

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Analýza mikroplastů v pivu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:

Jakub Koza

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí práce:

doc. Ing. David Milde, Ph.D.

2024 Olomouc

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Jakub Koza

Název práce: Analýza mikroplastů v pivu

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: doc. Ing. David Milde, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2024

Anotace:

Tato bakalářská práce se zaměřuje na analýzu mikroplastů ve vzorcích piva. Hlavním cílem práce je identifikace a kvantifikace mikroplastů zachycených na filtru po jejich separaci z pivních vzorků. Pro tuto identifikaci a kvantifikaci byl použit Ramanův mikroskop a FT-IR mikroskop. Byly nalezeny jednotky částic v jednotlivých vzorcích piva, které byly jednoznačně identifikovány jako polymerní částice. Dále bylo zaznamenáno větší množství vláken různých barev, které nebylo možné s dostatečnou shodou identifikovat. V závěru práce jsou obě metody porovnány z hlediska kvality výsledků, rychlosti měření a možnosti automatizace.

Klíčová slova: plasty, mikroplasty, pivo, infračervená spektroskopie, Ramanova spektroskopie

Počet stran: 44

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Jakub Koza

Title: Analysis of Microplastics in Beer

Type of thesis: bachelor's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: doc. Ing. David Milde, Ph.D.

The year of submission: 2024

Annotation:

This bachelor's thesis focuses on the analysis of microplastics in beer samples. The main objective of the study is the identification and quantification of microplastics captured on the filter after their separation from beer samples. For this identification and quantification, a Raman microscope and FT-IR microscope were utilized. Particle units were found in individual beer samples, which were clearly identified as polymeric particles. Additionally, a larger quantity of fibers of various colors was observed, which could not be identified with sufficient consistency. In conclusion, both methods are compared in terms of result quality, measurement speed, and automation potential.

Key words: plastics, microplastics, beer, Infrared spectroscopy, Raman spectroscopy

Number of page: 44

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlášení:

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

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouc dne:

.....

Podpis

Poděkování:

Děkuji panu doc. Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, za jeho cenné rady a trpělivost. Dále děkuji paní RNDr. Pavle Kučerové, Ph.D. za ochotu a spolupráci při měření velikosti částic. Poděkování také náleží mé rodině za jejich podporu během celého mého studia.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Teoretická část	2
2.1. Plasty a mikroplasty	2
2.1.1. Vlastnosti plastů	2
2.1.2. Význam a využití plastických hmot	3
2.1.3. Osud plastů	3
2.1.4. Dělení mikroplastů	5
2.1.5. Globální problém.....	6
2.1.6. Zdravotní rizika pro živé organismy	7
2.1.7. Úplná destrukce mikroplastů	8
2.2. Výskyt mikroplastů v potravinách	9
2.2.1. Nápoje.....	9
2.2.2. Mořské ryby a mořští živočichové	11
2.2.3. Mořské řasy	11
2.3. Pivo	12
2.3.1. Výrobní proces piva	13
2.3.2. Konzumace piva ve světě	13
2.4. Analýza mikroplastů	14
2.4.1. Příprava kapalných vzorků	14
2.4.2. Mikroskopická identifikace	15
2.4.3. Infračervená spektrometrie	16
2.4.4. Ramanova spektrometrie	18
2.4.5. Plynová chromatografie.....	19
2.4.6. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	20
3. Experimentální část.....	21
3.1. Pomůcky.....	21
3.2. Chemikálie	21
3.3. Přístrojové vybavení.....	21

3.4. Vzorky.....	21
3.5. Pracovní postup.....	22
3.5.1. Separace mikroplastů.....	22
3.5.2. Přídavek standardu mikroplastů	22
3.5.2. Nastavení podmínek měření	22
3.5.3. Identifikace Ramanovým mikroskopem.....	23
3.5.4. Identifikace FT-IR mikroskopem	23
4. Výsledky a diskuse	25
4.1. Porovnání typu filtru	25
4.2. Standardní přídavek mikroplastů	25
4.3. Identifikace mikroplastů.....	26
4.3.1. Slepý pokus	26
4.3.2. Ramanova mikroskopie	29
4.3.3. FT-IR mikroskop	32
5. Závěr	36
6. Seznam literatury	38

Seznam použitých zkratk

μ -FTIR	infračervený mikroskop s Fourierovou transformací
ACI	adaptivní chemické zobrazování
ATR	zeslabený úplný odraz
DSC	diferenční skenovací kalorimetr
EDX	energiově-disperzní rentgenový analyzátor
FPA	Focal Plane array (plošný detektor)
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
ICP	indukčně vázané plazma
IR	infračervená oblast
MCT	telurid rtuťnokademnatý
MPs	mikroplasty
MS	hmotnosti spektrometrie
m/z	poměr hmotnosti ku náboji
NIR	blízké infračervené záření
OMs	optický mikroskop
OSN	Organizace spojených národů
PC	polykarbonát
PE	polyethylen
PES	polyester
PET	polyethyltereftalát
PP	polypropylen
PS	polystyren

Pyro	pyrolýza
SD	směrodatná odchylka
SEM	rastrovací elektronový mikroskop
TGA	termogravimetrická analýza
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné světlo

1. Úvod

Polymerní materiály jsou neodmyslitelnou součástí našeho každodenního života. Pro jejich skvělou chemickou, mechanickou odolnost a nízkou výrobní cenu pronikly do celého světa. Většina z nás si nedokáže představit den, kdyby se nepotkala s jediným plastovým výrobkem. Avšak s rychlým rozvojem využívání plastů přišla i stinná stránka – globální plastová krize

Již není možné nad problémem plastů jen mávnout rukou. Právě díky jejich odolnosti a masové produkci se po jejich použití objevují na většině naší planety jako odpad. Zaplňují skládky, objevují se v lesích, pouštích a kvůli své nízké hustotě plavou na hladině řek, a především vytvářejí ostrovy gigantických rozměrů v oceánech. Jejich degradace probíhá nesmírně pomalu a dochází pouze k jejich zkracování na velikosti mikro, či nanoplastů. V takto malém měřítku se dostávají do potravního řetězce nejen zvířat, ale i lidí. Mikroplasty byly již nalezeny opravdu všude. Počínaje orgány ryb, přes pitnou vodu až po lidské krevní řečiště a mateřské mléko. [1–4] Zatím možná neznáme dopady mikroplastů na naše zdraví, ale s jejich akumulací v lidském organismu může dojít k nejrůznějším nežádoucím účinkům.

Tato bakalářská práce je zaměřena na analýzu mikroplastů v pivu pomocí Ramanovi a FT-IR mikroskopie. Hlavním cílem této práce je separace mikroplastů ze vzorků piva. Jejich následná identifikace a kvantifikace v těchto vzorcích za pomoci obou metod. Dále se zabývá porovnáním těchto metod z hlediska kvality naměřených výsledků, rychlosti a automatizaci měření.

2. Teoretická část

2.1. Plasty a mikroplasty

Plasty jsou makromolekulární látky. Makromolekuly jsou polymery, složené z mnoha malých molekul nazývaných monomery. Existenci makromolekul poprvé prokázal a popsal německý chemik Hermann Staudinger v 20. letech 20. století. Reakce, při které vznikají polymery z monomerů, se nazývá polymerace. [5]

Vlastnosti finálního plastu závisí na typu polymerační metody, podmínkách polymeračního procesu, typu monomerů a katalyzátoru. Jednou z metod polymerace je polykondenzace, při níž se postupně spojují monomery v dimery, trimery, vyšší oligomery, až nakonec vznikne polymer. Vedlejším produktem této reakce je obvykle voda, ale může také vzniknout kyselina chlorovodíková, chlorid sodný nebo methanol. Další metodou přípravy polymerů je polyadice, při této reakci nevznikají žádné vedlejší produkty. Monomery obsahující dvě funkční skupiny reagují, a během reakce se tyto skupiny spojí za přesmyku vodíku. [6]

Mikroplasty jsou malé fragmenty plastů, které vznikají rozkladem plastů pod vlivem fyzikálních, chemických, mechanických a biologických procesů. Tyto mikroskopické plasty jsou všudypřítomné a byla prokázána jejich přítomnost na velké části naší planety. Do životního prostředí jsou neustále přidávány další a další mikroplasty. Kvůli jejich dlouhé životnosti a téměř nemožné rozložitelnosti byly vyhlášeny jako celosvětový kontaminant, který může potenciálně ohrozit lidské zdraví. [7]

2.1.1. Vlastnosti plastů

Nejdůležitější vlastností, proč se plasty staly nepostradatelnými v našich životech je možnost libovolného tvarování v měkkém stavu a následné zatuhnutí v daném tvaru. Obrovskou výhodou plastů jsou také jejich nízké pořizovací náklady. Jsou nepropustné pro vodu, což našlo nejedno využití. Disponují také vysokou chemickou odolností vůči působení dlouhé škály chemikálií. Další důležitá vlastnost je tepelná odolnost a odolnost vůči světlu. [8]

Vlastnosti plastů lze ovlivnit přidáním různých látek do jejich struktury, což umožňuje výrobu plastů s téměř jakoukoliv požadovanou vlastností. Jedním z takových aditiv jsou brómované látky, které slouží jako zpomalovače hoření. Dále se přidávají ftaláty pro změkčení, nonylfenol jako antioxidant nebo bisfenol A jako přídavný monomer v polykarbonátových a epoxidových pryskyřicích. Do plastů mohou být také přidávány látky,

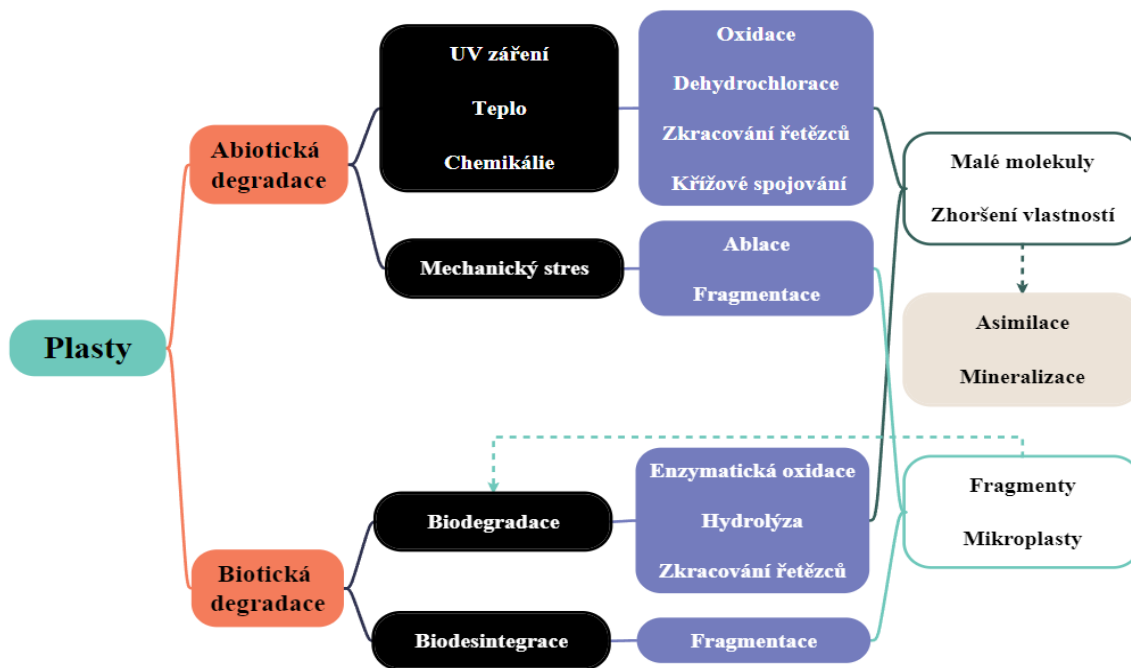
kteře zlepšují estetický vzhled, jako jsou barviva nebo leštidla. I když tato aditiva vylepšují vlastnosti plastů, uvolňování těchto látek do životního prostředí probíhá rychle, a mnoho z nich má vysokou toxicitu pro vodní živočichy. [9]

2.1.2. Význam a využití plastických hmot

Plasty představují širokou třídu materiálů, jako jsou například polystyren (PS), polykarbonát (PC), polyethyltereftalát (PET), polyester (PES), polypropylen (PP) nebo polyethylen (PE). Nejstarší plastové materiály, jako byl bakelit nebo celuloid, byly poprvé připraveny před více než jedním stoletím. Od té doby prošly obrovským vývojem a staly se nenahraditelnou součástí našich životů. Dnes najdeme plasty v nepřehledném množství produktů. S rostoucí populací bude spotřeba a množství vyrobených plastů i nadále stoupat. Proto bude potřeba zavést zákazy a tvrdé limity týkající se využívání plastů v celé řadě produktů. [10]

2.1.3. Osud plastů

Výrobky obsahující plast se po jejich využití stávají odpadem. Některé, jako jsou například sáčky na potraviny, jsou používány pouze jednou, zatímco jiné, například ve stavebnictví, slouží po desetiletí. I přes vynaložené úsilí je pouze asi 9 % - 30 % plastových výrobků skutečně recyklováno. Zbývající plasty, kvůli své nízké hmotnosti, se dostávají do životního prostředí prostřednictvím větru nebo vodních toků. Takto se plasty hromadí na pevnině, ale zejména v oceánech, kde dochází k jejich postupné degradaci. Plastové výrobky jsou extrémně odolné vůči degradaci. Odhaduje se, že jejich životnost může být stovky až tisíce let. Pod vlivem okolních podmínek postupně dochází k proměně jejich polymerní struktury a vlastností, což vede k tvorbě mikroplastů. [11] Obecný přehled možných degračních procesů plastů je vyobrazen na obr. 1.



Obrázek 1: Obecné schéma degradace plastů, převzato a upraveno z [11]

V závislosti na povaze vlivů, kterými byla degradace vyvolána, můžeme dělit např. na fotooxidační degradaci, tepelnou degradaci, chemicky katalyzovanou degradaci, mechanickou degradaci a biodegradaci.

Fotooxidace je proces rozkladu plastů působením světla. Polymery jsou převážně náchylné k degradaci způsobené ultrafialovým (UV) zářením a viditelným světlem (VIS). K degradaci dochází v éterových měkkých částech, kde záření vytváří esterové, aldehydové nebo propylové skupiny. UV záření má dostatečnou energii k rozštěpení vazby mezi uhlíky. U různých plastů dochází k maximální degradaci při různých vlnových délkách UV záření, například u PE je to 300 nm, nebo u PP přibližně 370 nm. Fotooxidací dochází především ke změně fyzikálních a optických vlastností, včetně žloutnutí plastů. [12]

Tepelná degradace je podobná fotooxidaci. Hlavním rozdílem je, že fotooxidace působí na povrch plastu, ale tepelná degradace probíhá zároveň v celém objemu plastu. Degradace polymerů probíhá náhodně a řetězově. Na rozdíl od fotooxidace nemusí být iniciována na konci makromolekuly, místo toho se může štěpit kdekoli v struktuře polymeru.

