karcinogenita mikroplastů

Vystavení plastovým výrobkům bylo u zvířat spojováno s nádory již několik desítek let. Běžné složky a odpadní produkty z výroby plastů jsou karcinogenní, neurotoxické a hormonálně narušující chemikálie, které se do prostředí dostávají vodou, půdou a ovzduším. Z těchto látek jsou asi nejznámější vinylchlorid, dioxiny, benzen, ftaláty a jiná změkčovadla, formaldehyd a bisfenol-A. Avšak přímé důkazy nebyly nalezeny. Obecně převažuje názor že,

záněty indikované MP mohou přecházet na nádorové bujení v důsledku poškození DNA [47], přičemž závažnější maligní nádory jsou spojovány s oxidačním stresem vyvolaným přítomností MP [48]. Dále i aditiva, monomery nebo produkty degradace, které jsou přenášeny MP, mohou poškozovat DNA a to případě, že dojde k translokaci, tedy přemístění části chromozomu mezi nehomologními chromozomy [49].

Kromě pevných nádorů mohou MP a nanoplasty způsobovat zhoubné nádory v tekutém stavu, protože plastové částice (především polyethylen, polyethylentereftalát, polymery styrenu) se mohou hromadit v lidském krevním oběhu [50]. Kromě toho se v literatuře [51] uvadí souvislost se snížením množstvím bílých krvinek v periferní krvi, které způsobuje inhibici tvorby buněk kostní dřeně. Výsledky těchto studií naznačují možné souvislosti s přítomností MP v krevním řečišti a hematotoxicitou [17,35,52]. Tuto hypotézu je však potřeba ověřit v budoucích studiích.

2.3.3.8. Nepřímé negativní účinky mikroplastů

Kromě výše uvedených příkladů částicové toxicity MP, mohou mikročástice plastu představovat zdroj toxických látek, jenž se uvolňují z povrchu MP, nebo patogenních mikroorganismů tvořící biofilm. Chemické přísady, které se to plastů přidávají, se mohou vyluhovat z mikroplastické matrice uvnitř organismu a vystavovat tkáně chemikáliím, jako jsou ftaláty a bisfenol A, které jsou známe jako endokrinní disruptory interferující s endogenními hormony. Například perzistentní organické polutanty (POP), jako je právě bisfenol A, ftaláty, bromované zpomalovače hoření a triklosan, byly nalezeny společně s MP.

Tyto POP se přidávají jako aditiva do plastů během výrobního procesu. Například ftaláty se do plastů přidávají pro jejich změkčení. Tyto látky snižují afinitu mezi molekulárními řetězci v syntetické polymerní matrici. K dalším POP, které byly zjištěny v MP z různého prostředí, se řadí polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), polychlorované bifenyly a těžké kovy (olovo, kadmium, nikl a zinek). Vzhledem k tomu, že se mezi těmito aditivy a MP nevytvoří chemická vazba, jsou tyto látky schopny se snadno dostat do organismu, a to díky koncentračnímu spádu. Takové látky se uvolňují do podkladové tkáně, pokud se dostanou do kontaktu s povrchem těla, přičemž i ve velmi nízkých koncentracích tyto látky mají schopnost interferovat s endogenními hormony [17,34]. Avšak podíl MP na expozici toxickými chemikáliemi je zanedbatelný ve srovnání s denním příjmem z potravy a prachu.

MP mohou být také přenašeči patogenních mikroorganismů do cílových tkání a zároveň je chránit před imunitním systémem. Pokud se MP dostanou do tkání, způsobují

zánětlivé reakce a jejich následné poškození, které vede až k infekci. Dalším důsledkem, který vyplívá z expozice MP a z látek jim přidružených, je ovlivňování rozmanitosti a aktivity střevního mikrobiomu. Podle studie West-Eberharda z roku 2019 má expozice MP za následek rychlý růst oportunních druhů, nárůst protizánětlivých reakcí a endotoxemii [53].

Nicméně nepříznivé účinky chemických látek nebo mikroorganismů absorbovaných na MP jsou velmi závislé na typech a koncentraci přijatých částic, translokaci vektorových částic, rychlosti uvolňování a toxicitě kontaminantů v lidských tkáních. Řada studií uvádí, že perinatální expozice bisfenolem A by mohla být spojena s rozvojem rakoviny mléčné žlázy (prsu), prostaty a jater u hlodavců. Přesný mechanismus však není doposud znám. Zarážející je, že bisfenol A (BPA) byl zjištěn v polykarbonátových láhvích, které se používají při krmení kojenců. MP z těchto láhví by mohly působit jako vektory pro BPA. Pokud dojde k vystavení BPA v ránem věku, může to vést ke zvýšení rizika vzniku rakoviny v pozdějším věku [17,35].

3. Monitorování mikroplastů

Jak už bylo výše řečeno, MP představují vysoké riziko, jak pro životní prostředí, tak i pro lidské zdraví. Z tohoto důvodu se vyvíjejí nové postupy k analýze mikroplastů v enviromentálních a klinických vzorcích. Pro praktické účely jsou MP definovány jako syntetické organické polymery o velikosti od 0,001 do 5 mm. Se zmenšující velikostí se stávají více dostupné pro malé vodní mikroorganismy, a to až pro zooplankton [54].

Monitorování MP v různých abiotických a biotických vzorcích životního prostředí může poskytnout cenné informace pro určení stavu znečištění, ohnisek koncentrace, historických trendů a expozice organismů. Pro takovéto mapovací studie MP jsou zapotřebí spolehlivé a srovnatelné metody odběrů vzorků a analýzy. Nároky na vlastní analýzu jsou mnohdy velmi vysoké, jelikož vyžadují spolehlivé kvalitativní (typ a tvar polymeru) a kvantitativní analytické metody (počet MP). Avšak tím, že je výzkum MP nově vznikajícím oborem, jsou tyto metody pro stanovení těchto částic ve fázi vývoje [54].

Standardní analytický postup pro stanovení MP ve vzorcích životního prostředí spočívá v extrakci (izolaci), identifikaci a kvantifikaci. K identifikaci velkých mikroplastů o velikosti 1-5 mm se osvědčily vizuální mikroskopické metody. Ovšem pro vysoký výskyt MP v prostředí a nepříznivé účinky plastů o velikosti mikro- a nano- je potřeba, aby kvantifikace byla možná na co nejmenší velikost, a to z důvodu účinného posouzení ekologických rizik. Široké rozmezí velikostí MP a různé tvary, barvy a typy polymerů brání vědcům ve vypracování jednotné metodiky klasifikace MP. To pak ztěžuje porovnávání jednotlivých

výsledků. Proto jsou pro spolehlivou identifikaci, kvantifikaci a charakterizaci analytu potřeba pokročilé metody, a to mnohdy kombinace několik takových metod [54,55].

V posledních deseti let bylo publikováno několik přehledů, které se zabývaly částečně nebo zcela problematikou detekce, identifikace a kvalifikace MP. Už v roce 2012 Hidalgo-Ruz a kol. zdůraznili důležitost chemické analýzy pro spolehlivou identifikaci MP [56]. Avšak tehdy byla použita pouze infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Pokrok ve vývoji a uplatnění dalších spektroskopických a termoanalytických metod se projevil v pozdějších letech [55]. Například v článku Primpke a kol. z roku 2020 uvedli kritické hodnocení analytických metod se zaměřením na harmonizovanou a nákladově dostupnou analýzu MP [57].

3.1. Požadavky analytických metod pro monitorování mikroplastů

Kvůli rozmanitosti MP, kterou se vyznačují, se musí při analýze zohlednit sedm klíčových aspektů, kterými jsou široký rozsah velikostí (1 μm až 5 mm u velkých MP), různé typy polymerů (jejich chemické složení), rozdílné tvary (koule, vlákna a nepravidelné tvary), přítomnost různých přísad (změkčovadla, zpomalovače hoření, pigmenty, stabilizátory atd.), odlišné stavy stárnutí (primární a sekundární), povrchový náboj a hybrofobicita [55]. Pokud tedy zohledníme rozmanitost MP a také různou koncentraci v různých prostředích, vyjádřenou hmotností MP a počtem částic v reálných vzorcích, požadujeme po metodě následující:

- Míra znečištění různých enviromentálních vzorků (půda, voda a vzduch) určuje volbu detekční metody. Velikost vzorku se může značně lišit dle míry kontaminace a musí být především reprezentativní.
- Identifikace a kvantifikace MP ve složitých vzorcích může být velmi složitá a najít takovou částici může být *„jako hledat jehlu v kupce sena“*. Proto je potřeba zkoncentrování vzorku a účinné odstranění jak organické, tak i anorganické matrice.
- Pro stanovení MP jsou potřeba citlivé metody. Mnoho metod využívá kvantifikaci založenou na hmotnosti částic. Ovšem se mají charakterizovat specifické vlastnosti MP (stav rozkladu, povrchové vlastnosti, přísady atd.), musí se používat kombinace vícero metod.
- Validace analytických metod, jejich porovnání a standardizace, je pro zajištění výsledků o kontaminaci nezbytná. K tomu je zapotřebí mít vhodné referenční materiály. Tím se myslí takový standart, který by se podobal MP nalezených v

reálných vzorcích, který obsahuje různé typy polymerů o různé velikosti, stavu a tvarů částic.

- Kvůli všudypřítomným MP je potřeba zabránit kontaminaci vzorku během celého analytického procesu.

Obecně platí, že výběr vhodné metody záleží na cílech zkoumání. Pro monitorování MP může být celková hmotnost MP mnohdy dostačující. V tomto případě se dají použít destruktivní metody, které poskytují informace o přítomnosti polymerů bez zohlednění počtu, velikosti a tvaru částic. Avšak je potřeba mít u těchto metod na zřeteli, že několik velkých částic může zastínit mnoho malých. Pokud je potřeba podrobnější informace o MP např. pochopení transportu a vlivu na životní prostředí nebo vlivu na lidské zdraví, je nasnadě použít metody nedestruktivní.

Tyto postupy umožňují chemickou identifikaci a kvantifikaci MP a poskytují informace o počtu částic, jejich velikosti a tvaru. Celkovou analýzu vzorku částic MP s různými vlastnostmi tedy nelze uskutečnit pouze jedinou metodou. Ať již se použije sebe sofistikovanější kombinace spektrálních technik, tak se nejprve musí vzít v úvahu odběr vzorku, jeho přeprava a skladování, tak i následná úprava před vlastní analýzou, to vše, aby bylo možné dosáhnout reprezentativního výsledku [55,58,59].

3.2. Odběr a příprava vzorků

Správný odběr reprezentativních vzorků je rozhodující pro úspěšnou analýzu MP v různých přírodních materiálech. Tento odběr je důležitý jak pro přesné výsledky, které vypovídají o celém přírodním materiálu, tak i pro možné porovnávání výsledků, které byly provedeny v různých časových intervalech.

3.2.1. Odběr vzorků z vodních zdrojů

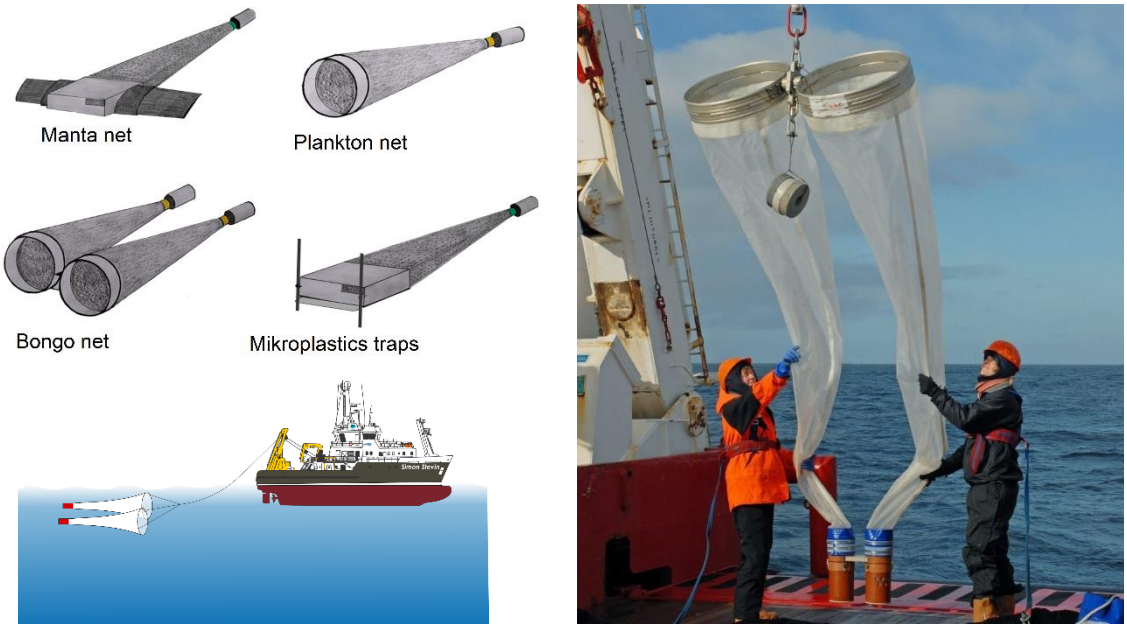
Ve povrchových vodách se zjistila mnohem nižší mikroplastická zátěž než v sedimentech. V důsledku toho vyžaduje analýza vzorků vody větší objemy. Částice MP jsou většinou unášeny na povrchu vod díky nízké hustotě, a proto se většinou odebírá voda na hladině.

Pro odběr vzorků se používají tři hlavní strategie, které zahrnují selektivní odběr vzorků, odběr vzorků se sníženým objemem a hromadný odběr vzorků. Selektivním odběrem vzorků v terénu se rozumí, přímý sběr předmětů z prostředí, které jsou rozeznatelné pouhým okem. Tato metoda se používá nejčastěji na povrchu pobřežních sedimentů a je použitelná pro velké MP (1-5 mm). Hromadné vzorky zahrnují celý objem odebraného vzorku, aniž by

proces odběru zmenšil jeho objem. Poslední strategii představují vzorky se sníženým objemem. Tento postup se vztahuje na vzorky, kde se při odběru záměrně snižuje objem [60,61].

K odběru povrchové vody se používají různé typy vlečných sítí, jako jsou manta, neuston nebo planktonové a bongo sítě (viz. Obr. 1). Vlečné sítě bývají nejčastěji umístěny za lodí, ponořeny do hloubky 0-0,5 m a taženy nízkou rychlostí po stanovenou dobu nebo vzdálenost. V některých případech mohou bát zavěšeny i vertikálně, kdy se mapuji jednotlivé úrovně toku.

