

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Mikroplasty a metody jejich analýzy

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Klára Nováková

Studijní obor: Chemie

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

2021 Olomouc

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Klára Nováková

Název práce: Mikroplasty a metody jejich analýzy

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra analytické chemie

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

Rok odevzdání práce: 2021

Anotace:

V této bakalářské práci jsou popsány základní vlastnosti mikroplastů a jejich rizika pro životní prostředí. Dále se práce věnuje metodám odběru vzorků a metodám analýzy mikroplastů. Experimentální část je zaměřená na analýzu mikroplastů v trávicích soustavách ryb, popisuje použité metody rozkladu biologických tkání a následné identifikace nalezených částic.

Klíčová slova: Mikroplasty, ryby, infračervená spektrometrie, rozklad biologických vzorků, kapr obecný, makrela obecná

Počet stran: 40

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Klára Nováková

Title: Microplastics and methods of their analysis

Type of thesis: bachelor's

Department: Department of Analytical Chemistry

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

The year of submission: 2021

Annotation:

This bachelor thesis describes the basic properties of microplastics and their risks to the environment. The thesis also deals with sampling methods and methods of analysis of microplastics. The experimental part is focused on the analysis of microplastics in the digestive tracts of fish as well as describes the methods used for the digestion of biological tissues and the following identification of the found particles.

Keywords: Microplastics, fish, infrared spectrometry, digestion of biological samples, carp, mackerel

Number of pages: 40

Language: Czech

Prohlášení:

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

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 Olomouci

.....

Podpis

Děkuji panu doc. Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za cenné rady, připomínky a podnětné návrhy při vedení a zpracování bakalářské práce.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část	9
2.1 Co jsou mikroplasty?	9
2.2 Zdroje mikroplastů	9
2.3 Vlastnosti mikroplastů	10
2.3.1 Velikost	10
2.3.2 Barva	10
2.3.3 Tvar.....	11
2.3.4 Druhy mikroplastů z chemického hlediska.....	11
2.3.5 Hustota	12
2.4 Bioplasty	12
2.5 Dopad mikroplastů na životní prostředí.....	13
2.5.1 Dopad mikroplastů na vodní živočichy	13
2.5.2 Látky uvolňující se z mikroplastů	14
2.5.3 Těžké kovy	14
2.5.4 Perzistentní organické látky	15
2.6 Odběr vzorku.....	15
2.6.1 Sníh a led.....	16
2.6.2 Mořská voda.....	16
2.6.3 Sladkovodní nádrže a toky.....	17
2.6.4 Sedimenty.....	17
2.6.5 Vzorky ryb	18
2.6.6 Ostatní biologické vzorky	18
2.7 Metody analýzy mikroplastů.....	19
2.7.1 Optické metody	19
2.7.2 Rastrovací elektronová mikroskopie	20
2.7.3 Pyrolýzní plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	20
2.7.4 Spektrometrie nukleární magnetické rezonance.....	21
2.7.5 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací.....	22
2.7.6 Ramanova spektrometrie.....	23
2.8 Mikroplasty v rybách.....	25
3. Experimentální část.....	27
3.1 Použité chemikálie.....	27
3.2 Přístroje	27

3.3	Další pomůcky.....	27
3.4	Vzorky ryb	27
3.5	Pracovní postup	28
3.5.1	Příprava vzorků	28
3.5.2	Rozklad vzorků pomocí tetramethylamoniumhydroxidu	28
3.5.3	Rozklad vzorků pomocí hydroxidu draselného.....	29
3.5.4	Vyhledávání podezřelých částic a jejich identifikace.....	30
4.	Výsledky a diskuse.....	31
4.1	Použité metody rozkladu	31
4.2	Nalezené podezřelé částice	31
4.3	Naměřená spektra.....	32
5.	Závěr.....	37
6.	Seznam použité literatury	38

1. Úvod

Za posledních několik desetiletí se plasty staly jedním z nejpoužívanějších materiálů. Nalezly uplatnění prakticky ve všech průmyslových odvětvích i v domácnostech. Jen v roce 2016 se jich vyrobilo 320 milionů tun. Odhaduje se, že každý rok do oceánu uniká 5 až 13 milionů tun plastů [1]. Vlivem slunečního záření, mikroorganismů a mechanických vlivů dochází k fragmentaci těchto plastů za vzniku mikroplastů. Tyto malé úlomky mohou být pozřeny mnoha vodními živočichy, kteří si je pletou s potravou. Mikroplasty mohou uvolňovat řadu látek, které se do plastových výrobků přidávají k vylepšení jejich vlastností. Mikroplasty na sebe rovněž adsorbují řadu škodlivých látek, včetně perzistentních organických látek jako jsou polychlorované bifenoly nebo polycyklické aromatické uhlovodíky. Ty se pak potravním řetězcem mohou dostat až k lidem.