Chemicky katalyzovaná degradace využívá katalyzátoru ke snížení teploty rozkladu při pyrolýze, zlepšuje kvalitu produktu a umožňuje dosáhnout selektivity k určitému produktu. Kyselé katalyzátory, jako jsou například zeolity, upřednostňují reakce, při kterých

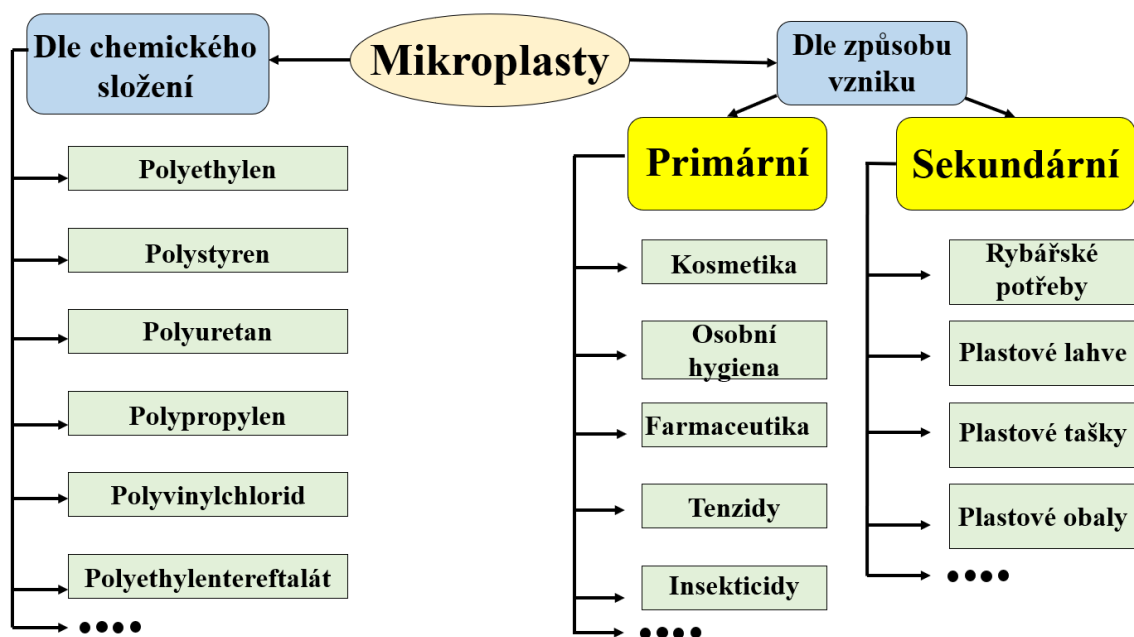
dochází k přesunu vodíku díky přítomnosti mnoha kyselých míst. Tato degradace se využívá především při získávání uhlovodíků z odpadních polymerů. Polyolefiny, jako jsou například PE, PP a PS, se touto katalytickou degradací rozkládají na plyny a oleje s vyšší komerční hodnotou než původní odpadní polymery. [12]

Mechanická degradace je založena na namáhání plastové hmoty v ohybu, tahu nebo smyku. Následkem tohoto namáhání je fragmentace plastu na menší částice. Zmenšování velikosti plastů může být způsobem jeho ablace. Ablace je proces při, kterém dochází k odpařování hmoty v důsledku povětrnostních podmínek. [11]

V posledních letech se objevují možnosti degradace plastů biologickou cestou. Plasty mohou být biodegradabilní, což znamená, že jsou rozložitelné působením mikroorganismů. Také hovoříme o biologické rozložitelnosti plastů, tato možnost je však omezena pouze na určité typy plastů, které jsou již ze své podstaty biologicky rozložitelné. Například PE je biodegradabilní díky obsahu uhlíku a zásobě energie pomocí půdních mikroorganismů. Bohužel v tomto případě jsou mikroorganismy schopny rozkládat pouze menší fragmenty. Biologicky rozložitelné plasty jsou především bioplasty, které jsou vyrobené z biomasy. [13]

2.1.4. Dělení mikroplastů

Termín mikroplasty nevyjadřuje žádný konkrétní druh plastů. Nejedná se o PE nebo PS. Místo toho je vztažen k velikosti částic jakéhokoli druhu plastů. Mikroplasty jsou nejčastěji definovány jako velmi malé kousky plastů o velikosti menší než 5 mm. Studium mikroplastů začalo počátkem 21. století, kdy oceánograf Charles Moore poprvé objevil Velkou tichomořskou odpadkovou skvrnu. Zjistil, že se většina odpadků skládá z malých kousků plastů, a tím odstartovalo zkoumání mikroplastů vědci po celém světě. Obecně se mikroplasty řadí do dvou kategorií: primární a sekundární. [14] Schématický přehled dělení mikroplastů podle chemického složení a podle způsobu vzniku je vyobrazen na obr. 2.



Obrázek 2: Schéma dělení mikroplastů dle vzniku a chemického složení, převzato a upraveno z [15]

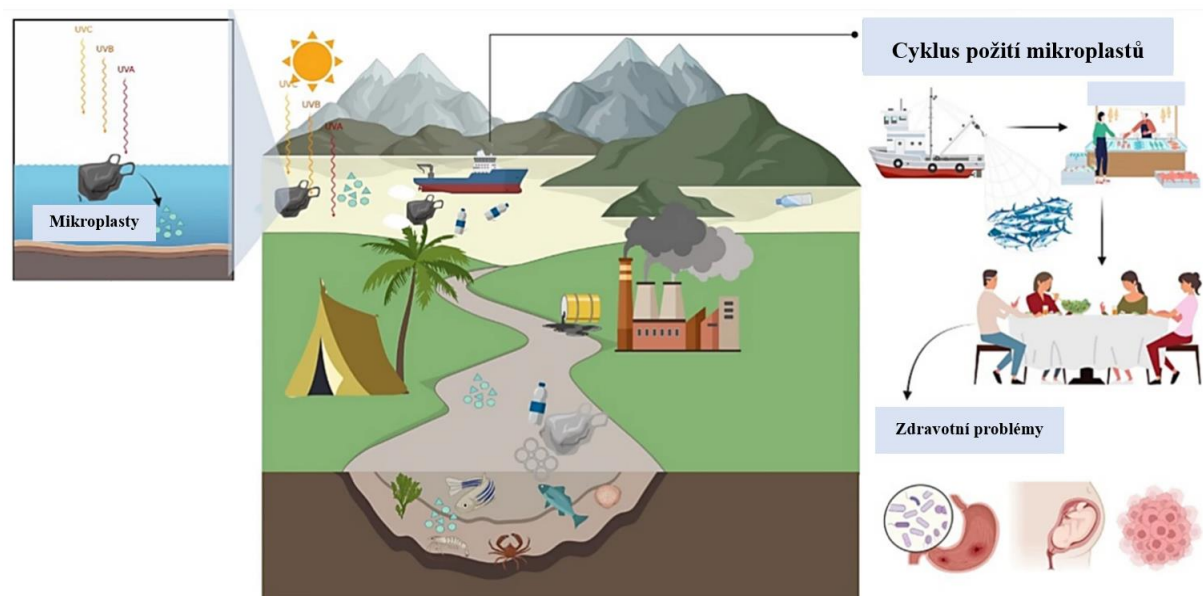
Dělení je založeno na způsobu, jakým mikroplasty vznikají. Primární mikroplasty jsou částice o velikosti menší než 5 mm, které byly záměrně vytvořeny z komerčních důvodů. Většina primárních mikroplastů je určena pro kosmetické nebo průmyslové účely. Udává se, že 15 % až 31 % všech plastů nalezených v oceánech jsou primární mikroplasty. Sekundární mikroplasty jsou částice vznikající rozpadem větších kusů plastů. Nejčastěji vznikají fotodegradací na slunci nebo erozní činností, jako je působení větru nebo vlnobití. Sekundární mikroplasty se uvolňují z degradujícího se povrchu plastových výrobků, jako jsou například láhve, brčka nebo rybářské potřeby. [15]

2.1.5. Globální problém

Celosvětová roční spotřeba plastů je v dnešní době více než 320 milionů tun. Velká část vyrobených plastů se velmi rychle mění v odpad. Značné množství se poté uvolňuje do oceánu, kde vytvářejí odpadkové ostrovy. Největší ostrov z odpadků je již dříve zmíněná Velká tichomořská odpadková skvrna. Plasty jsou také vyváženy do volné přírody, kde mohou ohrožovat místní biodiverzitu. Takto vyhozené plasty mají ideální podmínky k degradaci na mikroplasty. [16]

Znečištění mikroplasty se stává globálním problémem. Když mikroplasty uvolňované v přírodě přijdou do kontaktu se živými organismy, ohrožují jejich zdraví prostřednictvím oxidativního stresu, poškození nervů, narušení endokrinní soustavy, poškození imunity a dalších mechanismů. Dále může v životním prostředí docházet k

interakcím mikroplastů s perzistentními organickými látkami, což má mnoho škodlivých účinků na organismy. Přímé ohrožení se týká celého lidstva, protože se mikroplasty dostávají potravním řetězcem až do našeho organismu. [17] Cyklus cesty mikroplastů do lidského organismu je znázorněn na obr. 3.



Obrázek 3: Cesta mikroplastů do lidského organismu, převzato a upraveno z [15]

2.1.6. Zdravotní rizika pro živé organismy

Díky svým mikroskopickým rozměrům jsou mikroplasty velmi snadno pozřeny vodními a dalšími malými živočichy. To může být pro tyto organismy velmi nebezpečné až smrtící. Nebezpečí spojené s požitím mikroplastů nezpůsobuje pouze samotný materiál, ale i schopnost mikroplastů absorbovat a koncentrovat v sobě jiné toxické látky. Bylo prokázáno, že mikroplasty spojené s těmito kontaminanty mohou snížit imunitní funkci a vyvolat rakovinu mořských organismů. Také je zaznamenán úbytek váhy a energetických zásob malých živočichů po pravidelném požívání mikroplastů. Zpomalený vývoj u jedince snižuje dravost a reprodukční schopnost. [18]

Také jsou zmapovány některé účinky mikroplastů na další velmi důležité procesy v organismu. Například snížení produkce hormonů pomocí endokrinních žláz u živočichů nebo sníženou schopnost fotosyntézy u mořských řas. Z důvodu časové náročnosti sledování účinků na jiné než mořské organismy a malého množství zachycených případů zatím nejsou zaznamenány všechny negativní účinky mikroplastů na jiné živočichy nebo na člověka. [19]

I přes neznámé riziko mikroplastů na lidský organismu, jejich výskyt identifikovaly některé studie v krevním řečišti. Jejich přítomnost v krvi naznačuje, že expozice plastových mikročástic v některých částech organismu, jako jsou žlučové cesty nebo ledviny, vede k jejich absorpci do krevního řečiště. Není známa rychlost absorpce a míra usazování v daném orgánu, proto nelze uvažovat žádné reálné absorpční modely. [1]

Mikroplasty jsou problémem i pro těhotné ženy a novorozence. V období těhotenství mohou přijímat tyto částice stejným způsobem jako ostatní lidé. A způsobem, který byl popsán dříve, se mikroplasty dostanou do krevního řečiště a dále pokračují do mateřského mléka. Touto cestou se, kromě plastových hraček nebo lahví na pití, se mohou dostat do organismu novorozence. Stejně jako nejsou známy žádné nežádoucí účinky na lidský organismus, tak nejsou známy ani účinky na organismus novorozence. Ale můžeme očekávat, že pro takto ohroženou skupinu, mohou být daleko nebezpečnější. [2]

2.1.7. Úplná destrukce mikroplastů

Mikroplasty podléhají v přírodě postupné, ale velmi pomalé degradaci. Výsledkem jejich přirozeného rozpadu, působením stejných vlivů jako bylo popsáno výše při degradaci plastů, jsou nanoplasty. Jedná se o částice obecně vnímané jako pozůstatky plastů s velikostí nižší než 1 μm . Jejich vliv na živé organismy není zatím sledován, ale už ze své podstaty mají větší potenciál vyvolání zdravotních problémů než mikroplasty. Analýza a nebezpečí spojené s nanoplasty jsou v současnosti předmětem mnoha výzkumů. [20]

Kvůli potenciálním problémům s nanoplasty jsou vyvíjeny jiné metody pro úplný rozklad mikroplastů. Základem těchto metod je například využití uhlíku v jejich struktuře jako potravy pro mikroby. Pro mikrobiální rozklad na menší molekuly se mohou využívat bakterie, houby, řasy či prvoci. Proces rozkladu pomocí mikrobů je komplexní a dělí se na tři základní kroky, jako je abiotická nebo biotická destrukce, fragmentace a finální mineralizace, při které vznikají základní anorganické sloučeniny, jako je voda, vodík nebo oxid uhličitý. Tento proces je účinný, ale pomalý a nelze jej kontrolovat. Proto je neustále snaha vyvinout jinak katalyzovaný rozklad mikroplastů, který by byl rychlý, levný a kontrolovatelný. [21]

Z důvodu problematiky týkající se vysoké odolnosti klasických polymerů se v posledních letech začali více vyrábět biodegradovatelné plasty. Takové plasty mohou být vyrobené z obnovitelných zdrojů jako je škrob a polyhydroxyalkanoát, nebo z biologicky odbouratelných syntetických polymerů jako jsou polyestery vyrobené z ropy. Nejjednodušší

způsob pro destrukci takových polymerů je enzymatická nebo neenzymatická hydrolýza. Řízená hydrolýza je předvídatelná reakce, kde lze předpovídat životnost plastu. V životním prostředí přesné zákony neexistují, proto nelze přesně předpovídat, jak dlouho plast vydrží, než se rozloží. Avšak důležité je, že životnost biodegradovatelného polymeru je mnohonásobně kratší než klasického polymeru. [22]

2.2. Výskyt mikroplastů v potravinách

Mikroplasty jsou přítomny na celé naší planetě, na souši, ve sladkovodní i mořské vodě. Jejich přítomnost byla identifikována v nepřeberném množství potravy a pitné vody. Mikroplasty jsou nejprve pozřeny planktonickými organismy v oceánech, odkud postupně stoupají potravním řetězcem až do potravy určené pro lidskou spotřebu. Do lidské potravy se mohou dostat také při výrobě samotného jídla z obalového materiálu, ze strojů nebo textilií. Z výzkumů se odhaduje, že člověk zkonzumuje asi 5 g plastů týdně. [23]

2.2.1. Nápoje

V posledních letech byla vědci prokázána přítomnost mikroplastů ve vodě pocházející z různých zdrojů. Plastové kontaminanty byly nalezeny v podzemní, povrchové nebo odsolené vodě, a to i v balené vodě, a to i v té, jejíž obal byl ze skla či kartónu. Nezávadná pitná voda je jedním ze základních priorit udržitelného rozvoje OSN. Proto rostou obavy z možných nežádoucích účinků na lidský organismus po pravidelném požívání pitné vody obsahující mikroplasty. [24]

Studie zaměřující se na obsah mikroplastů v tureckých nealkoholických nápojích prokázala jejich přítomnost ve všech zkoumaných značkách nápojů. Z analyzovaného obsahu kontaminantů je zřejmé, že z každého vypitého litru těchto nápojů přijme člověk do organismu přibližně 9 částic. Největší znečištění bylo zjištěno v nápojích balených v obalech Tetra Pak a PET. [25] Výsledky některých studií zaměřených na kontaminaci pitné vody a jiných nápojů byly shrnuty do tab. I.