Objem vody, která projde přes síť, se zjistí buď průtokoměrem, který je na síť připevněn nebo výpočtem založeným na vzdálenosti ujeté lodí při konstantní rychlosti. Protože se však hloubka ponoření sítě neustále mění vlnami, pohybem větru a samotné lodi, je obtížné určit přesný objem filtrované vody. Lze tedy konstatovat, že výhodou vlečných sítí je možnost filtrovat velké množství vody pro sběr plovoucích MP. Nevýhodou je však jedna velikost ok sítě. To může znamenat, že částice, které jsou menší, než oka sítě projdou skrz a nebudou tak podrobeny analýze. Ovšem i malá velikost ok je problém, a to z důvodu možnosti ucpání (např. planktonem). Nejvhodnější a obecně přijímaná velikost ok pro odběr vzorků MP je kolem 300 μm [60,61,62,63].



Obrázek 1. Typy vlečných sítí pro odběr vzorků povrchových vod (vlevo nahoře) a samotný sběr planktonu s bongo sítě (vpravo).

Dalším v praxi používaným způsobem odběru vzorků povrchové vody je použití čerpadla nebo drapáků. Odběr čerpadlem spočívá v ručním čerpání nebo čerpání s použitím

motoru přes řadový filtr. Metoda odběru vzorků pomocí drapáku zahrnuje nádobu k odběru vody a filtrování vody na místě. Voda odebírána pomocí čerpadel nebo velkoobjemových vzorkovačů, je získána z různých hloubek a v rozdílném množství. Vzhledem k velkému rozptýlení MP ve vodě nemusí být tyto metody odběru vzorků reprezentativní. Proto se doporučuje odběr několikrát opakovat. Čerpadla a velkoobjemové vzorkovače na druhou stranu lze použít na odběr velkých objemů, což může být výhodné v oblastech, kde se předpokládá malý výskyt MP. Objemy odebraných vzorků se mohou lišit, od 5 ml do 500 ml. Kromě toho použití této metody umožní zachycení menších MP než při použití vlečných sítí [50,62].

Různé metody odběru vzorků mohou poskytnout odlišné výsledky o množství MP ve vodě. Ovšem je zajímavé, že studie, která porovnávala tři metody vzorkování, neodhalila žádný významný rozdíl v typech polymerů. Výběr metody vzorkování by měl být uskutečněn na základě podmínek odběru vzorků a účelu, pro který je vzorek analyzován. Hlavním pravidlem, které platí napříč všemi metodami vzorkování je, že *„čím větší objem vody, tím lepší reprezentativnost experimentu“*. Bohužel neexistuje v současné době jednotný postup, a proto se doporučuje použít více metod pro odběr vzorku současně [62].

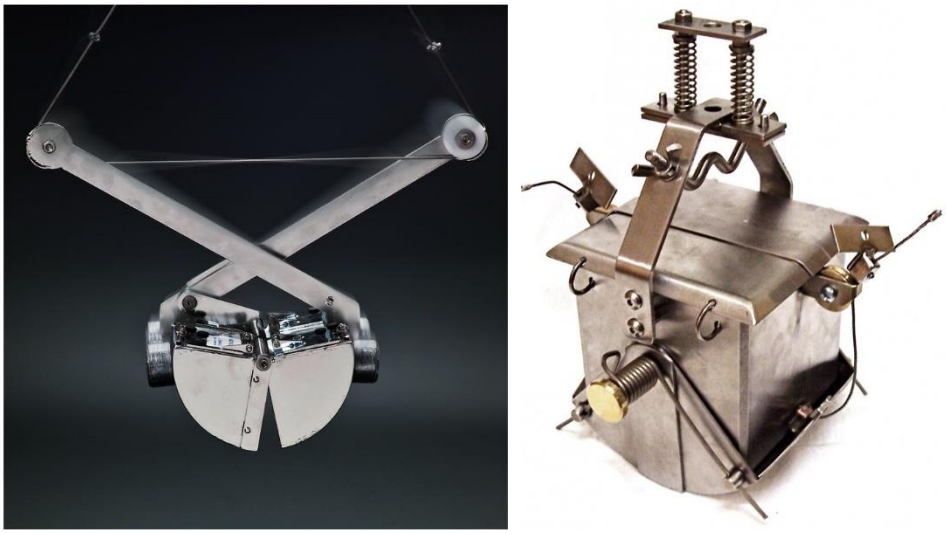
3.2.2. Vzorkování sedimentů

Nerovnoměrné rozložení MP v sedimentech je do značné míry ovlivněné jejich vlastnostmi a faktory prostředí, jako je vítr a proud vody. Techniky odběru vzorků MP v sedimentech se neliší od postupů, které se používají pro odběr vzorků v mořském a sladkovodním prostředí. Jednotlivé postupy se často liší v objemu odebraného sedimentu, ploše, velikosti a v hloubce odběru. Jak již bylo řečeno, strategie odběru vzorků závisí na cíli, kterého chceme analýzou dosáhnout. V mořském prostředí vzorky rozlišujeme z hlediska umístění na přílivové, mezipřílivové a supralitorální. Místa, kde se odebírají vzorky, se rozlišují, protože některé oblasti mohou obsahovat vyšší koncentraci MP. Například odběr vzorků na linii přílivu a odlivu, což je oblast s vysokou akumulací MP, může způsobovat nadhodnocené výsledky. Kromě toho se často odebírají vzorky naplavených usazenin.

Na plážích se vzorky odebírají pomocí nerezových lopatek nebo špachtlí. Plastové nástroje by se neměly používat z důvodu možné kontaminace vzorku. Další postup odběru vzorku, který se nedoporučuje, je vizuální odběr, kdy může dojít k přehlédnutí MP, což zapříčiní zkreslené výsledky analýzy. Vzorky se poté převáží do laboratoře ve skleněných láhvích [63,64].

Pro odběr vzorků z větších hloubek je zapotřebí plavidlo a specializované zařízení, které se spouští na mořské dno. Takovými zařízeními jsou různé druhy drapáků a vývrtů. Například k analýze bentických sedimentů se využily Ekmanovy a Van Veenovy drapáky (viz. Obr. 2). Při použití těchto drapáků může docházet poškození vzorku. Pro neporušené sedimenty jsou zapotřebí vrtná jádra (poskytující informace o různých vrstvách sedimentu). Hloubkový vzorkovač může poskytnout pohled na měnící se množství MP v čase [60,63].

Pro co nejvíce vypovídající odhad o koncentraci MP v sedimentu se vyžaduje přesné vymezení hloubky odběru, protože v horních 1-5 cm jsou vyšší koncentrace než v dolních 10 cm. Dále je důležité určit počet odběrů z dané oblasti. Doporučuje se odebírat 11 vzorků, což umožní odhad s 90 % spolehlivostí. Hmotnost nebo objem vzorků se mezi studiemi obvykle liší, což může ovlivnit reprezentativnost analýzy. Národní úřad pro oceán a atmosféru (NOAA) doporučuje použít metodu, kdy se odebere 400 g na jedno opakování. Toto množství se následně vysuší a zváží pro úpravu výsledků [64].



Obrázek 2. Drapák Van Veen (vlevo) a Ekmanův drapák (vpravo).

3.2.3. Odběr živých organismů pro analýzu

Rozmanitost studovaných organismů a oblastí, ve kterých žijí, klade vysoké nároky na odběr takovýchto vzorků. Metody odběru se odvíjí od druhu organismu, místa a cílu, kterého chce výzkum dosáhnout. Bentické druhy bezobratlých, jako je humr norský (*Nephrops norvegicus*), lze sbírat pomocí drapáků, pastí nebo vlečných sítí pro lov při dně. Pro odběr planktonních a neplanktonních bezobratlých se využívá manta nebo bongo sítě. Pro odchyt ryb jsou obvykle použity povrchové, střední a bentické vlečné sítě, a to v závislosti na místě výskytu. V říčních systémech lze využít tenatové sítě. Další možností je přímý sběr podél pobřeží. Tento postup se běžně využívá pro získání vzorků mlžů, korýšů a kroužkovců.

Poslední metodou je získání vzorků na komerčních rybích trzích, avšak u této metody není znám způsob odchycení [63,65].

Při odběru jakéhokoliv vzorku je nejdůležitější vyhnout se kontaminaci nebo zkreslení výsledků analýzy. Ke zkreslení může docházet z důvodu ztráty MP před konzervací živočichů. Doba vyprazdňování střev je různá a pohybuje se od 30 min až do 150 h. Někteří živočichové proto mohou vyvrhnout MP ještě před samotnou analýzou. V takových případech se musí živočišné vzorky ihned konzervovat, kdy se zároveň minimalizuje stres při manipulaci a možné fyzické poškození odebíraných organismů. Tím se snižuje riziko regurgitace MP (vyvrhnutí potravy s požitými MP).

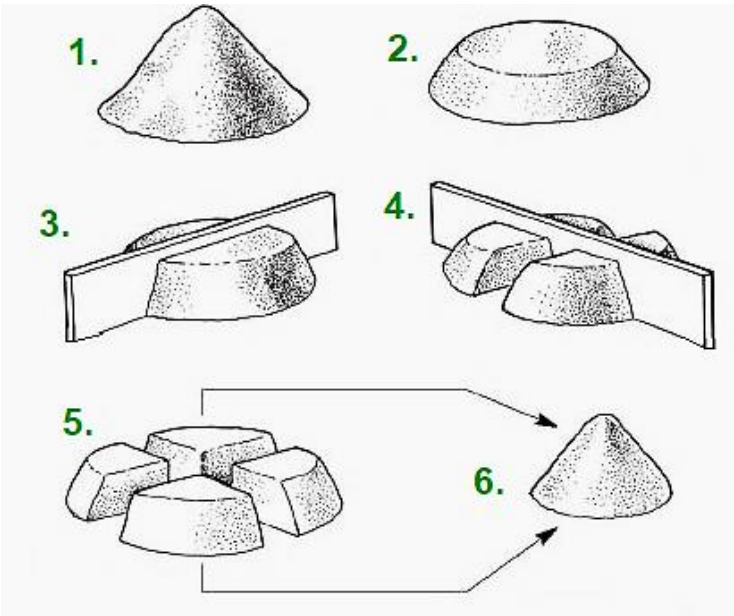
Další možností, jak mohou být výsledky ovlivněné, představuje hromadění MP během odběru vzorků. Laboratorní výsledky ukázaly, že nanoplasty a MP mohou ulpívat na vnějším povrchu organismu. Rozlišit takové interakce je v přírodě náročné, protože nelze s jistotou určit, zda došlo k akumulaci přirozeně nebo jako vedlejší efekt při sběru vzorků. Při samotném skladování vzorků se dbá na výhody a nevýhody technik, které se k tomuto uchování využívají. Například využití fixačních činidel, kterými jsou nejčastěji 4 % formaldehyd a 70 % ethanol, může ovlivnit strukturu, chemické složení, barvu nebo analytické vlastnosti případných MP ve vzorku. Mezi další alternativní metody skladování se řadí vysoušení a zmrazení vzorků [65].

3.2.4. Vzorkování půdy

Jak již bylo nedávno přezkoumáno [66], běžné strategie pro odběr vzorků z půdy v souladu s normou ISO18400-120 jsou použitelné pro analýzu MP a zahrnují odběr vzorků z míst podezřelých z velké koncentrace MP, systematický odběr vzorků z mřížky, vzorkování transektu, stratifikovaný odběr vzorků, či náhodný výběr vzorků. Oblasti a postupy odběru vzorku se vždy zdokumentují pomocí terénních poznámek a fotografiemi. Hloubka, ze které se daný vzorek získá, by také měla být zaznamenána, a měla by odrážet půdní profil a způsob hospodaření. Například Německé federální nařízení o ochraně půdy a kontaminovaných lokalitách stanovuje pro zemědělsky obdělávané půdy minimální hloubku odběru 30 cm. Přesto se většina studií, zabývajících se MP, omezovala hloubku odběru vzorků na nejsvrchnějších 5 cm. Pokyny pro odběr vzorků amerického Ministerstva životního prostředí a americké Agentury pro ochranu životního prostředí doporučují odebírat kontrolní vzorky, které nejsou vystaveny kontaminantem vzbuzujícím obavy. To však je velmi náročné v případě MP, které jsou v půdě všudypřítomné. Výhodou by na druhou stranu mohla být

skutečnost, že díky lze kontrolovat kontaminaci vnesenou do vzorku během samotného odběru [66,67].

Počet vzorků na lokalitu závisí na velikosti zkoumané oblasti. Aby se pokrylo variabilní rozložení MP na daném poli o rozloze 0,05 – 1 ha, doporučuje německá legislativa rozdělit pole na nejméně tři dílčí plochy. Pro každou dílčí plochu se má odebrat jeden směsný vzorek sestávající z 15-50 dílčích vzorků [67]. Výsledné množství vzorku pro každý odběr by mělo být definováno a zaznamenáno. Vzhledem k heterogenní povaze mikroplastické distribuce bývají často větší vzorky odebrané v terénu reprezentativnější než ty malá množství. Celkové množství se následně homogenizuje a kvartací (viz. Obr. 3.) redukuje na menší laboratorní vzorek. Běžně se množství vzorku půdy pohybuje v rozmezí od 50 g do 4 kg. Do dnešní doby není k dispozici dostatek statistických údajů, aby se mohla doporučit optimální velikost odebíraného vzorku [66].



Obrázek 3. Princip kvartace sypkých materiálů.

3.2.5. Izolace mikroplastů z enviromentálních vzorků

Před samotnou analýzou vzorků vody, sedimentů a biologických materiálů je nutností odstranit od plastových částic anorganické a organické příměsi. Předúprava se provádí pro zlepšení správnosti výsledné analýzy. Odebrané vzorky se podrobí buď všem nebo jen některým procesům, které zahrnují prosévání, separace pomocí rozdílné hustoty, filtrace atd. Ačkoliv v současné době neexistuje definovaný postup, kterým se lze řídit, hlavní základ zahrnuje pokyny vypracované NOAA [68].

3.2.5.1. Prosévání vzorků půdy

Prosévání vzorků se řadí na první místo v postupu izolace MP. Většina studií použila pro hrubé oddělení MP od matrice jedno nebo více různých sít (viz. Obr. 4.). Dokonce existují postupy, kde se jenom používá prosévání. Například vzorky z přehrady Tři soutěsky v Číně byly připraveny prosívání přes síto o 1,6 mm okem. Poté se vybraly podezřelé částice, které se vložily na Petriho misku a zalita kapalinou. Plovoucí zbytky na povrchu kapaliny se následně použijí k identifikaci. Frakcionace vzorku, kdy se používá mokré prosévání v kaskádě sít o průměru ok 300, 500 a 1000 μm, se ukázala rovněž jako vhodný a jednoduchý nástroj v přípravě vzorků podezřelých na obsah MP. Jelikož se MP mohou zachytávat v hranách síta, doporučuje se používat síta s pájenými spoji. Při mokrém prosévání je důležité jemně oplachovat síta, aby se zabránilo rozlití vody s přítomnými částicemi. Avšak toto oplachování musí být důkladné kvůli správnému rozdělení MP od anorganických příměsí [68,69].