Cílem této práce je seznámit čtenáře s vlastnostmi mikroplastů a jejich dopadem na životní prostředí, dále popsat metody odběru vzorků z jednotlivých oblastí životního prostředí a metody rozkladu biologických vzorků. Dalším cílem je popsat analytické metody sloužící k určení složení daného úlomku, především metody spektrální.

Hlavním cílem experimentální části této práce je provést analýzu mikroplastů v trávicích soustavách několika ryb pomocí infračervené spektrometrie. Zároveň je potřeba porovnat některé metody sloužící k rozkladu biologických vzorků a určit, která metoda je nejvhodnější k rozkladu vnitřností ryb, u kterých budou následně analyzovány mikroplasty.

2. Teoretická část

2.1 Co jsou mikroplasty?

Za mikroplasty jsou nejčastěji považovány kousky plastů menší než 5 mm [2,3,4]. Některé studie ovšem uvádějí i jiné rozsahy velikostí, například <1 mm, <2 mm, 2-6 mm a <10 mm [5].

Pojem mikroplast byl poprvé použit v roce 1968 v publikaci laboratoře amerického letectva. Tento pojem tehdy sloužil k popisu deformace plastových materiálů. V roce 1972 byly poprvé objeveny malé kousky plastů ve vodním prostředí, a to plovoucí na hladině Sargasového moře. V této době byly tyto kousky plastu nazývány jednoduše plastové částice. Pojem mikroplasty v současném významu byl použit až v roce 2004 vědci, kteří zkoumali kousky plastů na pláži v Plymouthu ve Velké Británii. Toto nové použití termínu mikroplast nakonec bylo vědeckou komunitou přijato [4].

Mikroplasty byly nalezeny v každém oceánu [1], na mnoha plážích na světě [6,7,8,9,10], v jezerech [11,12] i v řekách [13,14]. Bylo provedeno také mnoho studií, které zkoumaly mikroplasty v živočiších. Byly nalezeny v tělech ryb, želv, sépií, plžů i krevet [2, 3,15-17].

2.2 Zdroje mikroplastů

Mikroplasty se podle zdroje svého vzniku rozdělují do dvou skupin, a to na primární a sekundární mikroplasty. Primární mikroplasty mají již od svého vzniku milimetrové i menší rozměry. Využívají se ve výrobcích osobní hygieny, například v zubních pastách, v přípravcích na čištění pleti a v exfoliačních krémech. Odhaduje se, že 6 % výrobků na čištění pleti obsahuje mikroplasty, z nichž 93 % tvoří polyethylen. Mikroplasty se také mohou uvolňovat při tisku v 3D tiskárnách [5]. Malé plastové pelety jsou vyráběny jako primární surovina pro výrobu větších plastových výrobků. Tyto pelety se mohou dostat do životního prostředí odpadními rourami nebo náhodným únikem. Mezi primární mikroplasty se také řadí syntetická vlákna používaná k výrobě oděvů. Za jeden prací cyklus se z jednoho kusu oděvu uvolní až 2000 vláken [4].

Sekundární mikroplasty jsou nepravidelné fragmenty, které vznikají rozpadem větších plastových výrobků. K této fragmentaci přispívají vlivy fyzikální, biologické i chemické. Dochází například k abrazi plastového odpadu na skládkách a v recyklačních zařízeních, k uvolňování vláken z lan a rybářských sítí nebo k odlupování barev obsahujících syntetické polymery [5].

2.3 Vlastnosti mikroplastů

Jednotlivé mikroplasty se svými vlastnostmi mohou v mnoha ohledech lišit. Mohou mít například různou velikost, tvar, hustotu nebo barvu. Na tyto vlastnosti má vliv především chemické složení daného mikroplastu, míra vystavení UV záření a mechanické opotřebení vlivem prostředí a povětrnostních podmínek.

2.3.1 Velikost

Jak již bylo zmíněno výše, mikroplasty jsou kousky plastu, jejichž největší rozměr je menší než 5 mm. Kousky plastů větší než 5 mm a zároveň menší než 25 mm jsou nazývány mezoplasty, kusy plastů nad 25 mm jsou již považovány za makroplasty [18]. Někteří autoři dále rozlišují mini-mikroplasty s rozměry 1 μm – 1 mm a nanoplasty, které jsou menší než 1 μm [4]. Toto rozdělení je shrnuto v tabulce (Tab. I), ve které jsou rovněž uvedeny zkratky užívané pro jednotlivé kategorie.