Tabulka I.: Výsledky studií zaměřující se na obsah mikroplastů v nápojích

Nápoj	Země	Obal	Výsledky [MPs ± SD]	Zdroj
Nealkoholický nápoj	Mexiko	PET	7 ± 3,21	[26]
Nealkoholický nápoj	Ekvádor	PET, Tetra Pak	32	[27]
Minerální voda	Irán	PET	8,5 ± 10,2	[28]
Minerální voda	Německo	PET	14	[29]
Minerální voda	Německo	PET, Sklo	2 649 ± 2 857 (PET) 6 292 ± 10,521 (sklo)	[30]
Nealkoholický nápoj	Turecko	PET, Tetra Pak	8,9 ± 2,95	[25]
Pivo	Čína	Sklo	42 444	[31]
Pivo	Ekvádor	Sklo	496	[27]

2.2.2. Mořské ryby a mořští živočichové

V průběhu let bylo zdokumentováno pozření mikroplastů u více než 700 mořských živočichů. Mnoho studií dokázalo přítomnost mikroplastů ve vnitřních orgánech trávicí soustavy ryb, korýšů, želv, mořských ptáků, velryb a delfínů. Konkrétně u ryb byly identifikovány polymerní kontaminanty od jedinců žijících ve sladkých vodách, mělkých i hlubokých mořských vodách. Výskyt těchto částic neovlivňuje ani způsob chovu, tedy jestli žily ve volné přírodě nebo byly chováni v sádkách. [4]

Mikroplasty mohou vypadat jako potrava ryb, takže jsou velmi jednoduše pozřeny. V organismu působí mechanickým poškozením a jinými negativními účinky, které byly uváděny již dříve. U dravých druhů může docházet k trofickému přenosu, kdy dochází k pozření kontaminované kořisti. Zasažena není jen trávicí soustava ryb, ale i žábry. Jelikož se jedná o důležitý dýchací orgán, je schopen jednoduše akumulovat mikroplasty, a v extrémním případě může dojít k znemožnění dýchání, což vede k úhynu. [32]

Jako další cesta expozice člověka mikroplastům je konzumace mořských plodů. Celosvětová roční spotřeba mořských plodů na obyvatele je více než 20 kg. Většina zkonsumovaného množství je sice chována v akvakultuře, kde mohou být podmínky regulovány, ale i zde dochází ke kontaminaci. Hlavní výhodou akvakultury oproti volné přírodě je kratší život organismu v kontaminované vodě než v případě ulovených jedinců. To má za důsledek nižší koncentraci mikroplastů v uměle chovaných mořských plodech. [33]

2.2.3. Mořské řasy

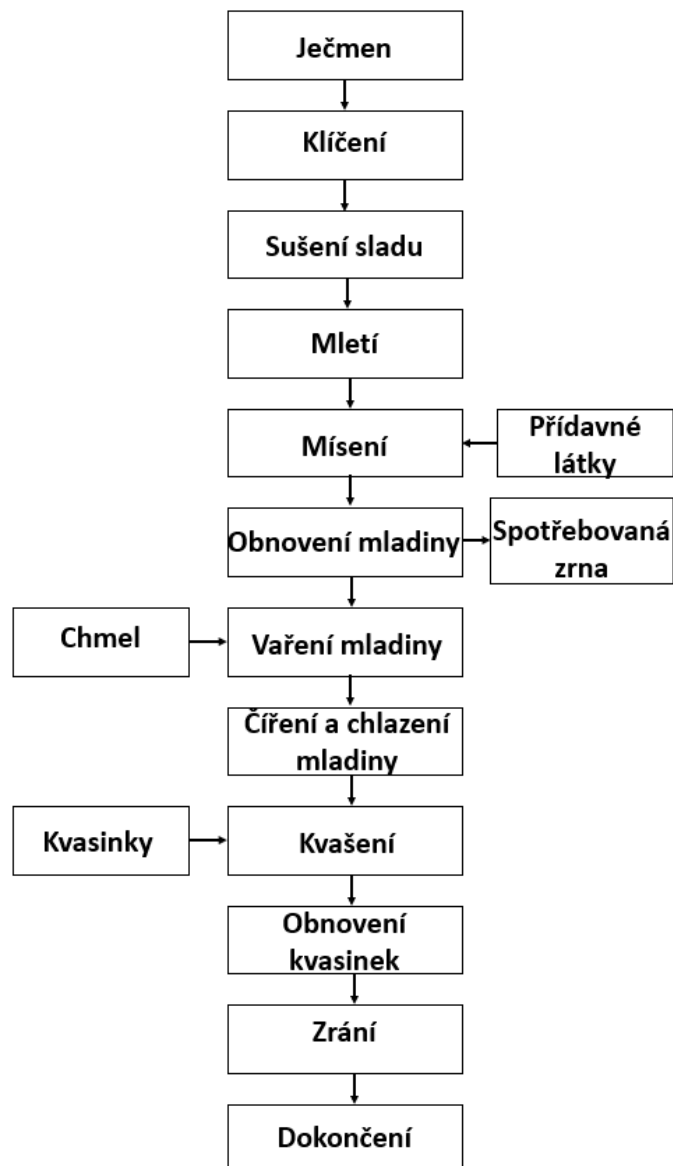
Během svého pobytu v mořské vodě se mohou mikroplasty spojovat s jinými mikroorganismy či fytoplanktonem a tvořit biofilm o vyšší hustotě. Díky této změně ve vlastnostech dochází k usazování mikroplastů na mořské dno, kde mohou usadat a spojovat se s mořskými řasami. Tyto řasy jsou potravou jiných druhů živočichů, ke kterým se doposud nemusely mikroplasty dostat. Mimo jiné se jedná i o řasu *Pyropia tenera*, také známou pod názvem nori, která je důležitou součástí potravního řetězce obyvatel nejen v Asii, ale i po celém světě. [34]

Problém nastává i u pro člověka nedůležitých řas, které poskytují útočiště nebo potravu pro velkou komunitu přidružených organismů. Celá taková komunita může být kontaminována. U řas se složitou morfologií sledujeme účinné zachytávání mikroplastů, což snižuje jejich hydrodynamické síly a urychluje sedimentaci a následný úhyn rostliny. Také

bylo pozorováno, že nanoplasty se mohou vázat k celulóze na povrchu řas pomocí elektrostatických sil. To má za důsledek ohrožení dalších živočichů nebo vyřazení takto znehodnocené rostliny ze svého pravidelného potravního řetězce. [35]

2.3. Pivo

Pivo se řadí mezi nejoblíbenější alkoholické nápoje po celém světě. První záznamy o výrobě jsou více než 10 000 let staré. Svou oblibu získalo díky své nízké ceně a snadné výrobě, jelikož se jedná o kvašený alkoholický nápoj vyráběný z vody, chmele a sladu pomocí kvasinek. [36] Proces výroby piva je schematicky znázorněn na obr. 4.



2.3.1. Výrobní proces piva

Existuje nespočet typů piva, které jsou rozdílné svou barvou, chutí, základem nebo obsahem alkoholu. K přípravě různých druhů piv se ve výrobním procesu mohou měnit vstupní suroviny, teplota nebo typ a délka kvašení. Podle typu použitých kvasnic a teplotě při kvašení můžeme piva dělit na tři základní druhy. Ty nazýváme svrchně kvašené, spodně kvašené a přirozeně kvašené. Výrobní proces konkrétně svrchně kvašeného piva je popsána dále. [38]

První klíčovou fází výroby piva je příprava mladiny. Tento sterilní roztok vody vzniká několika kroky zpracováním sladu a chmele. Slad je nejprve rozdrcen na šrot, aby byla maximalizována extrakce aromatických látek. Získaný šrot se následně smísí s vodou a zahřeje na specifickou teplotu, čímž dojde k rozštěpení dusíkatých látek díky proteolytickým enzymům. Proces rmutování, při němž se při teplotě 60-80 °C štěpí škrob enzymy na zkvasitelné cukry (zejména glukózu, maltózu a dextrin), následuje po těchto krocích. Mladina je poté filtrována, aby byla oddělena od zbytku sladu. V dalším kroku je mladina vařena s chmelem, čímž se dosáhne typické hořkosti, aromatu a chuti piva. V závěrečné fázi je mladina ochlazená a vyčištěna od sedimentovaných částic chmelu. [39]

Mladina, ochlazená na 5-6 °C, je ponechána ve spilkách ke kvašení pomocí várečných kvasnic. Během tohoto procesu dochází k uvolňování oxidu uhličitého a tepla, a proto jsou spilky konstantně chlazeny, aby nedošlo k přehřátí nad 10 °C. Při hlavním kvašení se pivo provzdušňuje. Nakonec jsou kvasinky nechány sedimentovat, aby mohly být po promytí znovu použity. Pivo se pak odebere k dokvašování, které probíhá v ležáckých sklepích po dobu minimálně 21 dní. Během tohoto procesu je pivo syceno vznikajícím oxidem uhličitým, ztrácí nadbytečnou hořkost a získává charakteristickou chuť a trvanlivost. Posledním krokem je filtrace skrze křemelinový a stabilizační filtr k odstranění nežádoucích látek a zakalení. Před stáčením je pivo naředěno vodou a nasyceno oxidem uhličitým, aby získalo svou finální podobu. [40]

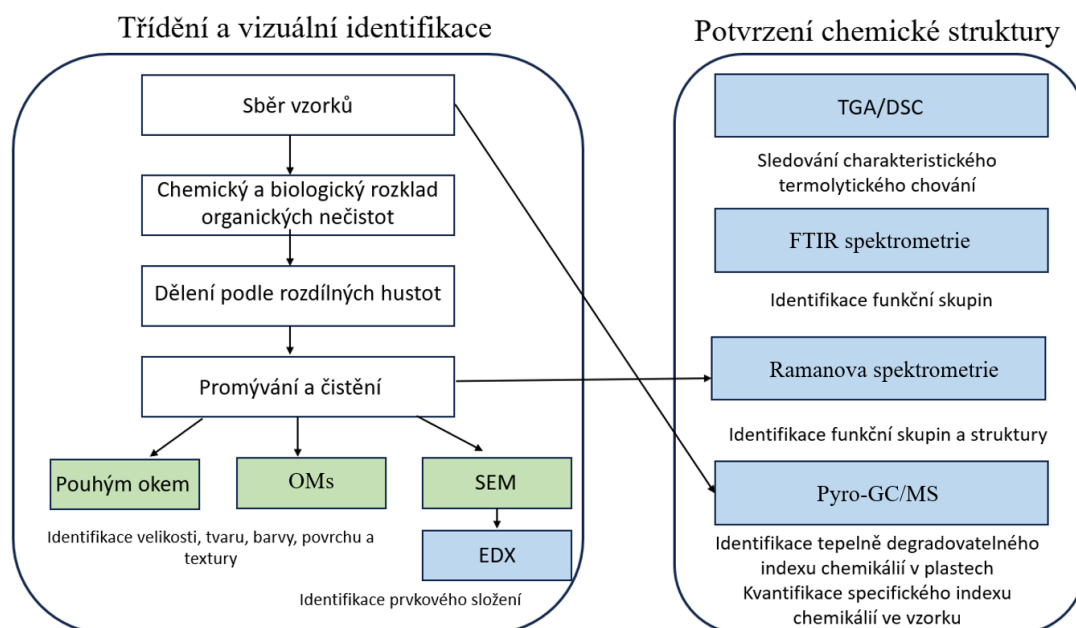
2.3.2. Konzumace piva ve světě

Pivo se stalo nejčastěji konzumovaným alkoholickým nápojem po celém světě. Během posledních 50 let došlo k neustálému globálnímu růstu spotřeby. Paradoxně v zemích, kde bylo pivo tradičně oblíbené, jako jsou Británie, Německo a Belgie, dochází k poklesu spotřeby v posledních letech. Naopak v zemích, kde dříve převažoval jiný typ alkoholických nápojů, jako je Rusko, Španělsko nebo Itálie, se spotřeba piva výrazně zvyšuje. [41]

V roce 2020 dosáhla nejvyšší celkové roční spotřeby piva Čína, přesahující 36 milionů litrů. Na druhém místě byly Spojené státy americké s objemem přes 24 milionů litrů. Nicméně, při uvážení spotřeby piva na jednu osobu, dochází k výrazné změně pořadí. V této kategorii měla nejvyšší spotřebu piva na jednu osobu Česká republika, dosahující 187,7 litrů v roce 2020. Na druhém místě se s výrazným odstupem umístilo Rakousko se 96,9 litry piva na osobu. [42]

2.4. Analýza mikroplastů

Analýza výskytu polymerů ve vzorku je, díky různým vlastnostem daným jejich molekulovou hmotností, složením a polydispersitou, velmi komplexní úkol. V přírodní matrici je velký problém rozlišit mikroplasty od jiných přírodních vláken nebo částic. I přes nedostatek standardizovaných protokolů a standardů pro zajištění kvality existuje celá řada možností, jak mikroplasty identifikovat a kvantifikovat. [43] Možný postup při identifikaci mikroplastů je vyobrazen na obr. 5.