Obrázek 4. Sada testovacích sít.

3.2.5.2. Trávení

Trávení lze považovat za nejčastěji používanou metodu k odstranění neplastických organických materiálů, které by jinak mohly negativně ovlivnit izolaci a identifikaci MP. V závislosti na typu potravinové matrice se může použít jednostupňový nebo vícestupňový trávicí proces. Jednostupňový proces se provádí za použití jednoho oxidačního činidla, zatímco při vícestupňovém procesu se využívá několik činidel. Před samotným zahájením by se nemělo zapomínat na reaktivitu použitého činidla k povrchu plastů. K tomuto účelu se využívá skenovací elektronová mikroskopie (SEM).

Obecně se chemické trávení označuje jako konvenční oxidační ošetření, které se provádí tzv. Fentonovou metodou pomocí peroxidu vodíku ve směsi s katalyzátorem pro zvýšení rychlosti chemické oxidace, kterým je dvojmocné železo. Použití této metody je běžnou praxí ve studiích zabývajících se MP, jelikož bylo zjištěno, že MP jsou odolné vůči této oxidační metodě. Kromě výše zmíněného peroxidu vodíku v přítomnosti dvoumocného

železe, jenž lze použít pro odstranění rostlinného materiálu, je možné použít i hydroxid draselný pro odstranění živočišné tkáně [70].

Výzkumy ukazují, že peroxid vodíku má nejlepší degradační vlastnosti pro organické látky bez vlivu na plastové částice. Tato sloučenina se velmi často využívá pro degradaci organických látek ze vzorků ryb, krabů, škeblí, mléka, soli, nealkoholických nápojů, piva a bílého vína. Nicméně některé studie uvádějí možnou změnu nebo potenciální degradaci některých materiálů ve vzorcích zejména nylonu a polyethylenu s nízkou hustotou [71].

Degradaci je také možné provést pomocí jedné nebo směsí několika kyselin (kyselinou dusičnou, chlorovodíkovou nebo chloristou). Tento přístup není nikterak časově náročný, ale může poškodit některé polymery. Tento postup byl využit například v analýze sedimentů jezer Bolsena a Chiusi v Itálii, kdy se použila kyselina chlorovodíková, která působila 48 h při pokojové teplotě a poté byly vzorky dodatečně vystaveny vyšší teplotám, aby se rozložil organický materiál [68,72,73]. Pro urychlení procesu degradace organických látek napomáhá zahřívání vzorku. Používají se různé podmínky, například rozpětí teplot 40–65 °C po dobu 15 minut až 72 hodin. Toto ovlivňování trávení by však mělo být prováděno velmi opatrně, a to z důvodu možného poškození MP.

Jako další možnost se nabízí enzymatické trávení (degradace). V tomto procesu se využívají katalyzátory biologického původu (enzymy), jmenovitě amyláza, proteáza, lipáza, chitináza a celulóza. Jelikož tyto enzymy působí selektivně (např. proteáza štěpí pouze bílkoviny), je zapotřebí použít kombinaci několika enzymů. Přestože je enzymatické trávení časově velmi náročné a vyžaduje nepřetržitou kontrolu teploty, aby se zajistila optimální katalytická účinnost, tak se nejčastěji tento způsob úpravy vzorků upřednostňuje pro velmi složité matrice vzorků, kterými jsou potraviny [68,74].

3.2.5.3. Oddělení mikroplastů na základě rozdílné hustoty

Další důležitou metodou na oddělení mikroplastů od sedimentů nebo jiných anorganických látek, které nebyly odstraněny chemickým nebo enzymatickým trávením, je separace na základně rozdílné hustoty. Tento postup vychází z předpokladu, že polymery mají nižší hustotu než ostatní příměsi. Separace se provádí pomocí roztoku. Separační medium je zvoleno na základě hustoty, kdy hustota kapaliny musí být větší než hustota MP, ale zároveň musí být menší než hustota částic, které se snažíme odstranit ze vzorku. Jednotlivé polymery mají charakteristickou hustotu v rozmezí od 0,90 až po 1,7 g cm^{-3} (polypropylen 0,90-0,91 g cm^{-3}, polyethylen 0,917-0,965 g cm^{-3}, polystyren 1,04-1,1 g cm^{-3}, atd.).

V nasyceném solném roztoku je vzorek opatrně promíchán, a po určité době se oddělí supernatant obsahující MP a zbývající roztok se dále filtruje [72,75].

Z výše uvedených informací vyplývá, že výběr roztoku závisí na polymeru, který chceme extrahovat. K tomu to procesu se používají chlorid sodný, chlorid vápenatý, chlorid zinečnatý, bromid zinečnatý, jodid sodný, polytungstát sodný nebo dihydrát tungstátu sodného (viz. Tab. 1).

Tabulka 1. Hustota roztoků solí a jejich výhody a nevýhody [75].

Sůl	**Hustota (g cm^{-3})**	**Výhody**	**Nevýhody**
NaCl	1,2	Cenově dostupné, snadná manipulace, separace polystyrenu, polyamidu, polypropylenu, polyvinylchloridu, polyethylenu.	Nedostatečná separace polyvinylchloridu a polyethylentereftalátu, vícenásobná separace, časově náročné.
NaI	1,8	Snadná manipulace, vyšší hustota než NaCl, separace polystyrenu, polyamidu, polyvinylchloridu.	Nákladné, způsobuje zčernání celulózových filtrů, obtížné vizuální třídění.
$ZnCl_2$	1,7	Separace polyamidu, polystyrenu, polyvinylchloridu, polyethylentereftalátu, polyethylenu, polypropylenu, levné.	Nebezpečná a korozivní látka.
$ZnBr_2$	1,71	Snadná manipulace, cenově dostupný, separace polypropylenu, polyethylenu s nízkou hustotou, polyethylenu, polyethylenu s vysokou hustotou, polystyrenu, polyvinylchloridu, polyethylentereftalátu a polyamidu.	Nebezpečná látka pro životní prostředí, drahá.
Metatungstát lithný	1,62	Snadná manipulace, vyšší hustota než NaCl, separace polyvinylchloridu, polyetylentereftalátu.	Velmi nákladný, neznámý vliv na polymery.
Canola olej		Separace polystyrenu, polyvinylchloridu, polyesterových vláken a polyamidu, cenově dostupný.	Je zapotřebí dodatečné čistění pro další analýzu.
Ethanol	0,8	Cenově dostupný, nevhodnější látka pro separaci MP od rostlinných látek, separace polypropylenu, polyethylenu, polystyrenu, polyamidu.	Nelze oddělit sedimenty od MP.
Olivový olej		Cenově dostupný, separace polystyrenu, polyvinylchloridu, polyethylentereftalátu, polykarbonátu, polyuretanu.	Polytetrafluoretylen nebyl separován.

Díky své ceně, snadné dostupnosti a nízkým negativním účinkům na životní prostředí se běžně používá chlorid sodný. Tímto roztokem lze provést separaci polyethylenu, některých

směsí polypropylenu a pěnového polystyrenu, které jsou obvykle nejběžnějšími typy MP ve vodním prostředí. Problém ovšem nastává při oddělení částic, které mají vyšší hustotu, jako je polyvinylchlorid a polyethylen tereftalát. Pro separaci MP o vyšší hustotě se používají roztoky chloridu zinečnatého, jodidu sodného, polytungtátu sodného a chloridu zinečnatého. Výhody a nevýhody jednotlivých roztoků jsou zhodnoceny v následující Tab. 1.

Hlavním omezením separace na základě hustoty je časová náročnost. Tuto nevýhodu zle však odstranit pomocí odstředění nebo použitím ultrazvuku. V některých vědeckých pracích se objevuje tzv. dvoustupňová separace, při které dochází k fluidizaci v roztoku o nižší hustotě a poté k flotaci MP v roztoku s vyšší hustotou. Velká výhoda této metody spočívá ve zvýšení účinnosti separace, ale na druhou stranu se výrazně zvýší časová náročnost. Zas zmínku stojí uvést příklad, kdy se rostlinný olej využil jako separační médium, kdy se uplatňují hydrofobní interakce. Lipofilní MP se extrahuj od matrice přitažlivou interakcí k olejové vrstvě a ostatní částice jsou segregovány v separační děličce [68,72,74,75].

3.2.5.4. Filtrace

Vzorky, které obsahují nízké množství potravinové matrice, mohou být izolovány pomocí filtrace. Výhoda této metody spočívá v její jednoduchosti, přestože se tento proces filtrace považuje za pomalý. Tuto nevýhodu lze však eliminovat za použití vakuového čerpadla. Při tomto procesu se částice MP se zadržují na filtrační přepážce a poté se převedou na Petriho misku k další analýze. Jako filtrační přepážky se zde využívají membrány ze skelných vláken, membrány z acetátu celulózy, dusičnanů celulózy nebo z oxidu hlinitého. Použití membrán ze syntetických vláken se bohužel nedoporučuje, a to z důvodu možné kontaminace a zkreslení výsledků analýzy. Ovšem i membrány ze skelných vláken uvolňují fragmenty, a tudíž mohou být odpovědné za kontaminaci vzorku.

Pro izolaci MP se především uplatňují membrány z dusičnanu celulózy, acetátu celulózy a oxidu hlinitého, protože jsou méně náchylné k fragmentaci. Použití membránových filtrů s různou velikostí pórů umožňuje kvalifikaci MP na základě velikosti. Nicméně výběr velikosti pórů by měl zohledňovat analytickou metodu, která se pro analýzu vzorku využívá. Například během filtrace MP z potravin byly použity filtry s velikostí pórů mezi 0,2-149 μm [68,72,74,75].

3.2.6. Analytické metody používané pro identifikaci a kvantifikaci mikroplastů

Po oddělení MP z matrice vzorku je zapotřebí vybrat vhodnou metodu k jejich identifikaci a kvantifikaci. Do dnešní doby existuje několik metod pro monitorování mikroplastického znečištění v životním prostředí. Každá z těchto jednotlivých metod má své

výhody a nevýhody. S ohledem na limity jednotlivých metod se využívá spíše jejich kombinace, aby se dosáhlo co nejpřesnějších výsledků analýzy.

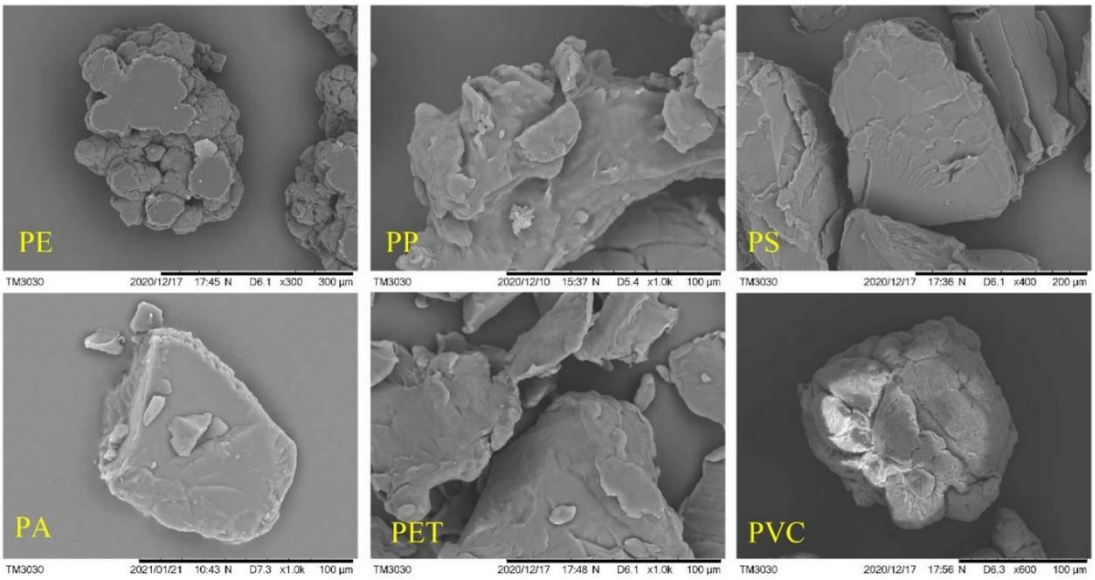
3.2.6.1. Mikroskopické metody

Vizuální analýza představuje jednu z nejvíce rozšířených přístupů pro fyzikální charakterizaci MP. Principem mikroskopických analýz je pozorování vzorků při velmi velkém zvětšení, tak aby se dala určit velikost MP Tudíž se charakterizace MP uskutečňuje na základě morfologických a fyzikálních vlastnostech. Barevné plasty, do kterých se záměrně ~~je~~ přidává barvivo, zle bez velkých obtíží rozlišit optickým mikroskopem. Ovšem asi 70 % vzorků podrobených analýze je průhledných, což ztěžuje jejich rozlišení od organických a anorganických částí, které nejsou zcela odstraněny postupy popsanými v předchozích kapitolách. Z předchozích studií vyplývá že míra chybovosti v identifikaci MP se pohybuje kolem 20 %. U průhledných částic tato chybovost může dosáhnout až 70 %.

Kromě toho vizuální metody neposkytují informace o chemické struktuře MP (typ polymeru) a vyžadují jistou dávku zkušeností analytika. Výhody této metody spočívají především v její jednoduchosti, nízkých provozních nákladech a vysoké míře bezpečnosti (bez nutnosti použití zdravotně rizikových chemikálií). Díky svým nevýhodám není světelná mikroskopie vhodná pro nezávislé stanovení MP a nejčastěji se uplatňuje pouze jako pomocná metoda. Dále je možné tento postup kombinovat s elektronovou mikroskopií, aby se snížila chybovost [76,77,78].

3.2.6.1.1. Skenovací elektronová mikroskopie

Elektronová neboli skenovací elektronová mikroskopie (SEM) může poskytnout detailnější představu o velikosti a struktuře MP než klasická světelná mikroskopie (viz. Obr 5.). Vizualizace povrchu MP není bohužel možná z důvodu neschopnosti plastů vést elektřinu. Tuto schopnost lze podpořit povrchovou úpravou, kdy se na MP nanese vodivá vrstva kovu, kterým bývá palladium, platina, wolfram a zlato. SEM může být využita pro identifikaci MP o velikosti až 1 nm. Díky tomuto vysokému rozlišení lze zlepšit a zpřesnit rozlišení MP od organických částic, ovšem se musí brát v úvahu složitost matrice vzorku. Vzorky, které jsou podrobeny SEM, se nejčastěji ukotví na hliníkové nebo uhlíkové terčíky.