Tabulka I - Rozdělení plastů podle velikosti

Kategorie	Zkratka	Rozměry
Makroplasty	MAP	≥ 25 mm
Mezoplasty	MEP	5 mm - 25 mm
Mikroplasty	MP	1 mm - 5 mm
Mini-mikroplasty	MMP	1 μm - 1 mm
Nanoplasty	NP	<1 μm

2.3.2 Barva

Do plastových výrobků je přidávána řada pigmentů, které slouží ke zlepšení jejich vzhledu, ke zvýšení odolnosti proti UV záření nebo jako zpomalovače hoření. Přestože mikroplasty nejsou jedinými barevnými částicemi v přírodě, jejich barevnost výrazně napomáhá při analýze k jejich odlišení od částic přírodního původu. Barva mikroplastů může taky posloužit jako ukazatel délky jejich pobytu na mořské hladině. Například pigmentované pelety postupně ztrácejí svou barvu a světlají. U některých mikroplastů můžeme podle stupně zežloutnutí nebo ztmavnutí odhadovat míru jejich fotooxidace [5].

Barva mikroplastů může rovněž ovlivňovat pravděpodobnost požití mikroplastů vodními živočichy. Některé komerčně významné ryby, které loví drobný zooplankton,

mohou pozřít mikroplasty podobné jejich kořisti. Nejčastěji se jedná o bílé a žluté mikroplasty. Zaměnit mikroplasty s potravou mohou také mnozí mořští bezobratlí [19]. Naopak u červených a černých mikroplastů je pravděpodobnost, že budou pozřeny vodními živočichy nejmenší.

Barva mikroplastů má také souvislost s kontaminací chemickými znečišťujícími látkami. Vědci našli největší množství těchto škodlivin na černých a žlutých mikroplastech [4].

2.3.3 Tvar

Mikroplasty v přírodě mají mnoho různých tvarů. Tvar každého kousku je závislý na původu mikroplastu, na délce pobytu v prostředí a na stupni degradace a eroze povrchu. U mikroplastů s ostrými hranami se předpokládá, že jsou v prostředí kratší dobu než mikroplasty s hranami zaoblenými. Není jasně stanovené rozdělení mikroplastů podle jejich tvaru, proto se jednotlivé kategorie u různých autorů liší. Nejčastěji používanými kategoriemi jsou fragmenty, vlákna, filmy a pelety. Pelety se dále mohou dělit na válcovité, diskovité, kuličkovité, ploché a vejčité [5].

2.3.4 Druhy mikroplastů z chemického hlediska

Mikroplasty mohou být tvořeny různými druhy polymerních materiálů. Nejčastěji nacházené jsou mikroplasty tvořené polyethylenem, což je rovněž světově nejvíce používaný syntetický polymerní materiál. Polyethylen (PE) se řadí mezi termoplasty a má nižší hustotu než voda. Podle míry krystalinity může být pružný (LDPE) nebo pevný (HDPE).

Dalším materiálem, který je hojně nacházen ve formě mikroplastů, je polypropylen (PP). Polypropylen je termoplast odolný proti účinkům většiny kyselin, hydroxidů a rozpouštědel. Vykazuje rovněž vysokou mechanickou a tepelnou odolnost.

Polyethylen tereftalát (PET) je velmi stabilní polyester, jehož používání v posledních desetiletích výrazně vzrostlo. Nejvíce je využíván na výrobu tzv. PET lahví, které mohou být recyklovány a použity například znovu na výrobu lahví nebo na výrobu fleecových vláken.

Mezi velmi rozšířený druh mikroplastů patří rovněž polystyren (PS). Polystyren se vyrábí ve dvou formách, jako pevný nebo napěněný. Napěněný polystyren se vyrábí zahříváním taveniny polystyrenu s pentanem. Polystyren je škodlivý pro životní prostředí i tím, že se z něj uvolňují zbytky nezreagovaného monomeru styrenu [4].

Polyethylen, polypropylen, polyethylen tereftalát a polystyren jsou nejčastější druhy plastů, které bývají ve formě mikroplastů nacházeny ve vodách i v trávicích soustavách živočichů [1,15,20,21]. Ve formě mikroplastů bylo nalezeno mnoho dalších druhů plastů, například polyvinylchlorid (PVC), polymethylmethakrylát (PMMA), akrylonitrilbutadienstyren (ABS), polyakrylamid a kopolymer polyethylenu a polypropylenu [20].