Obrázek 5: Schéma možného dělení a analýzy jednotlivých mikroplastů, převzato a upraveno z [44]

2.4.1. Příprava kapalných vzorků

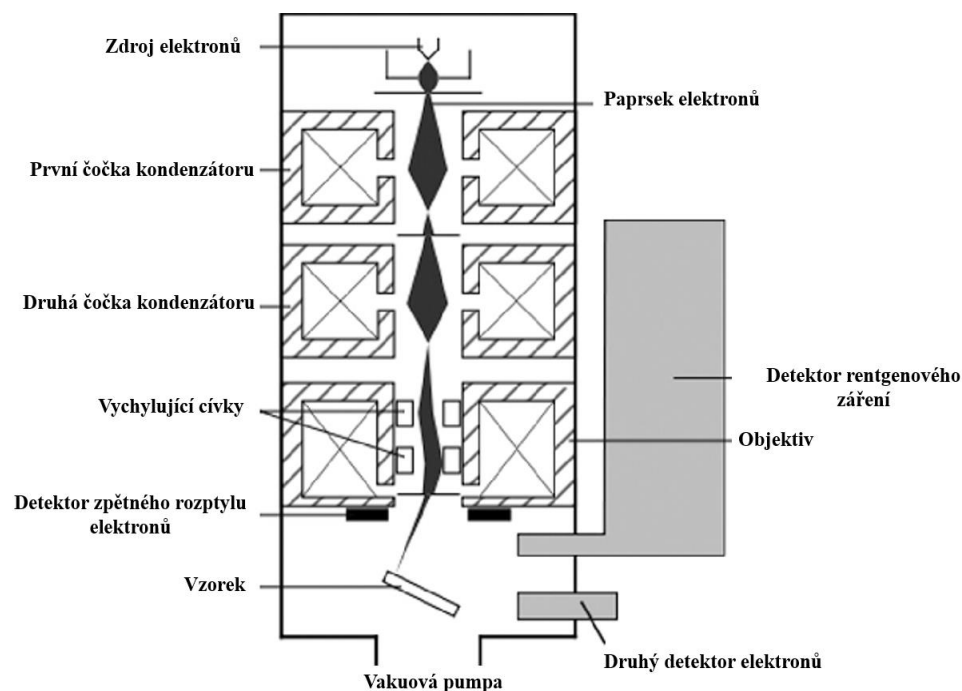
V současnosti se stále více setkáváme s problémem nestandardizovaných postupů pro odběr kapalných vzorků určených k analýze obsahů mikroplastů. Mnoho studií bylo prováděno vědci z různých oborů, což často vedlo k nedostatečné dokumentaci analytických metod a

nedostatku postupů pro řízení kvality a kontroly kvality. Mezi základními směry pro zachování kvality studie patří stanovení odpovídajícího objemu vzorku k dosažení dostatečného počtu částic. Dále je důležité eliminovat kontaminaci při odběru, přípravě a analýze vzorku. Jelikož i destilovaná voda obsahuje mikroplasty je třeba ji přefiltrovat. [3]

Zachycování částic může probíhat přímo na místě odběru pomocí nasazení filtru na přívod vody. Celý filtr, včetně uchycení a sběrné nádoby, musí být vyroben z materiálu odlišného od plastu. Výhodou tohoto postupu je možnost odebrat libovolné množství vzorku podle potřeby, ale hlavní nevýhodou je přítomnost velkého množství jiných částic. Alternativně lze odebrat vzorek vody do nádoby neobsahující plast a filtraci provést až v laboratoři. Výhodou tohoto postupu je schopnost odstranit ostatní částice pomocí povrchově aktivních látek. Nevýhodou je omezené množství filtrovatelné kapaliny a možnost kontaminace vzorku nesprávnou manipulací. Mikroplasty zachycené na filtru lze následně analyzovat pomocí jedné z dostupných analytických metod. [45]

2.4.2. Mikroskopická identifikace

Metody založené na vizuální identifikaci mikroplastů vyžadují zkoumání povrchu částic. Samotný optický mikroskop nemá dostatečné zvětšení k přesné identifikaci mikroplastů, proto se často využívá kombinace optického mikroskopu a rastrovacího elektronového mikroskopu s energiově-disperzním rentgenovým analyzátozem (SEM/EDX) pro ideální rozlišení mikroplastů od ostatních částic, jako jsou minerály, přírodní vlákna nebo živočišné zbytky. Tato kombinace umožňuje rychlé rozdělení částic mezi mikroplasty a jiné částice s menším rizikem nesprávné identifikace. [46] Schéma SEM/EDX přístroje je vyobrazeno na obr. 6.



Obrázek 6: Instrumentace přístroje SEM/EDX, převzato a upraveno z [47]

Analýza pomocí SEM/EDX spočívá v naskenování povrchu částice pomocí SEM, kde úzký svazek elektronů dopadá na každý bod vzorku. Elektronový detektor zachycuje rozdílné interakce elektronového svazku s povrchem a podle toho vyhodnocuje černobílý obraz vzorku. Každý měřený bod bude na obrazu zobrazen jiným odstínem, podle textury povrchu v daném bodě. Tento obraz je doplněn o prvkovou analýzu pomocí EDX detektoru. Při ozáření svazkem elektronů dochází i k vyzáření rentgenového záření o specifických energiích. Detektor zachycuje rentgenové záření a podle jeho energie v daném bodě přiřazuje do černobílé mapy vytvořené pomocí SEM údaj o prvkovém složení. Z finálního obrazu lze usuzovat, zda se jedná o sloučeniny obsahující uhlovodíkovou strukturu jakou obsahují plasty. [8]

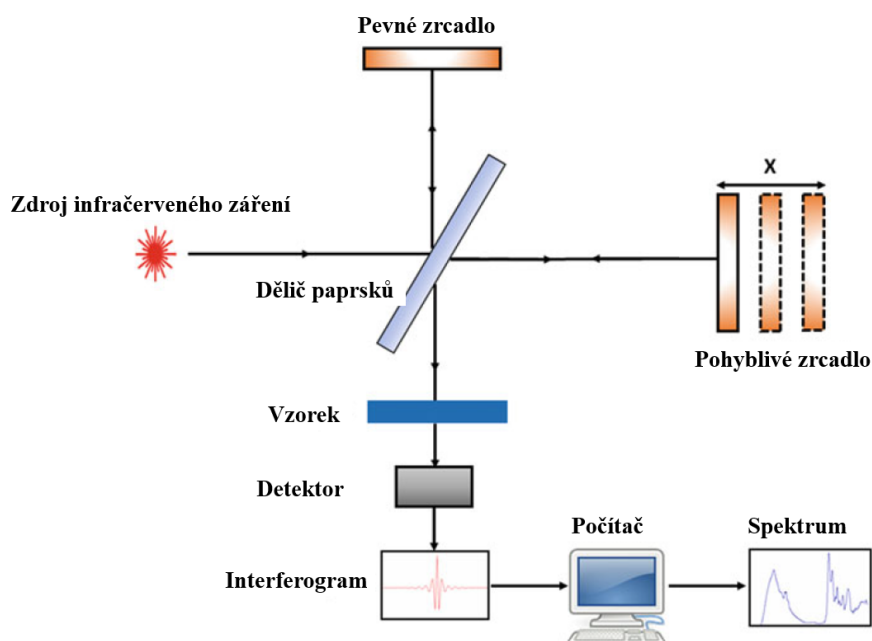
Výsledky získané metodou SEM/EDX s jistotou ukazují na výskyt mikroplastů a jejich tvar. Velkou výhodou je také rychlost a automatizace při skenování velkého povrchu filtru. Velkou nevýhodou těchto výsledků je ale nejasná identifikace konkrétního polymeru. Z prvkového složení nelze s dostatečnou přesností určit, o jaký polymer se jedná. Proto by bylo vhodné doplnit informace o určených polymerech pomocí spekter z FTIR nebo Ramanovy spektrometrie. [48]

2.4.3. Infračervená spektrometrie

Jednou z nejběžnějších metod pro identifikaci mikroplastů je infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FT-IR) a infračervený (IR) mikroskop s Fourierovou

transformací. Pomocí charakteristických vibrací vazeb v syntetických polymerech lze pro každý druh plastu zaznamenat specifické spektrum. To můžeme porovnat se spektry, která jsou měřena na známých polymerech a zaznamenaných do knihoven spekter. Pro měření mikroplastů pomocí IR mikroskopu se obvykle používá metoda zeslabeného úplného odrazu (ATR). Hlavní výhodou této metody je zúžení působení infračerveného paprsku na oblast povrchu vzorku. [49]

Princip IR spektrometrie spočívá v měření přechodů elektronů mezi vibračními hladinami molekuly během absorpce infračerveného záření. Pro měření mikroplastů se nejčastěji využívá střední oblast frekvencí ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$). Infračervené záření indukuje vibrace vazeb molekuly prostřednictvím změny dipólového momentu. Mezi tři základní skupiny vibrací se řadí valenční vibrace, deformační rovinné vibrace a deformační mimorovinné vibrace. Valenční vibrace jsou symetrické a asymetrické. Do deformačních vibrací patří kyvadlová a nůžková vibrace. A do skupiny deformačních mimorovinných náleží vějířová a kroutivá vibrace. V dnešní době je výhradně využíván FT-IR, ve kterém se oproti původnímu disperznímu přístroji nachází interferometr. Mezi hlavní výhody FT-IR se řadí rychlejší analýza, větší poměr signálu oproti šumu, vyšší a širší spektrální rozsah. IR podporuje měření ve dvou různých módech. Jedná se o transmisní a reflexní, každý mód má své výhody, ale každý má i své úskalí. [50] Schéma instrumentace klasického jednopaprskového interferometru pro FT-IR je vyobrazen na obr. 7.



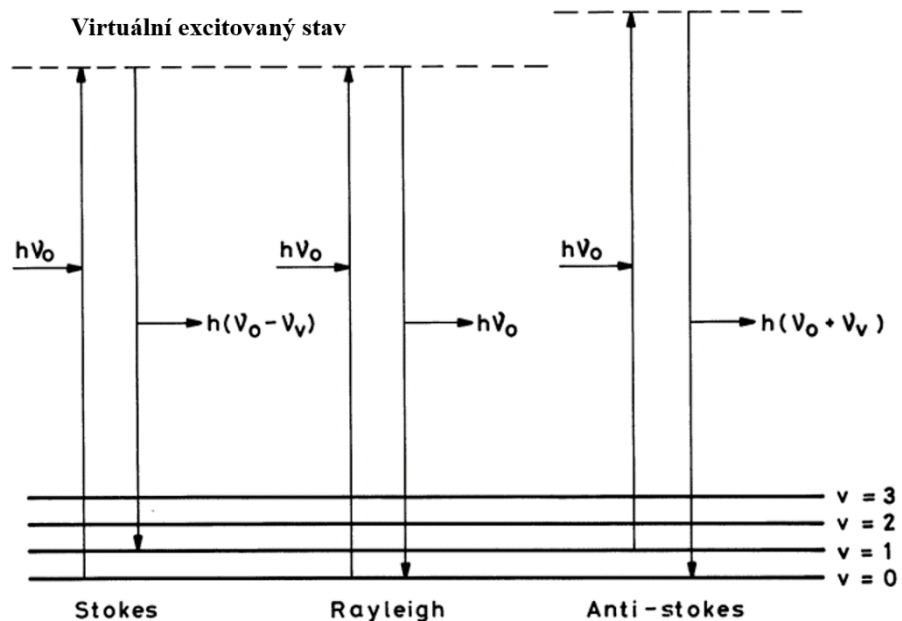
Obrázek 7: Schéma jednopaprskového interferometru používaného v FT-IR, převzato a upraveno z [50]

Identifikace a kvantifikace mikroplastů ve vzorku pomocí IR mikroskopu má své nesporné výhody, a proto tato metoda v posledních letech se řadí mezi nejpoužívanější. Mimo to, tomu napomáhá možnost automatizace, kdy je možné analyzovat širší část povrchu bez lidského přičinění. Ale existují zde i měřené pásy, které mají v IR nízkou intenzitu, nebo jsou neaktivní a nelze je s jistotou identifikovat. Látka je v IR aktivní, když má nenulový dipólový moment. Dipólový moment molekuly vyplývá z kombinace vibrací molekuly. Když má látka pouze vibrace, jejíž kombinace dává nulový dipólový moment nebude v IR aktivní. Proto se také používá Ramanova spektrometrie. Některé pásy, které v IR spektru nelze téměř vidět, nebo jsou neaktivní můžeme v Ramanově spektru vidět zřetelně. Jedná se tedy o komplementární metody. [51]

2.4.4. Ramanova spektrometrie

Ramanova spektrometrie a Ramanova mikroskopie jsou vibrační spektroskopické metody. Ramanovy spektra jsou pro každou chemickou strukturu jedinečné, podobně jako u FT-IR. Proto se hojně využívá při identifikaci mikroplastů. Naměřená spektra jsou snadno porovnávána se standardními spektry polymerů v knihovně. Společnou výhodou s FT-IR je nedestruktivnost, použití velmi malého vzorku a zařazení do oblasti zelené chemie. [52]

Principem metody je nepružný rozptyl záření po ozáření molekul laserem. Struktura molekuly vychází z informací o přechodech mezi vibračními hladinami. Po ozáření vzorku monochromatickým zářením se část záření rozptýlí. Část tohoto záření o stejné frekvenci jako bylo původní záření nazýváme Rayleighův rozptyl. Důležitější část je nepružně rozptýlené záření o jiné frekvenci než původní záření, kterému říkáme Ramanovo záření. Ramanovo záření se dělí na Stokesův rozptyl, kdy foton záření předá energii molekule, která se excituje na virtuální excitovanou hladinu a při deexcitaci se vrátí na vyšší vibrační stav, než byl původní. Další typem je anti-Stokesův rozptyl, rozdíl je v tom že se po deexcitaci molekuly vrátí do nižší vibrační hladiny, než byla původní. Deexcitace je doprovázena vyzářením fotonu o jiné energii, než byl původní, z údaje o energii je sestaveno spektrum molekuly. [53] Přechody Ramanova a Rayleighova rozptylu jsou vyobrazeny na obr. 8.