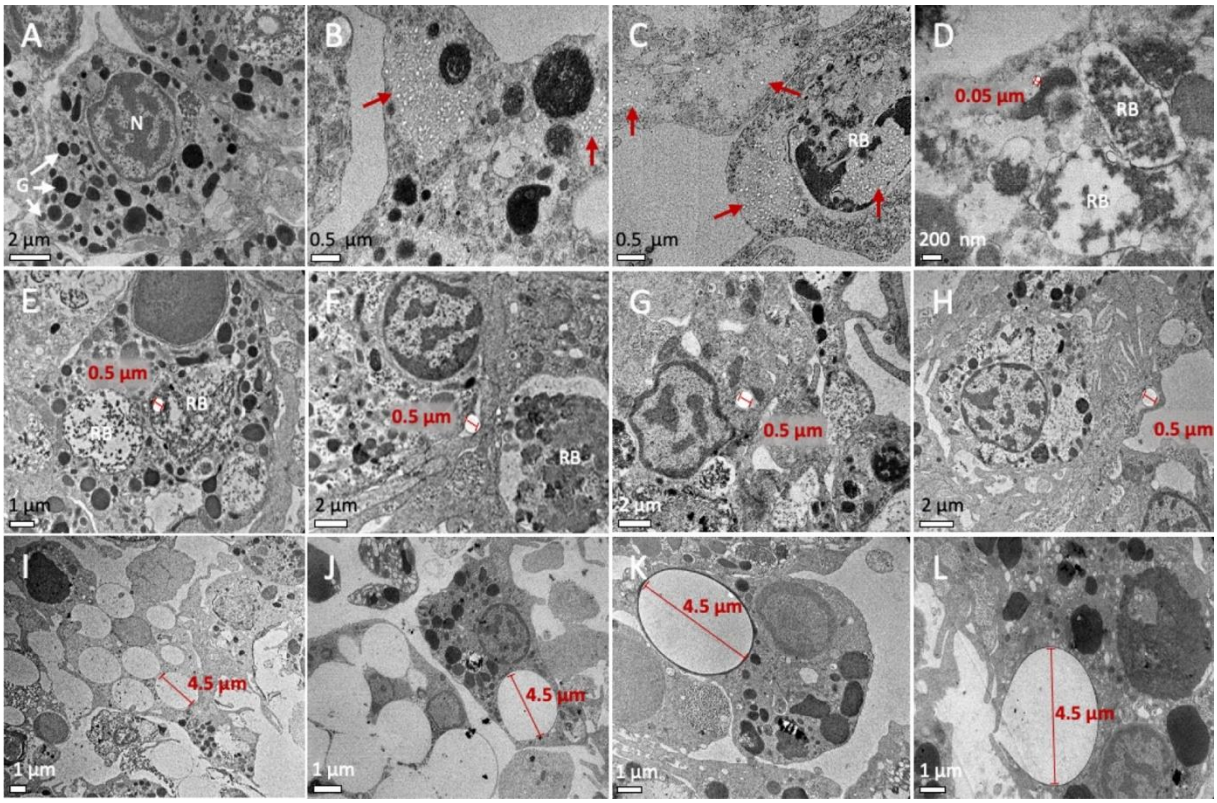


Obrázek 5. SEM snímky ukazující tvary a povrchovou morfologii různých typů MP [81].

Kontrast v SEM vychází z rozptylu elektronového paprsku procházejícího vzorkem. U SEM se využívají detektory, které získávají specifické energetické signály. Nízkoenergetické sekundární elektrony slouží k povrchové analýze materiálu, zatímco vysokoenergetické zpětně rozptýlené elektrony lze využít pro zviditelnění kontrastu na základě rozdílů v atomovém čísle přítomných prvků. Obrázky získané detektorem BSE se získají pouze v případě, kdy rozdíl mezi jednotlivými atomovými čísly prvků bude alespoň 0,1. Metoda také poskytuje informace o stáří a původu daných vzorků. Na rozdíl od Transmisní elektronové mikroskopie (TEM) lze v SEM analyzovat větší vzorky, protože není potřeba jejích rozřezaní [76,79,80].

3.2.6.1.2. Transmisní elektronová mikroskopie

Jak už bylo výše zmíněno, další metodou využívanou pro analyzování MP je transmisní elektronová mikroskopie. U této metody lze analyzovat struktury o velikosti 0,5 nm (viz. Obr. 6). Rozlišení v TEM analýze silně závisí na tloušťce vzorku a na zrychlovacím napětí elektronového paprsku. Pro pozorování TEM v jasném poli se rozptýlené elektrony, absorbují clonou objektivu, zatímco nedefraktovaná část paprsku prochází clonou a vytváří snímek povrchu vzorku. U nekrystalického vzorku, při zobrazení TEM v jasném poli, vzniká kontrast z důvodu rozdílů v tloušťce vzorku a z rozdílů hustoty. Ve výsledném obrazu se tedy oblasti s vyšší tloušťkou a hustotou jeví tmavší.



Obrázek 6. TEM snímky intracelulární lokalizace NP a MP v mušlích hemocytech [82].

V praxi se používá i metoda TEM v tmavém poli, která využívá detekci difraktovaného paprsku vzorkem. Při tomto způsobu je vzorek světlý a okolní prostředí tmavé. Vizuální identifikace MP pomocí TEM se může lišit z důvodu rozdílných závěrů různých pozorovatelů. Tyto chyby mohou být odstraněny ověřením výsledků od více pozorovatelů [76,77,79]. Z tohoto důvodu může být interpretace výsledků dosti subjektivní.

3.2.6.1.3. Mikroskopie v polarizovaném světle

Princip této metody se zakládá na rozdílných vlastnostech materiálů polarizovat přirozené světlo. Vnímatelné světlo totiž kmitá ve více rovinách. V této metodě polarizátor umožňuje průchod světla kmitajícího v jedné rovině. V takovémto mikroskopu jsou umístěny dva disky vyrobené z polarizačního plastu. Umístění těchto dvou kotoučů neumožňuje průchod světla, jelikož jsou roviny na sebe kolmé, a proto lze přes okulár vidět jen tmavé pole. Pokud mezi oba polarizátory vložíme opticky aktivní předmět, který se tímto osvětlí (zviditelní) na tmavém poli, stane se tím pádem identifikovatelný. Právě krystalová struktura v plastu může umožnit průchod světla. Z tohoto důvodu musí být vzorky plastu tenké, aby umožnily průchod světla v dostatečné míře. Tuto metodu proto nelze využít pro neprůhledné MP [76,83,84,85].

3.2.6.2. Spektroskopické metody

Spektroskopické metody využívají přechody mezi energetickými hladinami látky indukované elektromagnetickým zářením s různou vlnovou délkou (λ) jemuž jsou vystavené. Základní fyzikální vlastností všech látek je schopnost pohlcovat, sekundárně emitovat, rozptylovat, či odrážet záření, jenž je pro každou látku unikátní. Tudíž ze získaných spekter, zobrazující závislost intenzity záření na vlnové délce, lze nedestruktivně identifikovat a kvantifikovat mikroplasty.

3.2.6.2.1. Energeticky disperzní rentgenová spektroskopie

Další možností pro analýzu vzorku může představovat metoda využívající energetickou disperzní rentgenovou spektroskopii (EDX). Metoda se principiálně neliší od SEM, jen se zde využívá jiný detektor, a to EDX, který má schopnost určit zastoupení přítomných prvků (tzv. prvková analýza). Princip EDX spektroskopie spočívá ve sledování interakcí mezi vzorkem a elektromagnetickým zářením. Každý prvek má jedinečnou atomovou strukturu, která charakteristicky emituje rentgenové záření. Díky této schopnosti lze jednotlivé prvky odlišit, a tím určit strukturu vzorku.

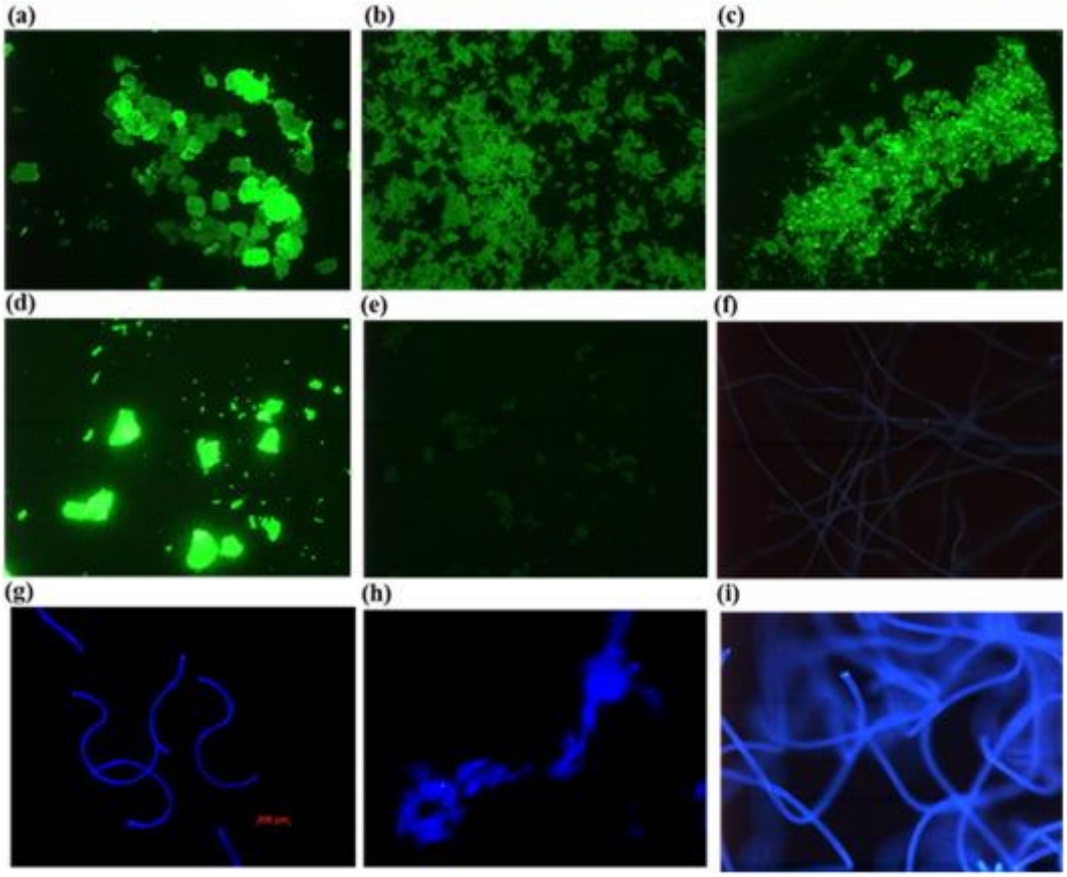
Pro EDX spektroskopii je zapotřebí vysokoenergetický svazek nabitých částí (elektrony nebo protony) nebo svazek rentgenových paprsků (paprsky X), tedy elektromagnetické záření o vlnové délce 1-10 pm, soustředěních na vzorek. V základním stavu mají elektrony určitou elektronovou hladinu (nejsou excitované). Dopadající paprsek X má schopnost excitovat elektron a vymrštit ho z dané vnitřní vrstvy. Elektron z vnější vrstvy s vyšší energií, než měl excitovaný elektron, vyplní vzniklou díru a rozdíl mezi vrstvou s vyšší energií a vrstvou s nižší energií, což zapříčiní uvolnění energie ve formě rentgenového záření. Množství emitovaného záření se následně měří energetickým disperzním spektrometrem [76,80,86,87].

3.2.6.2.2. Fluorescenční spektroskopie a mikroskopie

Pro zlepšení přesnosti vizuální analýzy se v poslední době využívá možnost barvit MP fluorescenčními barvivy. Při tomto postupu se používají hydrofobní fluorescenční barvivo, jako je nilská červeň. Barvení probíhá 10-30 min. a vykazuje až 96 % úspěšnost v navrácení do původního stavu. Po barvení dojde k ozáření vzorků specifickými světelnými paprsky pod fluorescenčním mikroskopem nebo konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem. Vystavení vzorku paprskům vede k emitaci fluorescence (viz. Obr. 7).

Vzhledem k tomu, že některé bílé a průhledné MP mohu přirozeně vykazovat fluorescenci, je nasnadě využít také fluorescenční mikroskopii pro zlepšení identifikace.

V posledním úkonu se částice identifikují a spočítají. Schopnost nilské červeně vázat se na organický materiál, jakožto i schopnost organických materiálů vykazovat fluorescenci, je známým problémem. To může vést k nadhodnocení počtu MP ve vzorku [76,77,80,83,88,89,90].



Obrázek 7. Nilská červeň zviditelňující (a) polyetylen, (b) polykarbonát, (c) polyuretan, (d) poly(ethylen-vinylacetát), (e) polyvinylchlorid a (f) polyester se zelenou fluorescencí a nezbarvený (g) polyester (h) polyethylentereftalát a (i) polyamid v modré fluorescenci [91].

3.2.6.2.3. Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

První metodou, která se použila pro stanovení chemického složení MP, byla infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), která je založena na absorpci infračerveného záření při průchodu vzorkem. Toto záření ovlivňuje rotačně vibrační stavy sledované molekuly, a to v závislosti na změnách dipólového momentu. Výstupem pak jsou infračervená spektra zobrazující závislost absorbance (potažmo transmitance) na vlnočtu, která se srovnávají s databází infračervených spekter jednotlivých standardů. Z tohoto důvodu, infračervené spektrometrie umožňuje zabránit záměně MP za jiné organické nebo anorganické materiály, aniž by odrážela barvu či tvar MP. Nespornou výhodou je skutečnost, že se FTIR řádí mezi nedestruktivní metody pro analýzu MP. Tudíž vzorek může být dále

podroben analýze třeba i destruktivní metodou. Kromě toho FTIR poskytuje informace o složení polymeru, což může odhalit původ a mechanismus výskytu MP v přírodním prostředí. Složení kyslíkových vazeb, které můžeme odhalit právě z IR spektra, poskytuje informaci o oxidačním stavu MP, a tedy o jejich degradaci a stáří [76,77,78,92,93].