2.3.5 Hustota

Hustota mikroplastů má zásadní vliv na jejich rozložení ve vodním prostředí. Mohli bychom očekávat, že mikroplasty plovoucí na hladině budou mít nižší hustotu než voda. Naopak u mikroplastů s vyšší hustotou bychom očekávali, že se budou držet v sedimentech u dna. Tato tvrzení ovšem neodpovídají experimentu, na mořské hladině byly nalezeny mikroplasty s vyšší hustotou, než jaká je hustota mořské vody. Existují dvě hlavní příčiny tohoto jevu. Zprvce to může být způsobeno pohybem vody nahoru a dolů vlivem rozdílných teplot v různých hloubkách. Druhým důvodem je, že mikroplasty mohou obsahovat vzduchové kapsy, díky kterým se vznášejí na hladině.

U některých mikroplastů může také docházet ke zvýšení jejich hustoty, což může vést k jejich potopení ke dnu. Vlivem povětrnostních podmínek dochází k otěru mikroplastů, tvoří se různé důlky a na jejich povrchu se tvoří praskliny. V těchto dutinách se usazuje různý znečišťující materiál, například biomasa, což vede ke zvýšení hustoty [4].

Hustota je využívána při extrakci mikroplastů ze vzorků sedimentů, neboť sedimenty mají mnohem vyšší hustotu než mikroplasty. Využívá se roztok NaCl, NaI nebo $ZnCl_2$ s následnou centrifugací. Sediment se usadí a mikroplasty zbydou v supernatantu. Výhodami této metody jsou minimální finanční náklady, rychlost a minimální potřebné vybavení [5].

Hustota mikroplastů má vliv na jejich rozložení ve vodním sloupci, proto se může druh požitého plastu u jednotlivých živočišných druhů lišit. Organismy živící se planktonem a filtrátoři, kteří žijí v horní části vodního sloupce se pravděpodobně setkají spíše s plasty s nižší hustotou, které plavou na hladině. Naopak znečištěné mikroplasty a ty s vysokou hustotou mohou být požity organismy živícími se organickými zbytky ze dna [19].

2.4 Bioplasty

V současné době je velká pozornost věnována tzv. bioplastům. Jako bioplasty jsou označovány polymerní materiály, které jsou získávány z biomasy, nebo jsou biologicky

rozložitelné, popřípadě obojí. Jako surovina pro výrobu bioplastů je používána například rýže, kukuřice, brambory, sójové boby, celulóza, bagasa nebo tapioka. Jako biologicky rozložitelné se označují plasty, které jsou působením mikroorganismů rozkládány na vodu, oxid uhličitý, kompost a bioplyn. Biologicky rozložitelné plasty mohou být vyrobeny z obnovitelných zdrojů nebo z fosilních surovin.

Bioplasty lze podle surovin použitých k výrobě a podle biologické rozložitelnosti rozdělit do tří skupin:

- A. Vyrobené z biologických materiálů a biologicky rozložitelné.** Do této skupiny se řadí kyselina polyléčná (PLA), polyhydroxyalkanoáty (PHA), acetát celulózy (CA) a polybutylen sukcinát (PBS).
- B. Vyrobené z biologických materiálů (úplně nebo částečně) a biologicky nerozložitelné.** Do této skupiny se řadí běžné materiály jako je polyethylén (bioPE), polyethylén tereftalát (bioPET), polypropylén (bioPP) nebo polyuretany. Musí být ovšem vyrobeny z obnovitelných zdrojů.
- C. Vyrobené z fosilních surovin a biologicky rozložitelné.** Zde patří například polybutylen adipát tereftalát (PBAT) a polykaprolakton (PCL).

Bioplasty mají oproti běžným plastům řadu výhod. Při výrobě bioplastů vzniká méně skleníkových plynů, výroba bioplastů má tedy menší uhlíkovou stopu. Suroviny po recyklaci produktu mohou být využity k přípravě nových výrobků, nebo jako zdroj energie. Používání bioplastů rovněž vede ke snížení množství odpadu [22].

2.5 Dopad mikroplastů na životní prostředí

Samotné plastové materiály jsou obvykle biochemicky inertní, ale jejich akumulace v tělech živočichů může vést k jejich fyzickému poškození. Do plastů je při výrobě přidávána řada aditiv, které slouží k vylepšení jejich vlastností. Ty se mohou následně uvolňovat do životního prostředí. Naopak mnoho nebezpečných látek se může adsorbovat na povrch mikroplastů [4].