Obrázek 8: Přechody Ramanova a Reyleigova rozptylu, převzato a upraveno z [54]
 ν - frekvence záření; h - Planckova konstanta ($6,63 \cdot 10^{-34}$ J.s)

Instrumentace Ramanova mikroskopu má několik hlavních komponent. Laser určený pro vznik Ramanova záření se pohybuje ve vlnových délkách od UV až po blízkou infračervenou oblast (NIR). Po ozáření vzorku je potřeba vznikající záření sběrnou optikou zaostřit do užšího paprsku. Nežádoucí Rayleighův rozptyl je odfiltrován pomocí filtru. Následuje monochromátor pro výběr určité vlnové délky. Vybraná vlnová délka vstupuje do detektoru, jehož odezva je zpracována a vyhodnocena v podobě spektra. [55]

2.4.5. Plynová chromatografie

Jednou z posledních hojně používaných analytických metod identifikace mikroplastů je spojení pyrolýzy s plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (pyro-GC/MS). Tato metoda využívá pyrolytického rozkladu polymerů na předvídatelné fragmenty, které lze v GC rozdělit na základě retenčních časů jednotlivých fragmentů na stacionární fázi v koloně. Takto rozdělné fragmenty jsou analyzovány v MS, kde je zjištěna molekulová hmotnost jednotlivých fragmentů. Z retenčního času získaného z GC a molekulové hmotnosti z MS, lze získat celistvou strukturu původního polymeru. [56]

Touto metodou lze jednoduše analyzovat velké množství mikroplastů i těch nejmenších velikostí. Lze také získat informace o přítomnosti látky, jakou jsou barviva nebo změkčovadla. Analýza poskytuje jak kvalitativní, tak při použití vhodného standardu i kvantitativní informace o vzorku. Obrovskou nevýhodou oproti spektrálním metodám jako

je FT-IR a Ramanova spektrometrie je, že pyro-GC/MS je metodou destruktivní, která zapříčiní úplnou ztrátu vzorku. Proto by měla být při analýze více metodami využívána jako poslední. [57]

2.4.6. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Poslední prakticky více využitelnou metodu pro analýzu mikroplastů je Indukčně vázané plazma s hmotnostní spektrometrií (ICP-MS). Za pomoci ICP-MS s kvadrupólovým analyzátozem v módu jedné částice tzv. single particle mode, lze detekovat, kvantifikovat a stanovit velikost částice mikroplastu, pomocí měření izotopu ^{13}C . Výhody této metody jsou rychlost, rutinní využití a nízké meze detekce a kvantifikace. Hlavní nevýhodou je neucelený přístup ke kalibraci a nedostupnost referenčních materiálů mikroplastů. Výzkum byl prováděn na částicích o velikosti $2,5\ \mu\text{m}$ a $1\ \mu\text{m}$ kulovitěho tvaru. Proto není zcela známo, jaké bude metoda poskytovat výsledky pro menší velikosti, a především nepravidelné tvary. A také není známé využití metody při běžné analýze ne zcela čistých matric jako jsou nápoje, pivo nebo kohoutková voda. [58,59]

Pro analýzu pomocí MS je nezbytné převést vzorek na ionizované částice, toho je docíleno pomocí ICP ionizátoru. Jde o plazma zažehnuté z proudu argonu, jelikož je teplota plazmatu tak obrovská, je udržované magnetickým polem v konickém tvaru bez kontaktu se stěnou zařízení. Vzniklé ionty jsou následně rozděleny v analyzátozu na základě svého poměru hmotnosti a náboje (m/z). Zde je jako analyzátoz použit kvadrupól, který je složen ze čtyř kruhovitých tyčí. Na protější tyče je stejně navedené střídavé a stejnosměrné napětí, které uprostřed vytváří střídavé magnetické pole, které separuje ionty na základě jejich poměru m/s . Separované ionty dopadají na detektor a vzniká typické hmotnostní spektrum. [60]

3. Experimentální část

3.1. Pomůcky

- Filtry ze skelných vláken GF/B, velikost pórů 1,0 μm , průměr 47 mm, Whatman, Čína
- Membránové hliníkové filtry Anodisc, velikost pórů 0,2 μm , průměr 25 mm, Whatman, Německo
- Aparatury pro vakuovou filtraci pro filtry o průměru 47 mm a 25 mm
- Skleněné laboratorní pomůcky
- Pinzeta

3.2. Chemikálie

- Standard mikročastic polypropylenu, mesh 100, Magerial Science, USA
- Standard mikročastic polyethylenu, mesh 300, Magerial Science, USA

3.3. Přístrojové vybavení

- Ramanův mikroskop DXR 2, DXR LASER 785 nm, software pro manipulaci a vyhodnocení OMNIC, Thermo Scientific, USA
- FT-IR mikroskop LUMOS II, plošný detektor (FPA) 32×32 detektor, software pro manipulaci a vyhodnocení OPUS, Bruker, USA
- Analytické váhy XSE 205 Dualrange, METTLER TOLEDO, USA
- Rastrovací elektronový mikroskop (SEM) TESCAN VEGA, integrovaný energiově disperzním spektrometrem, software pro manipulaci Tescan Essence, TESCAN, Česká republika

3.4. Vzorky

Pro analýzu mikroplastů v pivu bylo vybráno 11° pivo značky Břežňák, prodávané v lahvi o objemu 1,5 l, vyrobené z materiálu PET. Stejný typ piva byl použit celkem třikrát. Pro jednu analýzu bylo vybráno 11° pivo s názvem Pepa, které bylo vyrobeno v univerzitním experimentálním pivovaru EUREKA. Toto pivo bylo stáčeno přímo z nerezového tanku.

3.5. Pracovní postup

3.5.1. Separace mikroplastů

Z důvodů zamezení kontaminace mikroplasty, bylo použito jen skleněné laboratorní nádoby, které bylo opláchnuto destilovanou vodou filtrovanou přes filtr ze skelných vláken. Takto zfiltrovaná destilovaná voda byla použita pro veškeré promývání filtrů.

První vzorek piva značky Břežňák byl filtrován přes filtr ze skelných vláken o zmenšeném průměru na 25 mm. Pro filtraci byl použit 1 l piva. Druhý vzorek piva Břežňák o stejném objemu byl filtrován přes filtr ze skelných vláken o průměru 47 mm. Třetí vzorek piva Břežňák a vzorek domácího piva Pepa o stejném objemu byly filtrovány přes membránový hliníkový filtr o průměru 25 mm.

Takto připravené filtry byly ponechány při laboratorní teplotě, přikryté sklem k vysušení. Také byly ponechány filtry po filtraci destilované vody. Přefiltrované pivo bylo dále využito k přidání standardu mikroplastů pro validaci měření.

3.5.2. Přídavek standardu mikroplastů

Všechny tři vzorky přefiltrovaného piva Břežňák byly rozděleny napůl. Do jedné půlky piva byla přidána známá hmotnost PP a do druhé půlky známá hmotnost PE. Do přefiltrovaného domácího piva Pepa byl PP i PE přidán do jediného roztoku. Takto připravené roztoky piva s mikroplasty byly přefiltrovány přes stejné typy filtrů jako ty, které byly použity pro původní filtraci daného vzorku piva. Průměrná velikost mikroplastů byla změřena pomocí SEM. Počet částic, přidaných do vzorku přefiltrovaného piva, byl spočítán pomocí rovnice (1)

$$N = \frac{m_{celkem}}{\frac{4 \cdot \pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^3}{3} \cdot \rho \cdot 1000} \quad (1)$$

kde m_{celkem} je hmotnost navážky v mg, d je průměrná velikost částic v cm, ρ je hustota daného polymeru v $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a N je výsledný počet částic v navážce.

3.5.2. Nastavení podmínek měření

Podmínky pro identifikaci mikroplastů pomocí Ramanova mikroskopu DXR 2 byly optimalizovány kolegyní v již obhájené diplomové práci. Dle této optimalizace byl zvolen excitační laser o vlnové délce 785 nm. Intenzita laseru byla stanovena na 30 mW a počet expozičních 60. Aparatura byla zvolena 25 μm pinhole. [61]

Podmínky pro identifikaci mikroplastů pomocí FT-IR mikroskopu LUMOS II byly postupným měřením optimalizovány. Využití telurid rtuťnokademnatého (MCT) detektoru není z časových důvodů vyhovující, proto byl používán plošný detektor (FPA) detektor. FT-IR mikroskop umožňuje měření ve třech módech, a to reflexní, transmisní a ATR. Měření v módu reflexe nevykazovalo ani obstojné výsledky. Při módu ATR byl krystalem poškozen filtr. Proto byl zvolen mód transmise, který byl co do rychlosti měření a kvality měření nejpoužitelnější. Počet expozic byl díky využití pokročilých softwarových funkcí pro vyhodnocování zvolen pouze 1. Ze stejných důvodů mohlo být rozlišení spekter nastavené na 8 cm^{-1} .

3.5.3. Identifikace Ramanovým mikroskopem

Ramanův mikroskop byl nakonfigurován podle předešlých parametrů a laser byl ponechán pár minut, než byl připraven. Byl vložen filtr a pomocí pohyblivé aparatury a zaostřování byly prohledávány systematicky protější dvě čtvrtiny. První sada filtrů byla výjimka, ty byly prohledány celé.

Podezřelé částice byly změřeny. Za podezřelé byly považovány především bílé nebo šedé částice kruhovitěho tvaru, nebo vlákna všech barev. Nejdříve bylo zkontrolováno live spektrum dané částice, kdy při viditelném signálu okolo 3000 cm^{-1} bylo spektrum změřeno úplně. Výsledné spektrum bylo porovnáno s knihovnou spekter, při shodě korelačního koeficientu převedeného na procenta s hodnotou více jak 70 % byla částice identifikována jako daný polymer.

3.5.4. Identifikace FT-IR mikroskopem

Pro analýzu mikroplastů pomocí FT-IR mikroskopu bylo nezbytné použití FPA detektoru, kterým lze měřit větší plochy automaticky. Tento detektor bylo potřeba nejdříve vychladit tekutým dusíkem. Filtr pro toto měření musí být zcela rovný, proto nebylo možné použít první dvě sady vzorků, kde byl použit filtr ze skelných vláken.

Filtr byl umístěn do držáku a pomocí pohyblivé aparatury byl zaostřen. Pomocí kamery mikroskopu byla vizuálně naskenována plocha určená k měření, tedy celý filtr. Bylo změřeno pozadí a na naskenovanou část byla umístěna plocha, kterou měl FPA detektor naskenovat. Plocha je členěna na čtverce, kdy každý obsahuje 32×32 jednotlivých pixelů. Každý pixel velikostí odpovídá $5 \mu\text{m}$. Bylo zahájeno měření, filtr byl z důvodu projmutí co největší části rozdělen na menší měřené plochy. Naměřené plochy spekter, lze pomocí pokročilých funkcí softwarů vyhodnotit.

Naměřené data byly zpracovávány pomocí adaptivního chemického zobrazování (ACI). Tato pokročilá funkce v softwaru OPUS barevně odlišuje klastry s podobnými naměřenými spektry blízko sebe na celé naměřené ploše. Pro vyhodnocení bylo zvoleno rozmezí $1250 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ a také kompenzace CO_2 . Na výsledném barevně odlišeném obrázku lze spočítat množství mikroplastů.

4. Výsledky a diskuse

4.1. Porovnání typu filtru

Filtr ze skelných vláken je díky jeho členitému povrchu jednodušší pro manipulaci. Mikroplasty se snadno zachytí, velikost pórů 1,0 μm je dostačující pro částice, které jsme schopni pomocí spektrálních metod identifikovat. Průměr filtru 25 mm, lze na Ramanově mikroskopu prohledávat celý, u průměru 47 mm je to z časových důvodů obtížné, proto je vhodné využít metodu kvartace.

Velikost pro měření na FT-IR mikroskopu není při využití automatického měření důležitá. Jako problematický, se pro měření, ukázal povrch filtru ze skelných vláken. Kvůli nedokonale hladkému povrchu není možné měření reflexním nebo transmisním módem využít, protože přístroj vždy měří spektrum skelného vlákna. Také nelze využít měření transmisním módem.

Membránový hliníkový filtr o průměru 25 mm je vhodnou variantou pro oba typy měření. Také podporuje transmisní měření na FT-IR. Hlavní nevýhodou je manipulace. Z důvodu jeho dokonale hladkého povrchu, nesmí být při manipulaci ani nakloněn, neboť poté dochází ke ztrátě částic. Ani mnohonásobné promytí filtru při filtraci nezaručuje větší stabilitu částic na filtru.

4.2. Standardní přídavek mikroplastů

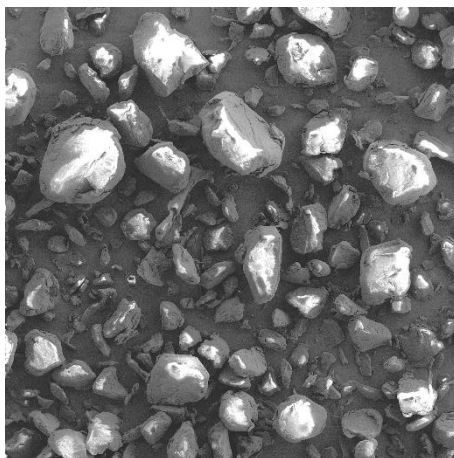
Za pomoci SEM bylo změřeno celkem 70 částic od obou typů polymerů. Do tab. II. byla vyhodnocena velikost nejmenší a největší částice, průměrná velikost částic a směrodatná odchylka.

Tabulka II.: Vyhodnocené hodnoty změřených velikostí částic

Typ mikroplastu	Nejmenší částice [μm]	Největší částice [μm]	Medián [μm]	Průměrná hodnota [μm]	Směrodatná odchylka [μm]
PP	32,6	377,0	120,0	133,5	71,3
PE	72,9	525,0	197,9	208,4	93,4

Naměřené reálné velikosti částic nekorespondují s údajem mesh od výrobce. Dle těchto údajů by částice PP neměly být větší než 149 μm pro PP a 50 μm pro PE. Z důvodu

velkého rozpětí velikostí částic nemusí teoretická hodnota částic přidávaných na filtr odpovídat skutečnému množství přidávaných částic. Na obr. 9 jsou vyobrazeny kulovité mikroplasty s mírně ostrými hranami, typu PP pomocí SEM.



Obrázek 9: Vyobrazené mikroplasty typu PP pomocí SEM

Předpokládaný počet mikroplastů přidávaný do jednotlivých roztoků byl vypočítán ze známé hmotnosti, hustoty a průměrné velikosti částic. Takto vypočítané přídatky pro jednotlivé vzorky byly zapsány do tab. III.