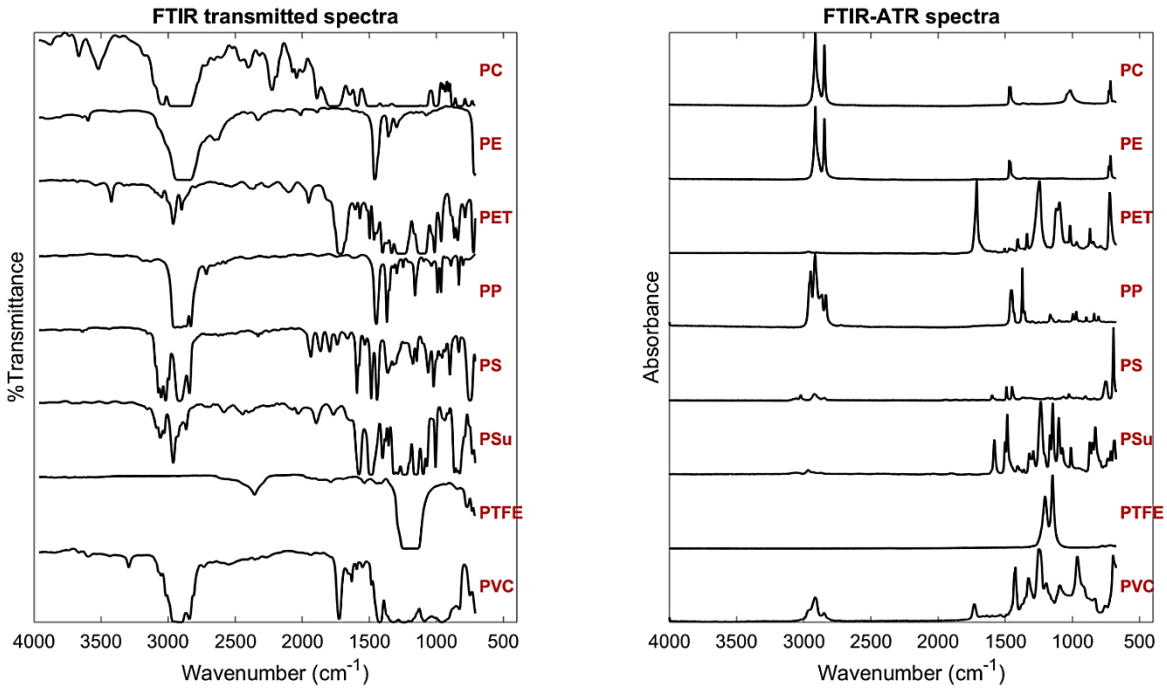
V praxi se k identifikaci MP se v FTIR používají tři různé režimy (módy). Těmi jsou odraz, přenos a oslabená celková odraznost (ATR). Vzorek se nejdříve chemicky a enzymaticky přečistí, a po filtraci se celý filtr nebo jeho část podrobí FTIR analýze [76,78,91]. Jelikož filtry mohou být z materiálů jenž absorbují infračervené záření, musí se před vlastní analýzou provést tzv. blank základní linie.

Spekulární (zrcadlová) reflektanční technika se obvykle využívá pro analýzu materiálů s velkou tloušťkou nebo pokud je materiál neprůhledný. Z tohoto důvodu je tato technika vhodná pro stanovení MP ve skutečných vzorcích, kdy se měří změna intenzity záření odraženého od reflexní podložky, na které se nachází analyzovaný vzorek. Za nevýhodu tohoto přístupu lze považovat slabý signál, velký vliv šumu výsledného záznamu, a tudíž nízká shoda se standardními spektry. Tento slabý signál je důsledkem nízké odrazivosti IR záření na povrchu MP, které může být způsobeno nepravidelnosti struktury [83,92,94].

Režim FTIR, kdy se využívá prostupu záření, může poskytnout kvalitnější výsledky než režim odrazu (ATR). V tomto případě infračervené záření prochází ze zdroje skrz vzorek, přičemž použitý filtr musí být zcela průhledný, aby nezpůsoboval interferenci s procházejícím zářením. Kromě toho analyzované plastové částice musí být rovněž průhledné a dostatečně tenké [83,92,94].

U techniky ATR se vzorek umístí tak, aby byl v optickém kontaktu s materiálem o vysokém indexu lomu, který se označuje jako ATR krystal. Tato technika využívá vícenásobný odraz záření mezi zkoumaným vzorkem a ATR krystalem. Pro analýzu v tomto uspořádání jsou požadavky na předúpravu vzorku relativně nízké, jelikož nečistoty ve vzorku nenarušují tak významně analýzu, jako v předchozích přístupech. Dále je režim ATR vhodný pro analýzu MP s nepravidelným povrchem nebo pro extrémně malé MP (viz. Obr. 8). V tomto případě je určitým problémem samotný ATR krystal, který by se mohl mechanicky poškodit, a tím negativně ovlivňovat analýzu. Za nevýhodu zle také uvažovat vysoké pořizovací náklady na instrumentaci [76,83,92,94].

U analýzy pomocí FTIR existují stále určitá omezení. Problém může nastat například u stanovení MP, které jsou menší než 20 μm. FTIR je také citlivá na heterogenitu MP, stupeň stárnutí nebo na organické látky přítomné v životním prostředí. Jednoduše řečeno se musí FTIR lépe modifikovat pro analýzu vzorků ze životního prostředí [77]

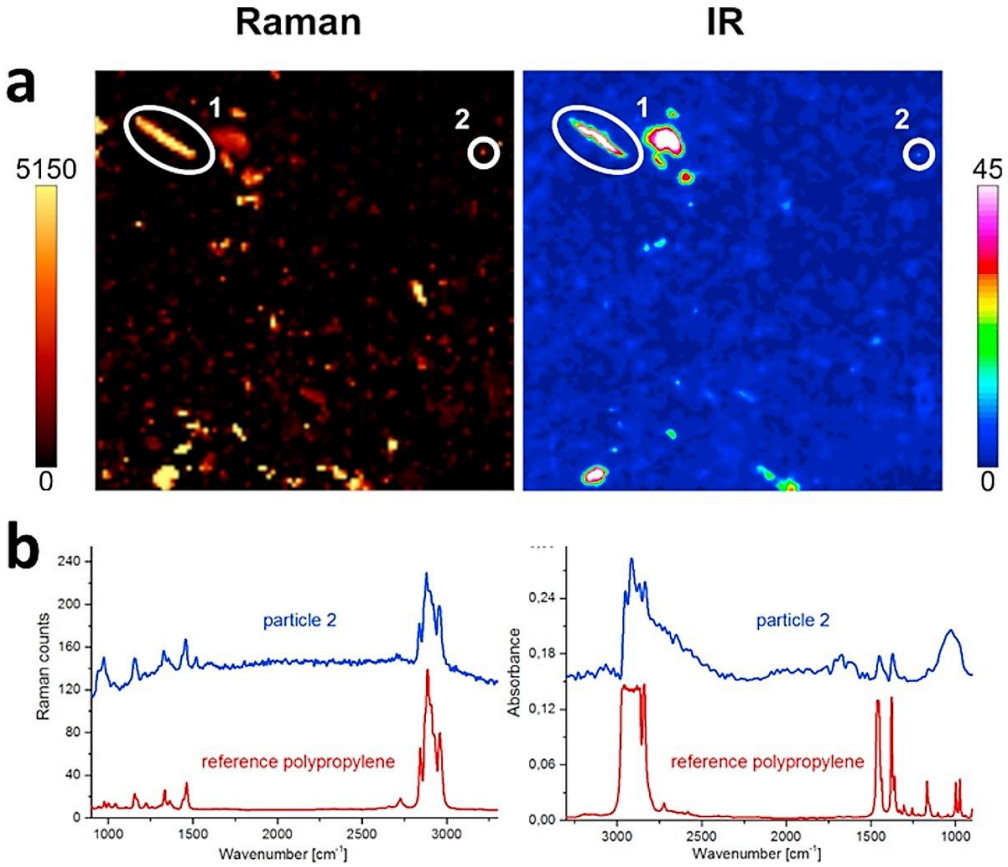


Obrázek 8. FTIR spektra plastů získaná v transmisním a ATR módu [92].

3.2.6.2.4. Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie se řádí mezi další spektrální metody, kterou lze využít pro analýzu MP. Princip metody spočívá v měření rozptýleného záření pocházející z monochromatického laserového paprsku. Většina detekovaného záření má stejnou frekvenci jako dopadající záření, tzv. Rayleigův rozptyl. Pokud rozptýlené záření má ovšem odlišnou frekvenci od tohoto dopadajícího, tak se jedná o Ramanův efekt, jenž poskytuje jedinečné informace o rotačních a vibračních stavech molekuly. FTIR je citlivá na vibrace hetero-nukleárních funkčních skupin a polárních vazeb na rozdíl od Ramanovy spektrometrie, jenž umožňuje rozlišovat homo-nukleární molekulární C-C, C=C a C≡C vazby.

Díky této znalosti se můžou identifikovat kontaminující polymery ve vzorcích životního prostředí nebo v potravinách. Ramanova spektroskopie je výhodná pro zachování vzorku pro další analytickou metodu, jelikož se řadí spolu s FTIR k nedestruktivním metodám. Výhoda Ramanovy spektroskopie spočívá v možnosti identifikovat MP o velikosti menší než 20 μm, na rozdíl od FTIR, kdy jednotlivá FTIR spektra jsou zatížena nízkým rozlišením (poměr signál k šumu základní linie), jak je evidentní z Obr. 9. Kromě toho, Fischer a kol. uvedli, že Ramanova spektroskopie je schopna najít a určit částice až do velikosti 500 nm [95].



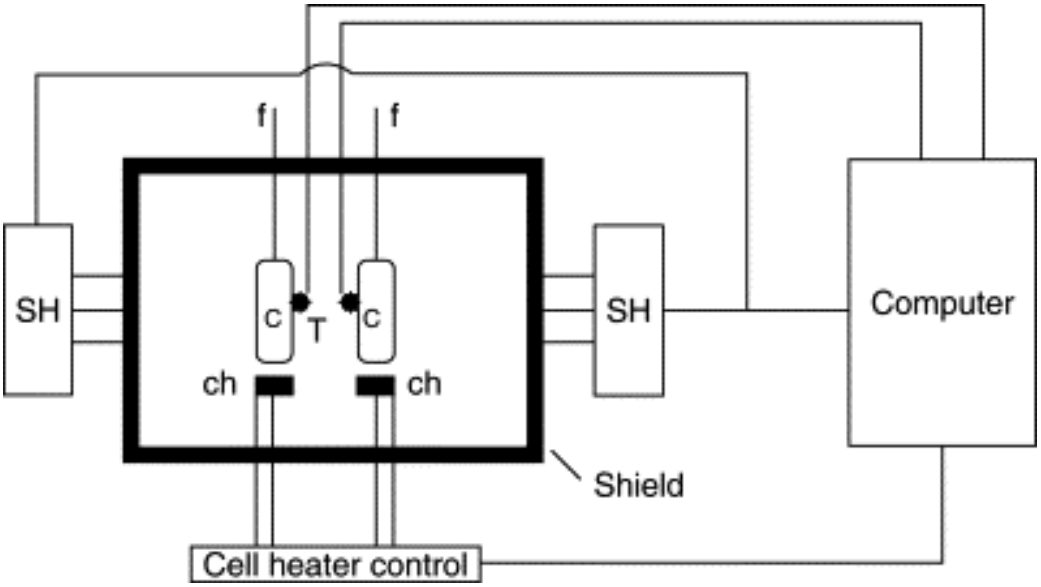
Obrázek 9. Porovnání Ramanova spektra a FTIR spektra pro polypropylen [96].

Samozřejmě u této techniky také existují určitá omezení. Materiály vykazující silnou fluorescenci nelze analyzovat Romanovou spektroskopií, což výrazně omezuje praktické použití při analýze reálných vzorků z životního prostředí. Lasery s vlnovou délkou 1064 nm, které eliminují fluorescenci, mohou znehodnotit tepelně labilní vzorky. S ohledem na pořizovací náklady a nutnosti zařazení čistících kroků, není Ramanova spektrometrie přednostně využívána pro reálné analýzy [76,77,78,88,97].

3.2.6.3. Metody tepelné analýzy v monitorování mikroplastů

Jak již bylo v předchozí kapitole naznačeno, vlastnosti polymerů se mohou zásadně změnit působením teploty v reálném čase. Právě tepelné analýzy mají schopnost sledovat tyto změny, které jsou pro polymery charakteristické. Díky tomuto poznatku lze identifikovat jednotlivé MP ve vzorcích. Se zvýšením teploty se postupně MP mění z pevného stavu na kapalný nebo až plynný. Při specifické teplotě se objeví v termografu endotermický pík, který je charakteristický pro jednotlivé polymerní materiály. Chemické složení MP (včetně přísad) ovlivňuje tepelnou stabilitu výsledného polymerů, jenž má za následek různé podoby termografů [76,77], což se využívá k jejich identifikaci („otisk prstu“). Jedná se o výhradně destruktivní metody, a tudíž vzorek není možné použít pro další analýzu. Jelikož se sleduje

tepelná stabilita jednotlivých MP, je zapotřebí využít tepelnou celu, která umožní udržet teplotu dle nastavených hodnot. Přístroje pro tepelné analýzy se dále skládají z teplotních čidel a nádob, do kterých se vkládá vzorek (viz. Obr. 10).

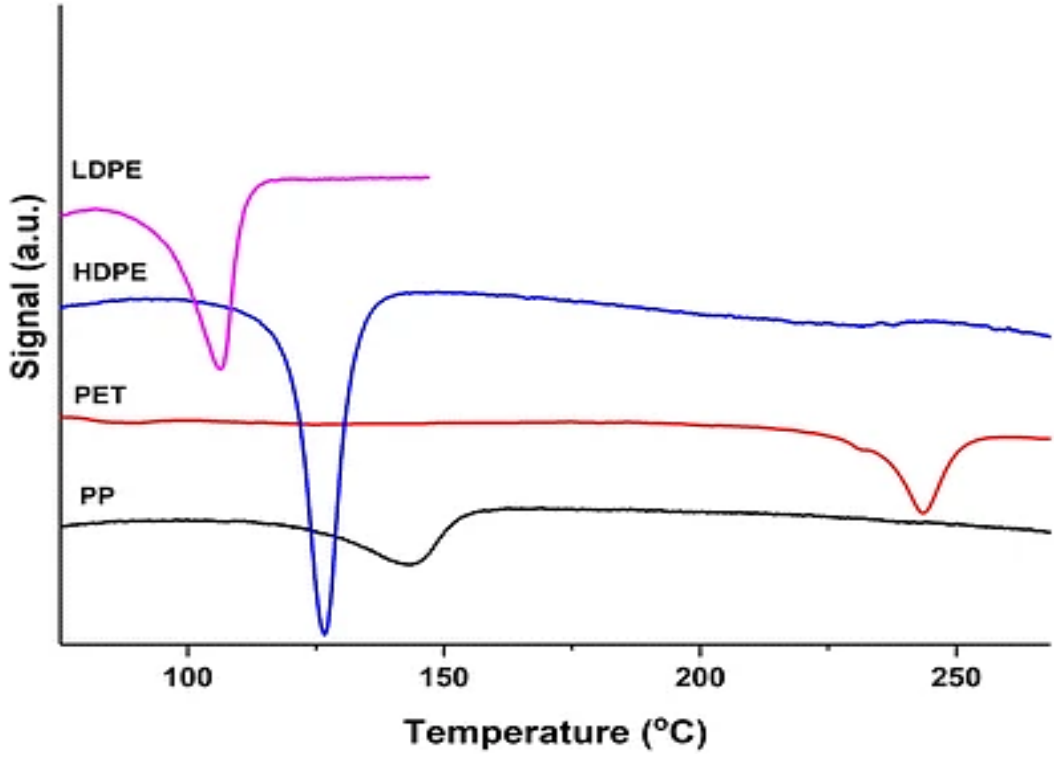


Obrázek 10. Schématické znázornění přístroje pro diferenciální skenovací kalorimetrii [98].