Tabulka III.: Obsah standardů mikroplastů v daných vzorcích piva

Vzorek	Typ filtru	Typ standardu	Hmotnost [mg]	Počet částic
Březňák č. 1	Skelná vlákna, 25 mm	PP	0,11	98
		PE	0,08	18
Březňák č. 2	Skelná vlákna, 47 mm	PP	0,12	106
		PE	0,15	34
Březňák č. 3	Membránový, 25 mm	PP	0,09	80
		PE	0,11	24
Pepa	Membránový, 25 mm	PP + PE	0,07 + 0,12	62 + 26

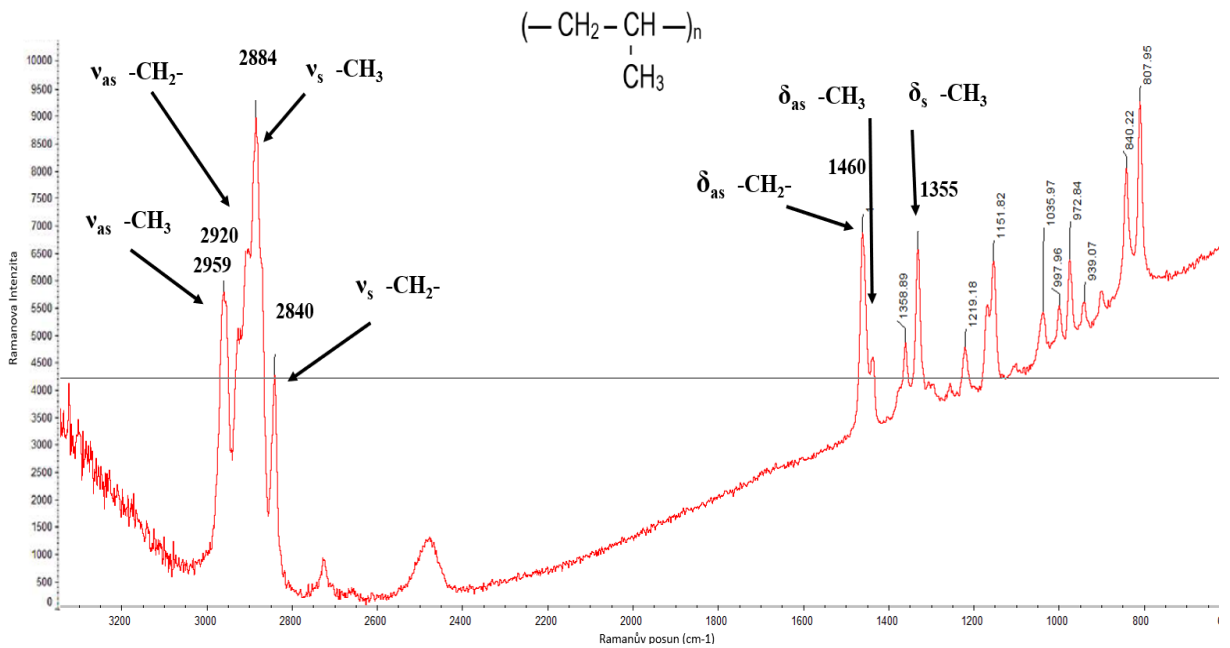
4.3. Identifikace mikroplastů

4.3.1. Slepý pokus

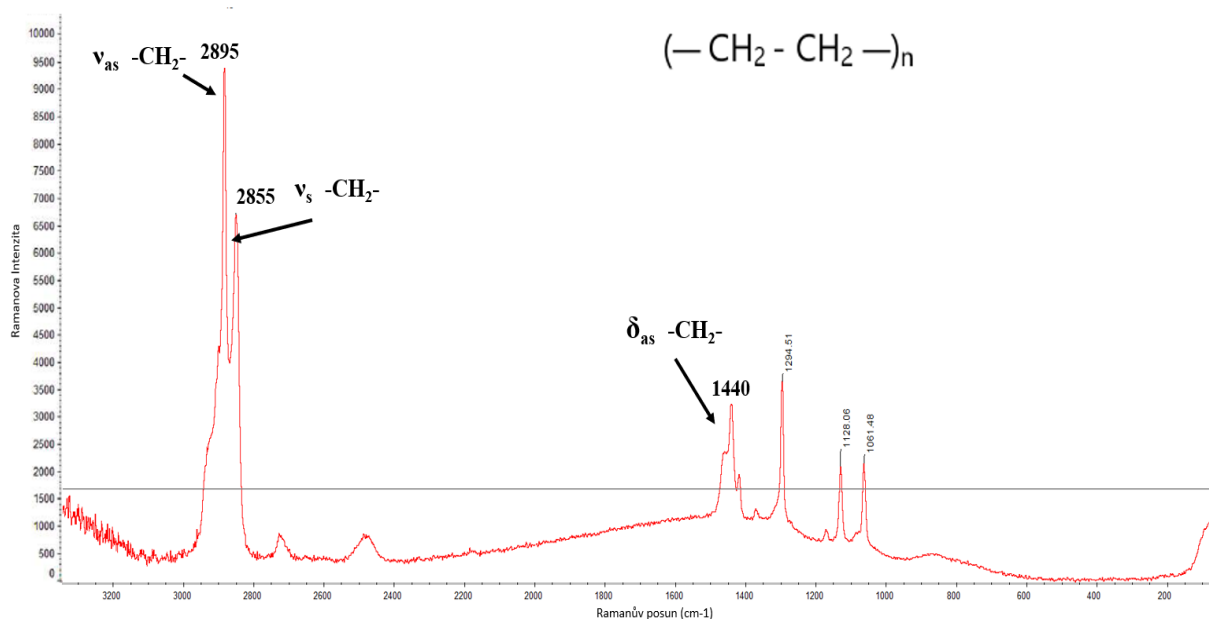
Jakožto slepý pokus byly stanoveny, dva filtry ze skelných vláken, které při prvních dvou sadách vzorků sloužily k filtraci destilované vody, tyto filtry, kvůli svému typu, byly

analyzovány pouze na Ramanovu mikroskopu. V případě filtru z první sady vzorků byly identifikovány celkem 4 částice a jedno vlákno polymeru. Jednalo se o vlákno nylonu, 2 částice ethylen/vinylacetát kopolymeru, 1 částici PP a jednu částici PE. V případě filtru z druhé řady nebyla nalezena žádná částice polymeru. I přes to se dá předpokládat, že filtrace destilované vody je nezbytná k zamezení kontaminace.

Ve spektrum PP, resp. PE jsou přiřazeny jednotlivé vibrační pásy k daným částem polymeru. Spektra jsou vyobrazena na obr. 10, resp. obr. 11.

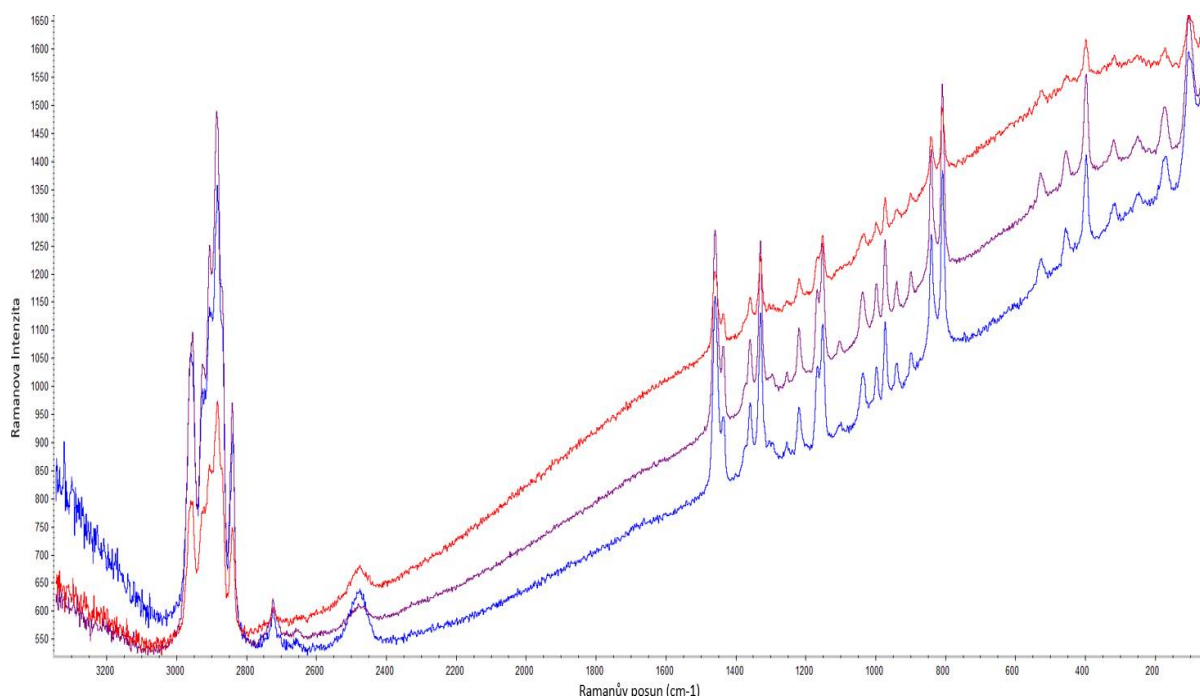


Obrázek 10: Změřené spektrum PP s označenými vibracemi;
 ν_{as} – valenční asymetrická vibrace, ν_s – valenční symetrická vibrace,
 δ_{as} - rovinná deformační asymetrická vibrace, δ_s - rovinná deformační symetrická vibrace

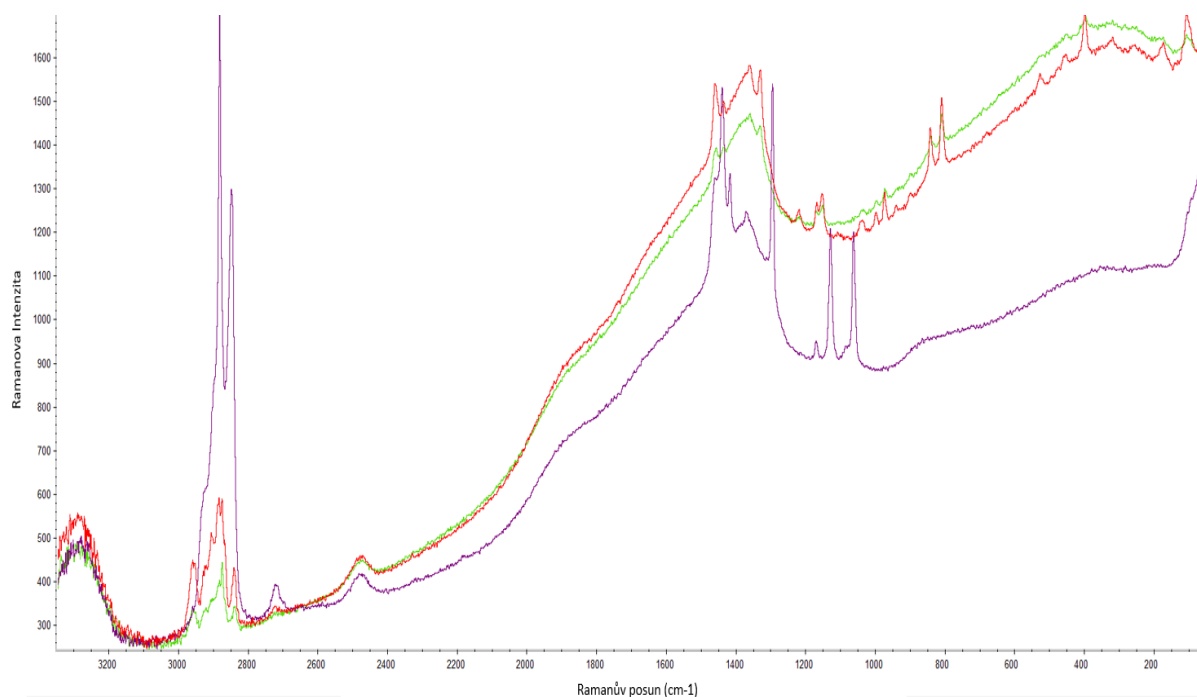


Obrázek 11: Změřené spektrum PE s označenými vibracemi;
 ν_{as} – valenční asymetrická vibrace, ν_s – valenční symetrická vibrace,
 δ – rovinná deformační vibrace

Shoda naměřených spekter se spektry v knihovně je závislá na kvalitě naměřeného spektra. Kvalitu spektra mohou snížit vnější vlivy, velmi nízká velikost částice nebo překrytí částice jiným materiálem. Na obr. 12, resp. obr. 13 jsou vyobrazeny tři absorpční spektra, bez korekce na fluorescenci, typu PP, resp. PE s rozdílnými hodnotami korelačního koeficientu.



Obrázek 12: Porovnání naměřených spekter PP dle shody korelačního koeficientu s referenčním spektrem PP v knihovně spekter; červená – shoda 70, modrá – shoda 85, fialová – shoda 94



Obrázek 13: Porovnání naměřených spekter PE dle shody korelačního koeficientu s referenčním spektrem PE v knihovně spekter; zelená – shoda 49, červená – shoda 65, fialová – shoda 95

4.3.2. Ramanova mikroskopie

Pomocí Ramanova mikroskopu byly změřeny všechny čtyři sady filtrů. Každá sada filtrů obsahovala filtr po filtraci čistého piva a filtr nebo filtry s přísadkou PP a PE. Téměř na

každém filtru byly nalezeny částice, nebo různobarevná vlákna, které nebylo možné identifikovat, ale mohlo by se jednat o vlákna nylonu. Pouze na filtru z první řady s přídavkem PE nebyla nalezena žádná částice PE. Byla nalezena řada přibližně 15 částic, jejíž shoda korelačního koeficientu se spektrem PE z knihovny spekter byla mezi 40–50 %. Tento počet by téměř odpovídal počtu 18 očekávaných částic. Nižší shoda částic mohla být způsobena vlhkým filtrem.

Filtr 3. sady piva Břežňák obsahující přidané částice PE byl při testování ATR protržen, proto nemohl být změřen.

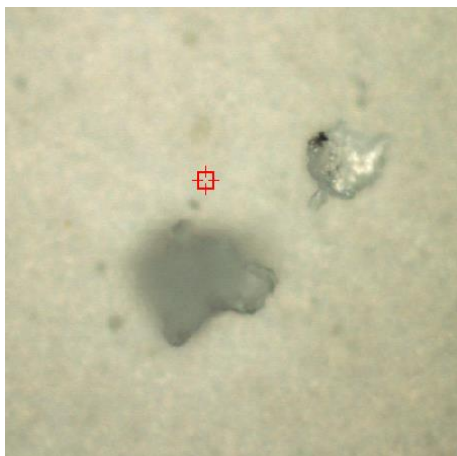
Velké rozdíly identifikovaných částic oproti očekávanému počtu částic může být způsobeno velkým rozpětím mezi nejmenší a největší možnou částicí. Tento problém je zřetelnější u částic typu PE, kde je rozpětí částic naměřených pomocí SEM od 72,86 μm do 525,03 μm .

V tab. IV jsou zaznamenány všechny identifikované mikroplasty se shodou korelačního koeficientu nad 70 % a počet nalezených vláken, které by mohly odpovídat nylonu.

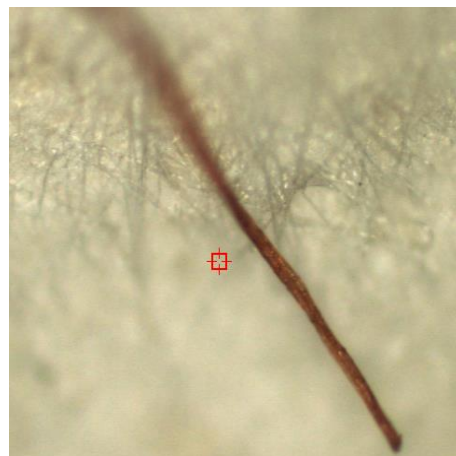
Tabulka IV: Identifikované částice ve všech sadách filtrů pomocí Ramanova mikroskopu.

Pořadí filtrace	Druh vzorku piva	Typ filtru	Přidaný typ mikroplastů	Typ částice	Očekávaný počet částice	Počet částic
1.	Břežňák	Skelná vlákna, 25 mm	PP	PP	98	101
			PE	PE	18	0
			Čisté pivo	Neidentifikovatelné vlákno	-	5
2.	Břežňák	Skelná vlákna, 47 mm	PP	PP	106	116
			PE	PE	34	106
			Čisté pivo	Neidentifikovatelné Vlákno/PE	-	15/7
3.	Břežňák	Membránový, 25 mm	PP	PP	80	36
			PE	PE	24	-
			Čisté pivo	PP	-	3
4.	Pepa	Membránový, 25 mm	PP + PE	PP/PE	62/26	42/4
			Čisté pivo	Neidentifikovatelné vlákno/PP	-	2/5

Na obr. 14 jsou vyobrazeny dvě identifikované částice PP při měření pomocí Ramanova mikroskopu. Na obr. 15 je vyobrazeno jedno z neidentifikovatelných vláken. A na obr. 16 je vyobrazena identifikovaná částice PE.



Obrázek 14: Dva mikroplasty typu PP



Obrázek 15: Neidentifikovatelné vlákno

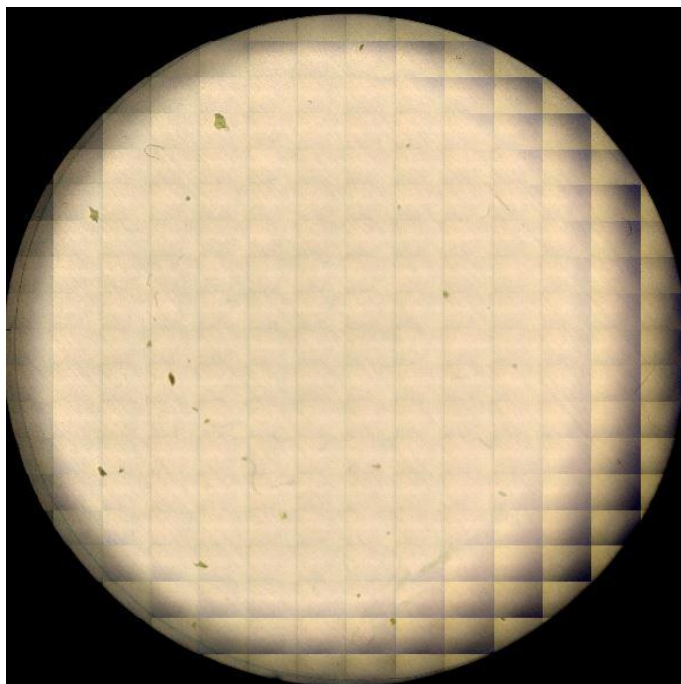


Obrázek 16: Identifikovaný mikroplast typu PE

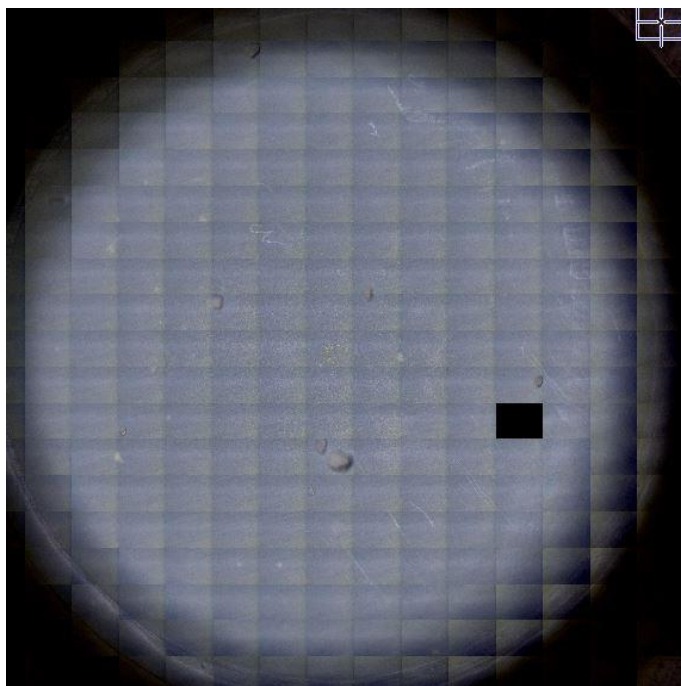
4.3.3. FT-IR mikroskop

Pomocí FT-IR mikroskopu nebylo možné analyzovat první dvě sady filtrů, které byly ze skelných vláken. Proto byly měřeny filtry 3. a 4. sady. Postupně byly optimalizovány podmínky, aby bylo možné FPA detektorem změřit celý filtr najednou. Proto bylo zvoleno rozlišení 8 cm^{-1} a 1 expozice na jednu měřenou plochu. Tímto způsobem je možné skenovat celou plochu filtru v jednom měření. Takto změřená spektra nejsou příliš kvalitní, proto je nelze samostatně porovnávat s knihovnou spekter, ale je třeba je vyhodnocovat pomocí pokročilého softwaru.

Nejdříve byla pořízena fotografie celého filtru. Na obr. 17, resp. 18 je vyobrazen filtr po filtraci piva Břežňák po přidání PP z třetí sady filtrů, resp. filtr po filtraci čistého piva Pepa. Již na těchto fotografiích lze vidět množství podezřelých částic.



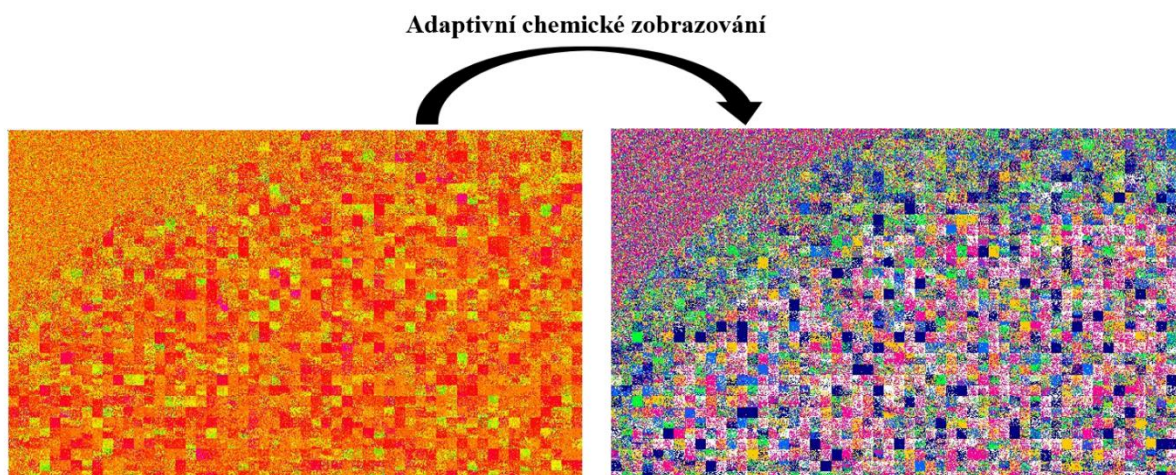
Obrázek 17: Filtr piva Břežňák s přidávanými částicemi PP pořízený pomocí FT-IR mikroskopu



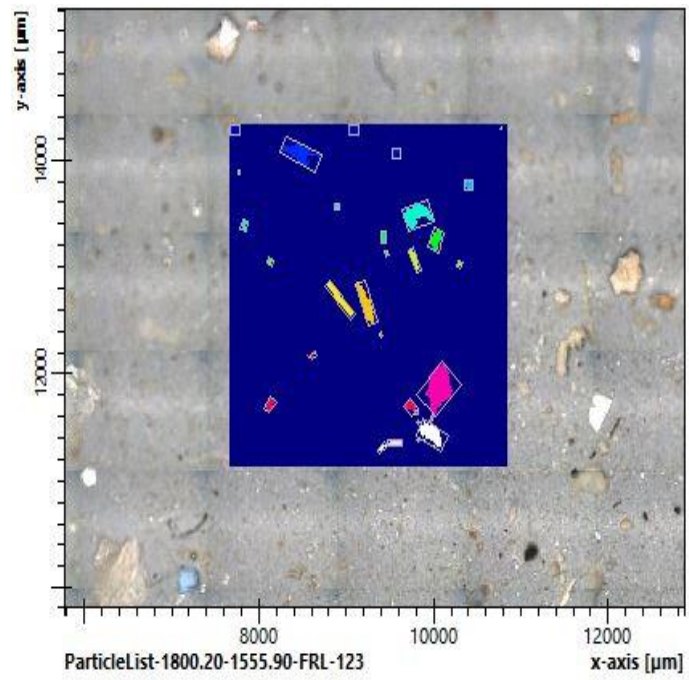
Obrázek 18: Filtr čistého piva Pepa pořízený pomocí FT-IR

Vyhodnocování změřených dat pomocí pokročilých ACI využívající umělou inteligenci a vícerozměrnou shlukovací metodu (k-means clustering) nebylo úspěšné. V této funkci bylo upravované nastavení od zkoumaného rozmezí vlnové délky, přes počet očekávaných klastrů nebo automatického hledání klastrů, přes úpravu spektra pomocí vyhlazování nebo derivace. V žádném použitém nastavení nebylo možné sestrojít cílený obrázek ze kterého by bylo možné spočítat množství částic na filtru. Ideální výsledek po ACI je jednoduché pozadí a zřetelně oddělitelné klastry jiné barvy, které by zvýrazňovali nacházející se mikroplasty. V tuto chvíli není možné říci, zda byla chyba v nastavení ACI nebo v naměřených datech. Tato funkce musí být podrobněji otestována.

Na obr. 19 jsou nejdříve vyobrazeny data před úpravou pomocí ACI a po úpravě. Na obr. 20 lze vidět, jak by měl obrázek po ACI vypadat. Je viditelný znatelný rozdíl mezi mnou vyhodnocenými daty a ideálním vyhodnocením, i přes dodržení veškerých postupů.



Obrázek 19: naměřená data před a po úpravě pomocí ACI



Obrázek 20: Ideálně upravená data po ACI, převzato z [62]

5. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo optimalizovat podmínky pro analýzu mikroplastů v pivě pomocí Ramanova mikroskopu a FT-IR mikroskopu a ověřit je pomocí přidavku mikroplastů do reálných vzorků. Vzorky piva byly filtrovány přes dva typy filtru. Pro jednodušší manipulaci se jeví typ filtru ze skelných vláken o průměru 47 mm, ale z důvodu velmi členitého povrchu není použitelný pro měření FT-IR mikroskopem. Membránový hliníkový filtr o průměru 25 mm je kompatibilní pro analýzu na obou mikroskopech, ale z důvodu jeho dokonale hladkého povrchu je nutné pracovat opatrně, jinak dochází ke ztrátě částic na filtru.

Analýza pomocí Ramanova mikroskopu vykazuje velmi dobrých výsledků, bylo identifikováno velké množství mikroplastů. Ve vzorcích, do kterých byly částice přidány záměrně byly ve většině případů identifikovány téměř všechny částice. Pomocí SEM byly změřeny průměrné hodnoty velikostí částic, které vůbec nekorespondují s velikostí udávanou výrobcem. Také z důvodu značného rozpětí velikostí částic není možné považovat vypočítané množství částic, které je očekáváno na filtru, s jistotou za správné. Avšak analýza tímto způsobem je velmi pomalá a je nutná manuální obsluha po celou dobu. Může tedy dojít k přehlednutí menších nebo průhledných částic

V prvním vzorku piva Břežňák nebyl identifikován jediný mikroplast, bylo zde nalezeno pouze 15 různobarevných vláken, jejíž identifikace nebyla průkazná z důvodu naměření spekter barevné vrstvy. Mohlo by se jednat o vlákna nylonu. V druhém vzorku piva Břežňák bylo identifikováno 7 částic typu PE a bylo nalezeno 15 různobarevných vláken. V třetím vzorku piva Břežňák byly identifikovány 3 částice typu PP. Ve vzorku piva Pepa, připraveném ve školním mini pivovaru EUREKA, bylo nalezeno 5 částic typu PP a 2 neidentifikovatelná vlákna.

Analýza pomocí FT-IR je sice rychlá a automatická, nemůže tedy dojít k vynechání žádné částice, pouze v případě, že by částice byla pod velikostí, která je měřitelná. Sestrojit funkční typ analýzy je u tohoto přístroje časově náročné. Ale i když byly problémy spojené se samotným měřením vyřešeny, objevil se mnohem větší problém s vyhodnocením dat. Spektra nejsou dostatečně kvalitní pro srovnání s knihovnou spekter, je třeba využít složitějších softwarů. Funkce ACI, která je přímo v softwaru OPUS, není ani po nespočtu pokusů prozatím úspěšná. I přes viditelný obsah mikroplastů na filtru a potvrzení jejich výskytu pomocí Ramanova mikroskopu, nejsou funkcí ACI barevně odlišeny od pozadí

filtru. Barvy odlišující jednotlivé klastry jsou náhodně rozmístěny po měřené části filtru. Není zcela jasné, zda je problém v naměřených datech nebo ve způsobu využívané funkce ACI, každopádně je tato funkce předmětem dalšího zlepšování.