3.2.6.3.1. Diferenciální skenovací kalorimetrie

Jednou z metod založených na tepelné stabilitě MP je diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), která poskytuje kvalitativní, tak i kvantitativní informace o analyzovaném vzorku (Obr. 11). V současné době se DSC široce využívá díky své jednoduchosti a relativně nízkým pořizovacím a provozním nákladům oproti jiným metodám.

V praxi se identifikace většinou provádí pomocí srovnání a referenčními vzorky, kdy se v podstatě měří rozdílný průtok tepla mezi vzorkem a standartním materiálem. Toho lze dosáhnout buď ohřátím nebo ochlazením látky. Nicméně pomocí DSC se stanovují především primární plasty, jako jsou polypropylen nebo polyethylen, protože omezení DSC tkví v podobné teplotě tání potažmo tuhnutí. Tudíž, pokud nastane situace, kdy se teploty plastů vyskytují blízko sebe, jednotlivé píky v termografu se překrývají a nelze odlišit jednotlivé polymery [76,83,88,100].



Obrázek 11. Průběh termografu polyethylenu s nízkou hustotou (LDPE), polyethylenu s vysokou hustotou (HDPE), polyethylen tereftalátu (PET) a polypropylenu (PP) [99].

3.2.6.3.2. Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza (TGA) se řadí rovněž mezi destruktivní metody vhodné pro analýzu MP. Tato metoda určuje kvantitativní a kvalitativní informace o vzorku tím, že se sleduje úbytek hmotnosti v čase, kdy se vzorek zahřívá specifickou rychlostí za daných teplotních a atmosférických podmínek. Nejvíce se využívá k analýze polyethylenu a polypropylenu. Za výhodu TGA se považuje možnost použít mnohem větší množství vzorku než u pyrolytické plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (PY-GC-MS). Omezení TGA jsou obdobná jako u DSC. Nejčastěji se TGA kombinuje s jinými nedestruktivními metodami za účelem komplexní analýzy MP [76,77,83,101].

3.2.6.4. Chromatografické metody v analýze mikroplastů

Podstatu chromatografické analýzy představuje rozdílná interakce analytů mezi mobilní a stacionární fázemi (nejčastěji funkcionalizované polymery). V kolonové chromatografii se stacionární fáze nachází v termostatovaný koloně, kterou protýká za vysokého tlaku mobilní fáze, jenž většinou představuje směsná polární rozpouštědla. Jelikož je každá látka jinak zadržována specifickými interakcemi se stacionární fází, dochází k jejich rozdílné eluci z kolony do prostoru detektoru. Obdržené píky v chromatogramu, zobrazující

závislost odpovědi detektoru na retenčním čase, se vyhodnocují pro kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu. Přestože se chromatografické metody převážně používají pro stanovení organickcých polutantů v jednoduchých (odpadní voda), tak i složitých matricích životního prostředí (pletiva rostlin a tkáně živočichů), mohou být překvapivě použity i při monitorování MP.

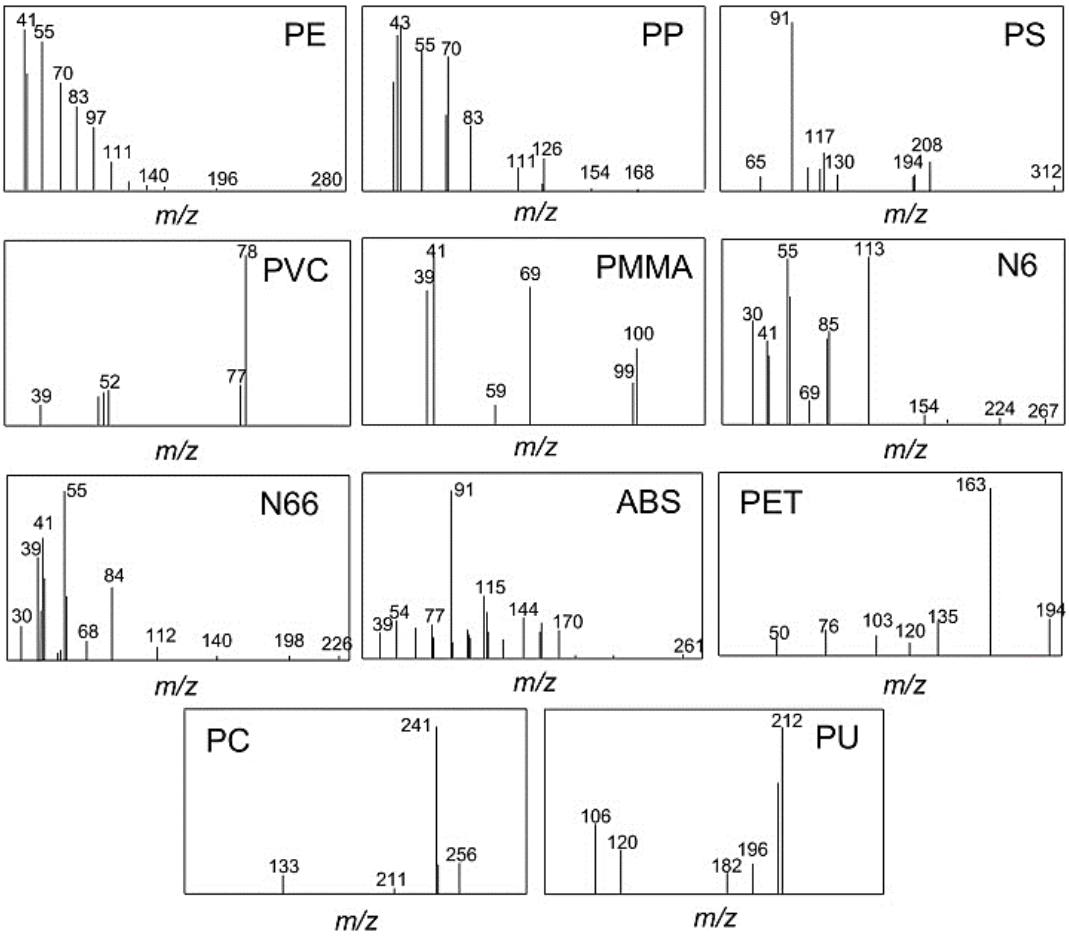
3.2.6.4.1. Pyrolytická plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Již výše zmíněná PY-GC-MS využívá tepelný rozklad vzorků, kdy se vzorek umístí do prostoru s inertním plynem, kde se spálí a vzniklé produkty jsou poté unášeny nosným plynem do chromatografické kolony plynového chromatografu. Separované produkty se nakonec dostávají do hmotnostního detektoru, kde jsou analyzovány na základě poměru mezi hmotností a nábojem částic (viz Obr. 12). Identifikace polymerů se provádí na základě porovnání hmotnostních spekter standardů, které bývají často součástí knihoven přístroje.

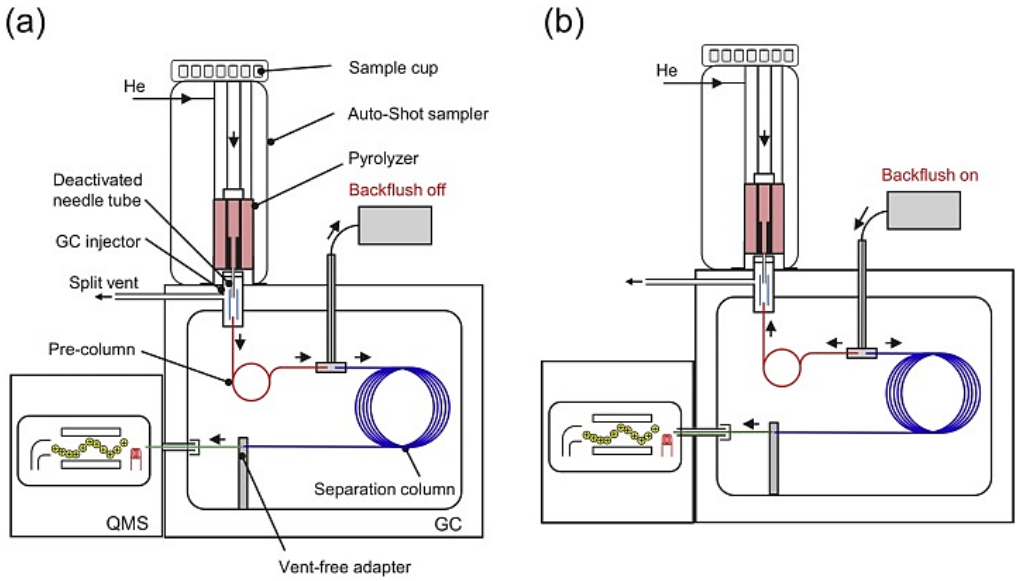
Při použití PY-GC-MS lze získat informace o chemickém složení polymerů, včetně jejich pro životní prostředí mnohdy toxických příměsí. Bohužel tato destruktivní chromatografická metoda neposkytuje informace o tvaru ani o stáří MP. Proto se často používá v kombinaci s vizuální nebo spektroskopickými metodami [76,77,78,83,88,100,103,104].

Ve vědecké práci z roku 2020 se využilo zařazení předkolony se zpětným proplachem (viz Obr. 13). Díky tomuto uspořádání se čas potřebný na analýzu výrazně zkrátil. Prvních 10 min. analýzy není zapnutý zpětný proplach nosným plynem. Po 10 min. se přívod nosného plynu otevře a sloučeniny, které jsou stále v předkoloně, se propláchnou přes dělený průduch [102].

Za určitou variantou PY-GC-MS se považuje desorpční plynová chromatografie s tepelnou extrakcí a hmotnostní detekcí. Metoda kombinuje termogravimetrickou analytickou metodu, extrakci na pevný fázi (SPE) a termální desorpční plynovou chromatografii. Vzorek je v prvním kroku pyrolyzován při teplotě až 1000 °C a poté absorbován ve zkumavkách obsahující pevnou fázi. Zařazením SPE se odstraní interference pocházející z kontaminantů plastů, jenž mají podobné hmotnosti nebo teploty degradace. Poté jsou produkty rozkladu přeneseny do přístroje pro tepelnou desorpci. Vzniklé produkty se následně separují v chromatografické koloně a detekují hmotnostní spektrometrií. Desorpční PY-GC-MS umožňuje překonat jistá omezení spočívající v blokování reakční trubice vysokomolekulárními pyrolytickými látkami, což umožňuje vynechat předúpravu vzorku. Navíc je možné pro analýzu použít větší množství vzorku než u PY-GC-MS [76,77,88].



Obrázek 12. Hmotnostní spektra produktů pyrolýzy pro polyethylen (PE), polypropylen (PP), polystyren (PS), polyvinylchrolid (PVC), polymethylmethakrylát (PMMA), nylon-6 (N6), nylon-6,6 (N66), kopolymer akrylonitril-butadien-styren (ABS), polyethylen tereftalát (PET), polykarbonát (PC), polyuretan na bázi methylen difenyl diisokyanátu (PU) [102].



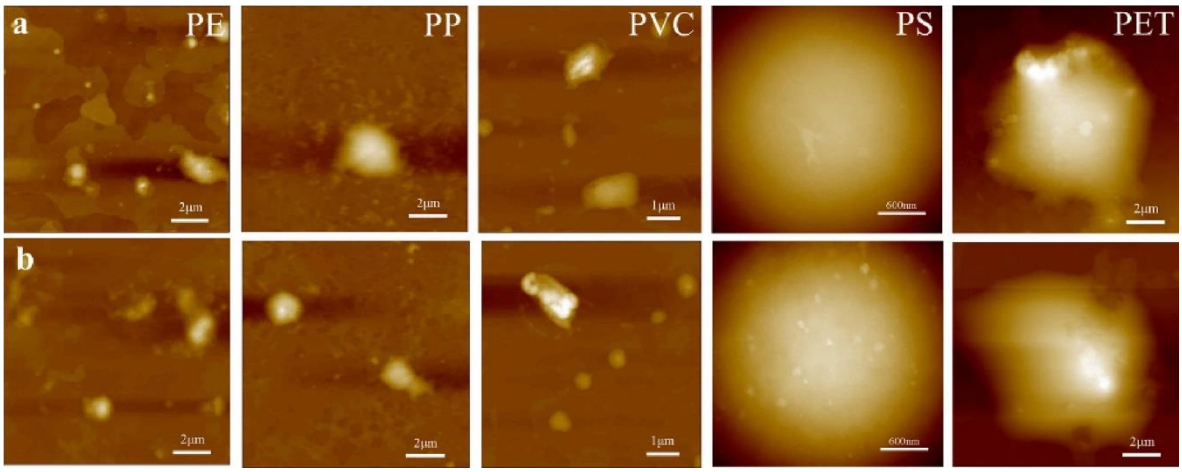
Obrázek 13. Schématické zobrazení přístroje používaného pro PY-GC-MS [102].

3.2.6.5. Nejnovější přístupy v monitorování mikroplastů v životním prostředí

Pro správné stanovení MP se neustále vyvíjí nové a nové metody, jenž využívají nejrůznější mikroskopické, spektrální, chromatografické techniky, které by se měly vypořádat s problémy a výzvami týkající se analýzy životního prostředí. Omezení současných metod spočívá v neschopnosti detekovat MP menší než několik mikrometrů. Proto se usilovně pracuje na vývoji nových metod odběru vzorků, izolace MP, a samotné vizualizace, včetně chemického složení.

K těmto metodám se řadí mikroskopie atomárních sil (AFM), jež se řadí k nejnovějším technikám využívaných pro charakterizaci povrchu MP (viz Obr. 14). Velmi často se využívá ve spojení s FTIR nebo s Ramanovou spektroskopií. Principiálně hrot sondy připevněný na pohyblivé rameno s pružinou mapuje povrch vzorku, tím že interakce se vzorkem odchyluje rameno, přičemž se toto odchýlení snímá pomocí sensoru. Pro AFM skenovaní byly vytvořeny dva režimy, a to kontaktní způsob nebo bezkontaktní způsob. Pokud mikroskop pracuje v bezkontaktním režimu, tak je mezi hrotem sondy a vzorkem mezera v rozmezí 10-100 nm způsobená silami, jako jsou van der Waalsovy síly, elektrostatické síly, magnetické nebo kapilární síly. Technika umožňuje podat informace o topografii povrchu a rozdělení nábojů. Pokud je mezera mezi hrotem sondy a vzorkem menší, jedná se o kontaktní režim. V tomto postupu umožňují iontové odpudivé síly skenovat povrch vzorku s vysokým rozlišením [105].