V tuto chvíli je za použitelnější metodu považována Ramanova mikroskopie, ale to jen z důvodu, že předkládá zřetelná data. Ve všech ostatních ohledech je FT-IR mikroskopie výhodnější. Jakmile bude vyřešen problém s vyhodnocováním dat a identifikováním mikroplastů, bude FT-IR mikroskopie bezkonkurenční.

Mikroplasty byly tedy identifikovány s jistotou ve 3 ze 4 vzorků piva. Jejich množství je v řádu jednotek na 1 litr. V pivu jsou obsaženy i nejrůznější vlákna, u kterých nelze s jistotou říct, že se jedná o polymerní materiál. Je zřejmé, že se do piva mikroplasty dostanou především ze vstupních surovin nebo během výroby. Jelikož žádný vzorek neobsahoval mikroplast typu PET, ze kterého byly obaly piva Březňák. Vstupní suroviny mohou na počátku výroby obsahovat více mikroplastů, ale z důvodu vyšší teploty při výrobě může docházet ke zkracování polymerů pod velikost, kterou lze identifikovat.

6. Seznam literatury

- [1] H.A. Leslie, M.J.M. van Velzen, S.H. Brandsma, A.D. Vethaak, J.J. Garcia-Vallejo, M.H. Lamoree, Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood, *Environ Int* 163 (2022) 107199. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>.
- [2] S. Liu, J. Guo, X. Liu, R. Yang, H. Wang, Y. Sun, B. Chen, R. Dong, Detection of various microplastics in placentas, meconium, infant feces, breastmilk and infant formula: A pilot prospective study, *Science of The Total Environment* 854 (2023) 158699. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158699>.
- [3] I. V. Kirstein, A. Gomiero, J. Vollertsen, Microplastic pollution in drinking water, *Curr Opin Toxicol* 28 (2021) 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2021.09.003>.
- [4] N. Wootton, P. Reis-Santos, B.M. Gillanders, Microplastic in fish – A global synthesis, *Rev Fish Biol Fish* 31 (2021) 753–771. <https://doi.org/10.1007/s11160-021-09684-6>.
- [5] C.B. Crawford, B. Quinn, *Microplastic pollutants*, Elsevier, 2017.
- [6] Margolis, James M, *Engineering Plastics Handbook*, 2006.
- [7] P.K. Rose, M. Jain, N. Kataria, P.K. Sahoo, V.K. Garg, A. Yadav, Microplastics in multimedia environment: A systematic review on its fate, transport, quantification, health risk, and remedial measures, *Groundw Sustain Dev* 20 (2023) 100889. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2022.100889>.
- [8] T.A.P. Rocha-Santos, A.C. Duarte, *Characterization and Analysis of Microplastics*, 2017.
- [9] L. Hermabessiere, A. Dehaut, I. Paul-Pont, C. Lacroix, R. Jezequel, P. Soudant, G. Duflos, Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review, *Chemosphere* 182 (2017) 781–793. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.096>.
- [10] H. Du, J. Wang, Characterization and environmental impacts of microplastics, *Gondwana Research* 98 (2021) 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.gr.2021.05.023>.

- [11] K. Zhang, A.H. Hamidian, A. Tubić, Y. Zhang, J.K.H. Fang, C. Wu, P.K.S. Lam, Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review, *Environmental Pollution* 274 (2021) 116554. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116554>.
- [12] B. Singh, N. Sharma, Mechanistic implications of plastic degradation, *Polym Degrad Stab* 93 (2008) 561–584. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008>.
- [13] A. Sivan, New perspectives in plastic biodegradation, *Curr Opin Biotechnol* 22 (2011) 422–426. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.013>.
- [14] D.E. Newton, *Plastics and Microplastics*, 2021.
- [15] A.I. Osman, M. Hosny, A.S. Eltaweil, S. Omar, A.M. Elgarahy, M. Farghali, P.S. Yap, Y.S. Wu, S. Nagandran, K. Batumalaie, S.C.B. Gopinath, O.D. John, M. Sekar, T. Saikia, P. Karunanithi, M.H.M. Hatta, K.A. Akinyede, Microplastic sources, formation, toxicity and remediation: a review, *Environ Chem Lett* 21 (2023) 2129–2169. <https://doi.org/10.1007/s10311-023-01593-3>.
- [16] L. Lebreton, B. Slat, F. Ferrari, B. Sainte-Rose, J. Aitken, R. Marthouse, S. Hajbane, S. Cunsolo, A. Schwarz, A. Levivier, K. Noble, P. Debeljak, H. Maral, R. Schoeneich-Argent, R. Brambini, J. Reisser, Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic, *Sci Rep* 8 (2018) 4666. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22939-w>.
- [17] X. Mao, Y. Xu, Z. Cheng, Y. Yang, Z. Guan, L. Jiang, K. Tang, The impact of microplastic pollution on ecological environment: a review, *Frontiers in Bioscience-Landmark* 27 (2022) 046. <https://doi.org/10.31083/j.fb12702046>.
- [18] E. Guzzetti, A. Sureda, S. Tejada, C. Faggio, Microplastic in marine organism: Environmental and toxicological effects, *Environ Toxicol Pharmacol* 64 (2018) 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.10.009>.
- [19] S. Anbumani, P. Kakkar, Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review, *Environmental Science and Pollution Research* 25 (2018) 14373–14396. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1999-x>.

- [20] H. Cai, E.G. Xu, F. Du, R. Li, J. Liu, H. Shi, Analysis of environmental nanoplastics: Progress and challenges, *Chemical Engineering Journal* 410 (2021) 128208. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128208>.
- [21] A.-U.-R. Bacha, I. Nabi, L. Zhang, Mechanisms and the Engineering Approaches for the Degradation of Microplastics, *ACS ES&T Engineering* 1 (2021) 1481–1501. <https://doi.org/10.1021/acsestengg.1c00216>.
- [22] B. Laycock, M. Nikolić, J.M. Colwell, E. Gauthier, P. Halley, S. Bottle, G. George, Lifetime prediction of biodegradable polymers, *Prog Polym Sci* 71 (2017) 144–189. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.02.004>.
- [23] M. Myszograj, Microplastic in Food and Drinking Water - Environmental Monitoring Data, *Civil and Environmental Engineering Reports* 30 (2020) 201–209. <https://doi.org/10.2478/ceer-2020-0060>.
- [24] I. V. Kirstein, A. Gomiero, J. Vollertsen, Microplastic pollution in drinking water, *Curr Opin Toxicol* 28 (2021) 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2021.09.003>.
- [25] A. Altunışık, Prevalence of microplastics in commercially sold soft drinks and human risk assessment, *J Environ Manage* 336 (2023) 117720. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117720>.
- [26] V.C. Shruti, F. Pérez-Guevara, I. Elizalde-Martínez, G. Kutralam-Muniasamy, First study of its kind on the microplastic contamination of soft drinks, cold tea and energy drinks - Future research and environmental considerations, *Science of The Total Environment* 726 (2020) 138580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138580>.
- [27] M.F. Diaz-Basantes, J.A. Conesa, A. Fullana, Microplastics in Honey, Beer, Milk and Refreshments in Ecuador as Emerging Contaminants, *Sustainability* 12 (2020) 5514. <https://doi.org/10.3390/su12145514>.
- [28] P. Makhdoumi, A.A. Amin, H. Karimi, M. Pirsaeheb, H. Kim, H. Hossini, Occurrence of microplastic particles in the most popular Iranian bottled mineral water brands and an assessment of human exposure, *Journal of Water Process Engineering* 39 (2021) 101708. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101708>.

- [29] D. Schymanski, C. Goldbeck, H.-U. Humpf, P. Fürst, Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water, *Water Res* 129 (2018) 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.011>.
- [30] B.E. Oßmann, G. Sarau, H. Holtmannspötter, M. Pischetsrieder, S.H. Christiansen, W. Dicke, Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water, *Water Res* 141 (2018) 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.027>.
- [31] Y. Li, L. Peng, J. Fu, X. Dai, G. Wang, A microscopic survey on microplastics in beverages: the case of beer, mineral water and tea, *Analyst* 147 (2022) 1099–1105. <https://doi.org/10.1039/D2AN00083K>.
- [32] L. Lin, L.-S. Ma, H.-X. Li, Y.-F. Pan, S. Liu, L. Zhang, J.-P. Peng, L. Fok, X.-R. Xu, W.-H. He, Low level of microplastic contamination in wild fish from an urban estuary, *Mar Pollut Bull* 160 (2020) 111650. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111650>.
- [33] M. Smith, D.C. Love, C.M. Rochman, R.A. Neff, Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health, *Curr Environ Health Rep* 5 (2018) 375–386. <https://doi.org/10.1007/s40572-018-0206-z>.
- [34] Q. Li, Z. Feng, T. Zhang, C. Ma, H. Shi, Microplastics in the commercial seaweed nori, *J Hazard Mater* 388 (2020) 122060. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122060>.
- [35] L. Gutow, A. Eckerlebe, L. Giménez, R. Saborowski, Experimental Evaluation of Seaweeds as a Vector for Microplastics into Marine Food Webs, *Environ Sci Technol* 50 (2016) 915–923. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02431>.
- [36] D.G. Smith, *Beer: a global history*, Reaktion Books, 2014.
- [37] J. Leaderberg, M. Alexander, R.B. Bloom, A.D. Hopwood, R. Hull, H.B. Iglewski, I.A. Laskin, G.S. Oliver, M. Schaechter, C.W. Summers, eds., *Encyclopedia of Microbiology*, 2nd ed., Academic Press, 2000.
- [38] K.T. Nikolova, R. Gabrova, D. Boyadzhiev, E.S. Pisanova, J. Ruseva, D. Yanakiev, Classification of different types of beer according to their colour characteristics, *J*

- Phys Conf Ser 794 (2017) 012035. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/794/1/012035>.
- [39] I. Daňková, *Moderní trendy v technologii výroby piva*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, 2020.
- [40] J. Nerušilová, *Kvasná chemie a výroba piva*, Masarykova Univerzita v Brně, Brno, 2006.
- [41] L. Colen, J. Swinnen, Economic Growth, Globalisation and Beer Consumption, *J Agric Econ* 67 (2016) 186–207. <https://doi.org/10.1111/1477-9552.12128>.
- [42] World Population Review: Beer Consumption by Country 2020, (n.d.). <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/beer-consumption-by-country> (accessed November 10, 2023).
- [43] S. Huppertsberg, T.P. Knepper, Instrumental analysis of microplastics—benefits and challenges, *Anal Bioanal Chem* 410 (2018) 6343–6352. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1210-8>.
- [44] S. Jung, S.-H. Cho, K.-H. Kim, E.E. Kwon, Progress in quantitative analysis of microplastics in the environment: A review, *Chemical Engineering Journal* 422 (2021) 130154. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130154>.
- [45] C. Yuan, H. Almuhtaram, M.J. McKie, R.C. Andrews, Assessment of microplastic sampling and extraction methods for drinking waters, *Chemosphere* 286 (2022) 131881. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131881>.
- [46] Z.M. Wang, J. Wagner, S. Ghosal, G. Bedi, S. Wall, SEM/EDS and optical microscopy analyses of microplastics in ocean trawl and fish guts, *Science of The Total Environment* 603–604 (2017) 616–626. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.06.047>.
- [47] A. Hamilton, F. Quail, Detailed state of the art review for the different on-line/in-line oil analysis techniques in context of wind turbine gearboxes, in: *Proceedings of the ASME Turbo Expo, 2011*: pp. 971–988. <https://doi.org/10.1115/GT2011-46860>.
- [48] M.M. Mortula, S. Atabay, K.P. Fattah, A. Madbuly, Leachability of microplastic from different plastic materials, *J Environ Manage* 294 (2021) 112995. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112995>.

- [49] A. K ppler, D. Fischer, S. Oberbeckmann, G. Schernewski, M. Labrenz, K.-J. Eichhorn, B. Voit, Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both?, *Anal Bioanal Chem* 408 (2016) 8377–8391. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9956-3>.
- [50] T. Rocha-Santos, M.F. Costa, C. Mouneyrac, *Handbook of Microplastics in the Environment*, 2022.
- [51] J.-L. Xu, K. V. Thomas, Z. Luo, A.A. Gowen, FTIR and Raman imaging for microplastics analysis: State of the art, challenges and prospects, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 119 (2019) 115629. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115629>.
- [52] C.F. Araujo, M.M. Nolasco, A.M.P. Ribeiro, P.J.A. Ribeiro-Claro, Identification of microplastics using Raman spectroscopy: Latest developments and future prospects, *Water Res* 142 (2018) 426–440. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.060>.
- [53] A. Kudelski, Analytical applications of Raman spectroscopy, *Talanta* 76 (2008) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.02.042>.
- [54] D.L. Gerrard, P.R. Graves, D. Loudon, G. Turrell, S.-V. Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo, *Practical Raman Spectroscopy With Contributions by*, Springer-Verlag, 1989.
- [55] K. Z ruba, *Analytick  chemie. (2. d l)*, Praha: V SCHAT, 2016.
- [56] C.A. Peters, E. Hendrickson, E.C. Minor, K. Schreiner, J. Halbur, S.P. Bratton, Pyr-GC/MS analysis of microplastics extracted from the stomach content of benthivore fish from the Texas Gulf Coast, *Mar Pollut Bull* 137 (2018) 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.09.049>.
- [57] Z. Li, X. Wang, S. Liang, H. Li, L. Sun, Pyr-GC-MS analysis of microplastics extracted from farmland soils, *Int J Environ Anal Chem* 103 (2023) 7301–7318. <https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1969382>.
- [58] R. Gonzalez de Vega, S. Goyen, T.E. Lockwood, P.A. Doble, E.F. Camp, D. Clases, Characterisation of microplastics and unicellular algae in seawater by targeting carbon via single particle and single cell ICP-MS, *Anal Chim Acta* 1174 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338737>.

- [59] E. Bolea-Fernandez, A. Rua-Ibarz, M. Velimirovic, K. Tirez, F. Vanhaecke, Detection of microplastics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) operated in single-event mode, *J Anal At Spectrom* 35 (2020) 455–460. <https://doi.org/10.1039/c9ja00379g>.
- [60] S.R. Crouch, F.J. Holler, D.M. West, D.A. Skoog, *Analytická chemie*, 1st ed., VŠCHT, Praha, 2019.
- [61] K. Nováková, *Analýza mikroplastů Ramanovou mikroskopií*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 2023.
- [62] S. Schlindwein, *OPUS Release 8.7: Microscopy Spotlight*, BRUKER (2021). <https://www.opticsblog.bruker.com/opus-release-8-7-microscopy-spotlight/> (accessed April 15, 2024).