Jak už bylo zmíněno, AFM se často kombinuje se spektroskopickými metodami což umožňuje získat cenné informace o tvaru, struktuře MP, tak i o chemickém složení. Jelikož v reálném vzorku může být velmi obtížné detekovat vůbec přítomnost MP pomocí AFM-IR, je velmi důležité dbát na patřičnou předúpravu vzorku, kterou se odstraňují organické a anorganické neplastické materiály. Zejména drobné, neprůhledné částice mohou být přehlédnuty ruční identifikací. Tento problém je možné překonat použitím automatizovaného mapování FTIR nebo Ramanovou spektroskopií. Tyto procesy ovšem vyžadují složitou a drahou instrumentaci [76,83].



Obrázek 14. AFM snímky různých mikroplastů před (a) po (b) ošetření umělým trávením [107].

K novým technikám k analýze MP se rovněž řadí tzv. nano termální analýza (NTA-AFM), která poskytuje obraz vzorků pomocí AFM vyhřívané špičky. Při analýze se sonda s vyhřívaným hrotem dostane k povrchu vzorku, přičemž se hrot se v průběhu času specifickým způsobem zahřívá. Zahřívání ustane, pokud je dosaženo teploty skelného přechodu vzorku (T_g), jenž je definována jako teplota, nebo úzké rozmezí teplot, při kterém polymer přechází z tuhé, tvrdé, sklovité formy na formu měkkou. NTA-AFM poskytuje informace o tepelných vlastnostech jednotlivých oblastí, což je užitečné k analýze chemického složení a fyzického stavu MP o velikosti menší než 100 nm [74,81,104]. Touto metodou se stanovují například polykaprolakton, polyethylen o nízké hustotě, polyethylen tereftalát, polyvinylchlorid, polystyren nebo polykarbonát s definovanou teplotou přechodu mezi 50 °C až 250 °C [106].

K analýze MP se také nově používá spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR). Pro metodu se využívá stejný princip jako v případě standartní FTIR, kdy se využívá jiného rozsahu vlnových délek, a to v rozmezí 800-2500 nm. Spektra, která jsou získána, jsou poté porovnána se spektrální knihovnou známých standardů. Analýza NIR není tak citlivá, aby mohla být aplikována pro kvantitativní analýzu. Avšak NIR dovoluje zanalyzovat velké množství MP v krátkém čase [76,83].

Mezi další moderní přístup se řadí viditelná spektroskopie ve spojení se spektroskopií v blízké infračervené oblasti. Technika je založena na měření odraženého světla od povrchu vzorku v rozmezí vlnových délek 350-2500 nm, což zahrnuje oblast viditelného světla ale i oblast blízkou infračervenému záření. Při měření se stanoví obrazivost pro každou vlnovou délku. Tyto informace mohou podat zprávu o chemickém složení vzorku. Pro porovnání jednotlivých spekter existuje ověřená knihovna spektrálních dat [76,83,108].

4. Závěr

Z této detailní literární rešerše vyplývá, že v praxi není možné použít pouze jednu analytickou metodu pro komplexní popis všech vlastností mikroplastů, do kterých se řadí velikost, tvar, chemické složení polymeru, identifikace a kvantifikace příměsí a adsorbovaných látek, stáří, původ, atd. Tudíž se musí zkombinovat vícero metod, počínaje těmi nedestruktivními a konče těmi destruktivními. Z nedestruktivních metod se využívají mikroskopické metody pro zjištění velikosti a tvaru částic nebo spektroskopické metody pro identifikaci chemického složení jednotlivých mikroplastů. K destruktivním metodám, které jsou rovněž schopny odhalit chemické složení mikroplastů, se řadí termální analýza, využívající různé tepelné stability jednotlivých polymerů, a pyrolytická plynová chromatografie s hmotnostním detektorem.

Přestože existuje několik metod, jak stanovit chemické složení mikroplastů, většina z nich se bohužel nehodí pro analýzu enviromentálních vzorků, natož aby byly používány v terénu. Za hlavní „kámen úrazu“ lze považovat velikost mikroplastických částic (*„To že částice nejsou vidět, neznamená že nejsou přítomny ve vzorku.“*) Z toho vyplívá, že hlavní nevýhodou jednotlivých metod je nízké rozlišení. Dalším závažným problémem u většiny metod je balastní materiál, který může rušit vlastní analýzu. Proto by se měl výzkum především zaměřit na nové postupy vhodné pro izolaci mikroplastů z komplexních vzorků (odpadní voda, půda, tkáně živočichů a pletiva rostlin). Dále by bylo vhodné zkrátit čas potřebný na analýzu, aby se mohla provádět i v terénu, čehož by se dalo dosáhnout částečně automatizovanými nebo alespoň poloautomatizovanými postupy.

Na závěr bych také rád uvedl svůj osobní názor na tuto problematiku. „*Po prostudování a sepsání této rešeršní práce jsem velmi znepokojen z legislativy, a to hlavně z toho důvodu, že žádné zákony a nařízení, týkající se mikroplastů, neexistují. Sice zde máme nařízení Evropského parlamentu týkající se plastů, ale s ohledem na dopady mikroplastů na lidské zdraví, které mohou být i fatální, považuji za velmi tristní, že tomuto tématu není věnována větší pozornost. Ovšem vědecká obec i za relativně krátkou dobu, po kterou se ví o výskytu mikroplastů v životním prostředí, dokázala publikovat mnoho studií o mikroplastech, jak v životním prostředí, tak i v potravinách. Myslím, že výzkum těchto částic je na počátku a bude trvat několik let, než zcela pochopíme koloběh mikroplastů, a než se vyvinou spolehlivé metody a postupy pro analýzu těchto částic.*“

Seznam literatury

[1] AKDOGAN Z., GUVEN B. Microplastics in the environment: A critical review of current understanding and identification of future research needs. *Environmental Pollution* ***254***, 2019, 113011.

[2] JIN M., WANG X., REN T., WANG J., SHAN J. Microplastics contamination in food and beverages: Direct exposure to humans. *Journal of Food Science* ***86***(7), 2021, 2816-2837.

[3] LAM C.S., RAMANATHAN S., CARBERY M., GRAY K., VANKA K.S., MAURIN C., BUSH R., PALANISAMI T. A Comprehensive Analysis of Plastics and Microplastic Legislation Worldwide. *Water, Air, & Soil Pollution.* **229**, 2018, 345

[4] CONTI I., SIMIONI C., GABRIELE V., BRENNA C., COSTANZI E., NERI L.M. Legislation to limit the environmental plastic and microplastic pollution and their influence on human exposure. *Environmental Pollution.* **288**, 2021, 117708

[5] A Constitution for Oceans. *Oceans & Law of the Sea* [online]. Office of Legal Affairs 2018. Last Revised: 13.7. 2022. Dostupné z: https://www.un.org/depts/los/convention_agreements/convention_overview_convention.htm [9.3. 2023]

[6] Chronological lists of ratifications of, accessions and successions to the Convention and the related Agreements. *United Nations Oceans & Law of the Sea.* [online]. Office of Legal Affairs 2017. Last Revised 13.5 2022. Dostupné z: https://www.un.org/depts/los/reference_files/chronological_lists_of_ratifications.htm [9.3. 2023]

[7] PINTO DA COSTA J., MOUNEYRAC C., COSTA M., DUARTE, A.C., ROCHA-SANTOS T. The Role of Legislation, Regulatory Initiatives and Guidelines on the Control of Plastic Pollution. *Frontiers in Environmental Science.* **8**, 2020, 104

[8] Microplastics. *Environment* [online]. The Directorate-general for Environment. Dostupné z: https://environment.ec.europa.eu/topics/plastics/microplastics_en [9.3. 2023]

[9] MYSZOGRAJ M. Microplastics in Food and Drinking Water – Environmental Monitoring Data. *Civil and Environmental Engineering Reports.* **30** (4), 2020, 201-209

[10] LIEBETEZIT G., LIEBEZEIT E., Origin of synthetic particles in honeys. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences.* **65** (2), 2015, 143-147

[11] KOSUTH M., MASON S.A., WATTENBERG E.V. Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. *Plos one.* **13**(4), 2018, 0194970

[12] CHEN J.Y.S., LEE Y.C., WALTHER B.A. Microplastic Contamination of Three Commonly Consumed Seafood Species from Taiwan: A Pilot Study. *Sustainability.* **12**(22), 2020, 9543

[13] PATIL P.B., MAITY S., SARKAR A. Potential human health risk assessment of microplastic exposure: current scenario and future perspectives. *Environmental Monitoring and Assessment.* **194**(12), 2022, 898

[14] DRIS R., GASPERI J., MIRANDE C., MANDIN C., GUERROUACHE M., LANGLOIS V., TASSIN B. A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments. *Environmental Pollution.* **221**, 2017, 453-458

[15] PRATA J. Airborne microplastics: consequences to human health?. *Environmental Pollution*. **234**, 2018, 115-126

[16] VIANELLO A., JENSEN R., LIU L., VOLLERTSEN J. Simulating human exposure to indoor airborne microplastics using a breathing thermal manikin. *Scientific Reports.* **9**, 2019, 8670

[17] RAHMAN A., SARKAR A., YADAV O.P., ACHARI G., SLOBODNIK J. Potential human health risks due to environmental exposure to nano- and microplastics and knowledge gaps: A scoping review. *Science of The Total Environment.* **757**, 2021, 143872

[18] GASPERI J., WRIGHT S.L., DRIS R., COLLARD F., MANDIN C., GUERROUACHE M., LANGLOIS V., KELLY F.J., TASSIN B. Microplastics in air: Are we breathing it in?. *Current Opinion in Environment Science & Health.* **1**, 2018, 1-5

[19] KELLY F., FUSSEL J., Size source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmospheric Environment.* **60**, 2012, 504-526

[20] VALAVANIDIS A., VLACHOGIANNI T., FIOTAKIS K., LORIDAS S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanism. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* **10**(9), 2013, 3886-3907

[21] COX K., COVERNTON G., DAVIES H., DOWER J., JUANES F., DUDAS S. Human consumption of microplastics. *Environmental Science & Technology.* **53**(12), 2019, 7068-7074

[22] VAN CAUWENBERGHE L., JENSSEN C. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution.* **193**, 2014, 65-70

[23] SALIM S., KAPLAN G., MADSEN K. Air pollution effects on the gut microbiota. *Gut Microbes.* **5**(2), 2014, 215-219

[24] ENSIGN L., CONE R., HANES J. Oral drugs delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Advances Drug Delivery Reviews.* **64**(6), 2012, 557-570

[25] POWELL J., THOREE V., PELE L. Dietary microparticles and their impact on tolerance and immune responsiveness of the gastrointestinal tract. *British Journal of Nutrition.* **98**, 2007, 59-63

[26] SMITH M., LOVE D.C., ROCHMAN C.M., NEFF R.A. Microplastics in seafood and the Implications for Human Health. *Current Environmental Health Reports.* **5**, 2018, 375-386

[27] NAPPER I.E., BAKIR A., ROWLAND S.J., THOMPSON R.C. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Marine Pollution Bulletin.* **99**(1-2), 2015, 178-185

[28] GOUIN T., ROCHE N., LOHMANN R., HODGES G. A Thermodynamic Approach for Assessing the Environmental Exposure of Chemicals Absorbed to Microplastic. *Environmental Science & Technology.* **45**(4), 2011, 1466-1472

[29] REVEL M., CHÂTEL A., MOUNEYRAC C. Micro(nano)plastics: a threat to human health?. *Current Opinion in Environmental Science & Health.* **1**, 2018, 17-23

[30] AGEEL H.K., HARRAD S., ABDALLAH A.E. Occurrence, human exposure, and risk of microplastics in the indoor environment. *Environmental Science: Processes & Impacts.* 2022, 24, 17-31.

[31] WU P., LIN S., CAO G., WU J., JIN H., CHEN W., WONG M.H., YANG Z., CAI Z. Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity of microplastics in the human body and health implications. *Journal of Hazardous Materials.* **437**, 2020, 129361

[32] INKIELEWICZ-STEPNIAK S., TAJBER L., BEHAN G., ZHANG H., RADOMSKI M., MEDINA C., SANTOS-MARTINEZ M. The role of Mucin the toxicological impact of polystyrene nanoparticles. M*aterials,* **11**(5), 2018, 724

[33] YACOBI N.R., DEMAIO L., XIE J., HAMM-ALVAREZ S.F., BOROK Z., KIM K.J., CRANDALL E.D. Polystyrene nanoparticle trafficking across alveolar epithelium. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* **4**(2), 2008, 139-145

[34] PRATA J.C., PINTO DA COSTA J., LOPEA I., DUARTE A.C., ROCHA-SANTOS T. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of The Total Environment.* **702**, 2020, 134455

[35] BHUYAN S.M. Effects of Microplastics on Fish and in Human Health. *Frontiers in Environmental Science.* **250**, 2022, 827289

[36] BRANDTS I., TELES M., TVARIJONAVICIUTE A., PEREIRA M., MARTINS M., TORT L., OLIVEIRA M. Effects of polymethylmethacrylate nanoplastics in Dicentrarchus labrax. *Genomics*. **110**(6), 2018, 435-441

[37] DENG Y., ZHANG Y., LEMOS B., REN H. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific reports.* **7**, 2017, 46687

[38] FARHAT S., SILVA C., ORINE., CAMPOS L., SALLUM A., BRAGA A. Air pollution in autoimmune rheumatic diseases: a review. *Autoimmunity Reviews.* **11**, 2011, 14-21

[39] LU L., WAN Z., LUO T., FU Z., JIN Y. Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Science of the Total Environment.* **631-632**, 2018, 449-458

[40] JIN Y., LU L., TU W., LUO T., FU Z. Impacts of polystyrene microplastic on the gut barrier, microbiota and metabolism of mice. *Science of The Total Environment.* **649**, 2019, 308-317

[41] HWANG J., CHOI D., HAN S., CHOI J., HONG J. An assessment of the toxicity of polypropylene microplastics in human derived cells. *Science of the Total Environment.* **684**, 2019, 657-669

[42] PRATA P., COSTA J., LOPES I., DUARTE A. Environmental exposure to microplastics: an overview on possible human health effects. *Science of the Total Environment.* **702**, 2020, 134455

[43] WICK P., MALEK A., MANSER P., MEILI D., MAEDERALTHAUS X., DIENER L., DOENER P.A., ZISCH A., KRUG F., VON AMNDACH U. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environmental Health Perspectives.* **118** (3), 2010, 432-436

[44] BARBOZA L., VIEIRA L., GUILHERMINO L. Single and combined effects of microplastics and mercury on juveniles of the European seabass (Dicentrarchus labrax): changes in behavioural responses and reduction of swimming velocity and resistance time. *Environmental Pollution.* **236**, 2016, 1014-1019

[45] SHARIFINIA M., BAHMANBEIGLOO Z.A., KESHAVARZIFARD M., KHANJANI M.H., LYONS B.P. Microplastic pollution as a grand challenge in marine

research: A closer look at their adverse impacts on the immune and reproductive systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **204**, 2020, 111109

[46] SUSSARELLU R., SUQUET M., THOMAS Y., LAMBERT C., FABIOUX C., PERNET M.E.J, LE GOÏC N., QUILLIEN V., MINGANT C., EPELBOIN Y. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **113**(9), 2016, 2430-2435

[47] PRATA J. Airborne microplastics: consequences to human health?. *Environmental Pollution.* **234**, 2018, 115-126

[48] CHANG C. The immune effects of naturally occurring and synthetic nanoparticles. *Journal of Autoimmunity.* **34**, 2010, 234-246

[49] RODRIGUES M.O., ABRANTES N., GONCALVES F.J.M., NOGUEIRA H., MARQUES J.C., GONCALVES A.M.M. Impacts of plastic products used in daily life on the environment and human health: what is known?. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **72**, 2019, 103239

[50] LESLIE H.A., VAN VELZEN M.J., BRANDSMA S.H., VETHAAK A.D., GARCIA-VALLEJO J.J., LAMOREE M.H., Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment international.* **163**, 2022, 107199

[51] SUN R., XU K., YU L., PU Y., XIONG F., HE Y., HUANG Q., TANG M., CHEN M., YIN L., ZHANG J., PU Y. Preliminary study on impacts of polystyrene microplastics on the hematological system and gene expression in bone marrow cells of mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **218**, 2021, 112296

[52] BAJ J., DRING J.C., CZECZELEWSKI M., KOZYRA P., FORMA A., FLIEGER J., KOWALSKA B., BUSZEWICZ G., TERESIŃSKI G. Derivatives of Plastics as Potential Carcinogenic Factors: The Current State of Knowledge. *Cancers.* **14**(19), 2022, 4637

[53] WEAT-EBERHARD M. Nutrition, the visceral immune system, and the evolutionary origins of pathogenic obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **116**(3), 2019, 723-731

[54] SHIM W.J., HONG S.H., EO S.E. Identification methods in microplastic analysis: a review. *Analytical Methods.* **9,** 2017, 1384-1391

[55] IVLEVA N.P. Chemical Analysis of Microplastics and Nanoplastics: Challenges, Advances Methods, and Perspectives. *Chemical Reviews.* **121**(19), 2021, 11886-11936

[56] HIDLGO-RUZ V., GUTOW L., THOMPSON R.C., THIEL M. Microplastics in marine environment review of methods for identification and quantification. *Environmental Science & Technology.* **46**(6), 2012, 3060-3075

[57] PRIMPKE S., CHRISTIANSEN S.H., COWGER W., DE FROND H., DESHPANDE A., FISCHER M., HOLLAND E.B., MEYNS M., O´DONNELL B.A., OSSMANN B.E., PITTROFF M., SARAU G., SCHOLZE-BOETTCHER B.M., WGGIN K.J. Critical Assessment of Analytical Methods for the Harmonized and Cost Efficient Analysis of Microplastics. *Applied Spectroscopy.* **74**(9), 2020, 1012-1047

[58] ZHU J., WANG C. Recent advances in the analysis methodologies for microplastics in aquatic organisms: current knowledge and research challenges. *Analytical Methods.* **12**(23), 2020, 2944-2957

[59] JUNG S., CHO S.H., KIM K.H., KWON E.E. Progress in quantitative analysis of microplastics in the environment: A review. *Chemical Engineering Journal.* **422**, 2021, 130154

[60] RAZEGHI N., HAMIDIAN A.H., WU C., ZHANG Y., YANG M. Microplastics sampling techniques in freshwaters and sediments: a review. *Environmental Chemistry Letters.* **19**, 2021, 4225-4252

[61] MAI L., BAO L.J., SHI L., WONG C.S., ZENG E.Y. A review of methods for measuring microplastics in aquatic environments. *Environmental Science and Pollution Research.* **25**, 2018, 11319-11332

[62] ZHENG Y., LI J., SUN C., CAO W., WANG M., JIANG F., JU P. Comparative study of three sampling methods for microplastics analysis in seawater. *Science of The Total Environment.* **765**, 2021, 144495

[63] STOCK F., KOCHLEUS C., BÄNSCH-BALTRUSCHAT B., BRENNHOLT N., REIFFERSCHEID G. Sampling techniques and preparation methods for microplastic analyses in the aquatic environment-A review. *Trends in Analytical Chemistry.* **113**, 2019, 84-92

[64] PRATA J.C., PINTO DA COSTA J., DUARTE A.C., ROCHA-SANTOS T. Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: A critical review. *Trends in Analytical Chemistry.* **110**, 2019, 150-159

[65] LUSHER A. L., WELDEN N. A., SOBRAL P., COLE M. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Analytical Methods.* **9**, 2017, 1346-130

[66] MÖLLER J.N., LÖDER M.G.J., LAFORSCH C. Finding Microplastics in Soils: A Review of analytical Methods. *Environmental Science & Technology.* **54**(4), 2020, 2078-2090

[67] THOMAS D., SCHÜTZE B., HEINZE W.M., STEINMETZ Z. Sample Preparation Techniques for the Analysis of Microplastics in Soil – A Review. *Sustainability.* **12**(21), 2020, 9074

[68] RAZEGHHI N., HAMIDIAN A.H., MIRZAJANI A., ABBASI S., WU C., ZHANG Y., YANG M. Sample preparation methods for the analysis of microplastics in freshwater ecosystems: a review. *Environmental Chemistry Letters.* **20**, 2022, 417-443

[69] PRUME J.A., GORKA F., LÖDER M.G.J. From sieve to microscope: An efficient technique for sample transfer in the process of microplastics quantification. *MethodsX*. **8**, 2021, 101341

[70] PRATA J.C., COSTA J.P., GIRÃO A.V., LOPES I., DUARTE A.C., ROCHA-SANTOS T. Identifying a quick and efficient method of removing organic matter without damaging microplastic samples. *Science of The Total Environment.* **686**, 2019, 131-139

[71] ANDERSON P.J., WARRACK S., LANGEN V., CHALLIS J.K., HANSON M.L., RENNIE M. D. Microplastic contamination in Lake Winnipeg Canada. *Environmental Pollution.* **225**, 2017, 223-231

[72] KADAC-CZAPSKA K., TRZEBIATOWSKA P.J., KNEZ E., ZALESKA-MEDYNSKA A., GREMBECKA M. Microplastics in food – a critical approach to definition, sample preparation, and characterisation. *Food Chemistry.* **418**, 2023, 135985

[73] ENDERS K., LENZ R., BEER S., STEDMON C.A. Extraction of microplastic from biota: recommended acidic digestion destroys common plastic polymers. *ICES Journals of Marine Science.* **74**(1), 2017, 326-331

[74] NABI I., BACHA A.U.R., ZHANG L. A review on microplastics separation techniques from environmental media. *Journal of Cleaner Production.* **337**, 2022, 130458

[75] TIRKEY A., UPADHYAY L.S.B. Microplastics: An overview on separation, identification and characterization of microplastics. *Marine Pollution Bulletin.* **170**, 2021, 112604

[76] WOO H., SEO K., CHOI Y., KIM J., TANAKA M., LEE K., CHOI J. Methods of Analyzing Microsized Plastics in the Environment. *Applied Sciences.* **11**(22), 2021, 10640

[77] HUANG Z., HU B., WANG H. Analytical methods for microplastics in the environment: a review. *Environmental Chemistry Letters.* **21**, 2023, 383-401

[78] ADHIKARI S., KELKAR R., HALDEN R.U. Methods and challenges in the detection of microplastics and nanoplastics: a mini-review. *Polymer International.* **71**(5), 2022, 543-551

[79] DUDKIEWICZ A., TIEDE K., LOESCHNER K., JENSEN L.H.S., JENSEN E., WIERZBICKI R., BOXALL A.B.A., MOLHAVE K. Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy. *Trends in Analytical Chemistry.* **30**(1), 2011, 28-43

[80] GNIADEK M., DĄBROWSKA A. The marine nano- and microplastics characterisation by SEM-EDX: The potential of the method in comparison with various physical and chemical approaches. *Marine Pollution Bulletin.* **148**, 2019, 210-216

[81] WEN D., CHEN Y., TONG Y., WANG H., ZHANG H., LUO Y. Quantification of Microplastics in Soils Using Accelerated Solvent Extraction: Comparison with a Visual Sorting Method. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* **107**, 2021, 770-777

[82] KATSIMITI A., LOSADA-CARRILLO M.P., BARROS M., CAJARAVILLE M.P. Polystyrene nanoplastics and microplastics can act as Trojan horse carriers of benzo(*a*)pyrene to mussel hemocytes in vitro. *Scientific Reports.* **11**, 2021, 22396

[83] SAMANTA P., DEY S., KUNDU D., DUTTA D., JAMBULKAR R., MISHRA R., GHOSH A.R., KUMAR S. An insight on sampling, identification, quantification and characteristics of microplastics in solid waste. *Trends in Environmental Analytical Chemistry.* **36**, 2022, e00181

[84] PATZELT W.J. Polarized light microscopy. *Erast Leitz Wetzlar GmbH, D-6300 Lahn-Wetzlar.* **2**, 1985, 550-051

[85] DONGRE A., BHISEY P., KHOPKAR U. Polarized light microscopy. *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology.* **73**(3), 2007, 206

[86] WANG Z.M., WAGNER J., GHOSAL S., BEDI G., WALL S. SEM/EDS and optical microscopy analyses of microplastics in ocean trawl and fish guts. *Science of The Total Environmental.* **603-604**, 2017, 616-626

[87] GANESH D.E. A Complete study and review of Characterization Techniques of Nano materials. *Global Journal of Research in Engineering & Computer Sciences.* **2**(2), 2022, 17-31

[88] YE Y., YU K., ZHAO Y. The development and application of advanced analytical methods in microplastics contamination detection: A critical review. *Science of The Environmental.* **818**, 2022, 151851

[89] NGUYEN B., CLAVEAU-MALLET D., HERNANDEZ L.M., XU E.G., FARNER J.M., TUFENKJI N. Separation and Analysis of Microplastics and Nanoplastics in Complex Environmental Samples. *Accounts of Chemical Research.* **52**(4), 2019, 858-866

[90] SHRUTI V. C., PÉREZ-GUEVARA F., ROY P.D., KUTRALAM-MUNIASAMY G. Analyzing microplastics with Nile Red: Emerging trends, challenges, and prospects. *Journal of Hazardous Materials.* **423**, 2022, 127171

[91] SHIM W.J., SONG Y.K., HONG S.H., JANG M. Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. *Marine Pollution Bulletin.* **113**(1-2), 2016, 469-476

[92] XU J.L., THOMAS K.V., LOU Z., GOWEN A.A. FTIR and Raman imaging for microplastics analysis: State of the art, challenges and prospects. *Trends in Analytical Chemistry.* **119**, 2019, 115629

[93] WIRNKOR V.A., EBERE E.C., NGOZI V.E. Microplastics, an emerging concern: A review of analytical techniques for detection and quantifying microplastics. *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal.* **2**, 2019, 13-30

[94] KÄPPLER A., FISCHER D., OBERBECKMANN S., SCHERNEWSKI G., LABRENZ M., EICHHORN K.J., VOIT B. Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* **408**, 2016, 8377-8391

[95] FISCHER D., KAEPPLER A., EICHHORN K.J., Identification of Microplastics in the Marine Environment by Raman Microspectroscopy and Imaging. *American Laboratory.* **47**, 2015, 32-34

[96] ARAUJO C.F., NOLASCO M.M., RIBEIRO A.M.P., RIBERIO-CLARO P.J.A. Identification of microplastics using Raman spectroscopy: Latest developments and future prospects. *Water Research.* **142**, 2018, 426-440

[97] BUMBRAH G.S., SHARMA R.M. Raman spectroscopy-Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences.* **6**(3), 2016, 209-2015

[98] SPINK C.H. Differential Scanning Calorimetry. *Methods in Cell Biology.* **84**, 2008, 115-141

[99] CHIALANZA M.R., SIERRA I., PARADA A.P., FORNARO L. Identification and quantitation of semi-crystalline microplastics using image analysis and differential

scanning calorimetry. *Environmental Science and Pollution Research.* **25**, 2018, 16767-16775

[100] DU H., WANG J. Characterization and environmental impacts of microplastics. *Gondwana Research.* **98**, 2021, 63-75

[101] MANSA R., ZOU S. Thermogravimetric analysis of microplastics: A mini review. *Environmental Advances.* **5**, 2021, 100117

[102] MATSUI K., ISHIMURA T., MATTONAI M., IWAI I., WATANABE A., TERAMAE N., OHTANI H., WATANABE C. Identification algorithm for polymer mixtures based on Py-GC/MS and its application for microplastic analysis in environmental samples. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.* **149**, 2020, 104834

[103] PAÑALVER R., ARROYO-MANZANARES N., LÓPEZ-GARCÍA I., HERNÁNDEZ-CÓRDOBA M. An overview of microplastics characterization by thermal analysis. *Chemosphere.* **242**, 2020, 125170

[104] PAROLINI M., ORTENZI M.A., MORELLI C., GIANOTTI V. Emerging use of thermal analysis in the assessment of micro(nano)plastics exposure. *Current Opinion in Toxicology.* **28**, 2021, 38-42

[105] MEYER E. Atomic force microscopy. *Progress in Surface Science.* **41**(1), 1992, 3-49

[106] GUEN E., KLAPETEK P., PUTTOCK R., HAY B., ALLARD A., MAXWELL T., CHAPUIS P.O., RENAHY D., DAVEE G., VALTR M., MARTINEK J., KAZAKOVA O., GOMES S. SThM-based local thermomechanical analysis: Measurement intercomparison and uncertainty analysis. *International Journal of Thermal Sciences.* **156**, 2020, 106502

[107] CHEN H., CHEN H., NAN S., LIU H., CHEN L., YU L. Investigation of Microplastics in Digestion System: Effect on Surface Microstructures and Probiotics. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* **109**, 2022, 882-892

[108] KING W.P., SAXENA S., NELSON B.A., WEEKS B.L., PITCHIMANI R. Nanoscale Thermal Analysis of an Energetic Material. *Nano Letters.* **6**(9), 2006, 2145-2149

[109] CORRADINI F., BARTHOLOMEUS H., LWANGA E.H., GERTSEN H., GEISSEN V. Predicting soil microplastic concentration using vis-NIR spectroscopy. *Science of The Total Environment.* **650**, 2019, 922-932

[110] AL-AZZAWI M.S.M., KEFER S., EIßER J., REICHEL J., SCHWALLER C., GLAS K., KNOOP O., DREWES J.E. Validation of Sample Preparation Methods for

Microplastics Analysis in Wastewater Matrices – Reproducibility and Standardization. *Water*. **12**(9), 2020, 2445