2.5.1 Dopad mikroplastů na vodní živočichy

Mikroplasty pozřené vodními živočichy mohou blokovat jejich trávicí soustavu, což může vést k hladovění i smrti. Dále může docházet ke vzniku odřenin způsobených ostrými částicemi. Mezi další předpokládané dopady patří snížená produkce enzymů, snížená rychlost růstu, snížená hladina steroidních hormonů, opožděná ovulace a snížené

reprodukční schopnosti. Mikroplasty mohou rovněž projít buněčnou membránou a začlenit se do tělesných tkání.

Mikroplasty mohou výrazně ovlivňovat mořské živočichy i v případě, že nebudou pozřeny. Bylo zjištěno, že slouží jako nové stanoviště pro organismy žijící na pevných plovoucích předmětech. Například mořský hmyz *Halobates sericeus* je nyní schopen se více množit, protože klade vajíčka na plovoucí mikroplasty. Změny populace tohoto druhu mohou ovlivnit celý ekosystém. Organismy na mikroplastech mohou být navíc přepravovány na velké vzdálenosti, což vede k biogeografickým změnám [19].

2.5.2 Látky uvolňující se z mikroplastů

Většina plastových materiálů dnes obsahuje mnoho aditiv, které nejsou k danému polymeru vázány chemickou vazbou a mohou se snadno uvolňovat do životního prostředí. Tato aditiva se řadí do několika skupin, např. změkčovadla, zpomalovače hoření, stabilizátory, antistatika a pigmenty. Většina běžně používaných aditiv jsou lipofilní, takže mohou pronikat buněčnou membránou a účastnit se biochemických reakcí.

Při výrobě plastů může také docházet k tomu, že polymerizace nebude úplná a výsledný plastový výrobek bude obsahovat nezreagované monomery, které se rovněž mohou uvolnit. Toxické monomery uvolňující se z polyvinylchloridu, polystyrenu a polykarbonátu jsou spojovány s vývojem reprodukčních poruch a rakoviny u bezobratlých, hlodavců i lidí [5].

2.5.3 Těžké kovy

Těžké kovy jsou z fyzikálního hlediska kovy o hustotě větší než $4,5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Někdy se do tohoto pojmu zahrnují všechny biologicky účinné kovy, včetně některých lehkých kovů (např. hliník) nebo polokovů (např. arsen). Nejčastěji sledovanými těžkými kovy v souvislosti s životním prostředím jsou Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb a Zn [23].

Byla provedena řada studií zabývajících se adsorpcí těžkých kovů na povrchu mikroplastů. Bylo prokázáno, že k adsorpci dochází za laboratorních podmínek i v přírodních vodách. Například při analýze mikroplastů z řeky Musi v Indonésii zjistili výrazně vyšší koncentraci mědi a olova na mikroplastech, než v okolní vodě [24]. Ve studii [25] je popsána spojitost mezi stářím mikroplastů a adsorpcí těžkých kovů. Bylo zjištěno, že starší mikroplasty (déle vystaveny UV záření) adsorbují těžké kovy více než mikroplasty původní.

2.5.4 Perzistentní organické látky

Perzistentní organické polutanty (POPs) jsou organické látky s toxickými vlastnostmi, které jsou odolné vůči biochemickému, chemickému, fotochemickému i termickému rozkladu. Patří mezi ně řada pesticidů (např. DDT, aldrin, chlordan), průmyslové chemikálie (polychlorované bifenyly, hexachlorbenzen) a nežádoucí vedlejší produkty (polychlorované dibenzo-p-dioxiny, polychlorované dibenzofurany, polycyklické aromatické uhlovodíky). Tyto látky mají schopnost bioakumulace, to znamená, že se hromadí v živých organismech. Potravním řetězcem se mohou dostat až k lidem, což může vést k vážnému poškození zdraví. Mnohé perzistentní organické látky mohou poškozovat vnitřní orgány, porušovat dýchací, nervový a imunitní systém, způsobovat reprodukční poruchy a narušovat hormonální rovnováhu [26].

Perzistentní organické látky mají schopnost se adsorbovat na povrchu mikroplastů. Některé mikroplasty jsou tvořeny polárními plasty (např. polykarbonát, polyamid, polymethylmethakrylát), zatímco jiné jsou nepolární (např. polyethylen, polystyren, polypropylen). Čím více je daný mikroplast nepolární, tím vyšší bude mít afinitu k hydrofobním perzistentním organickým látkám. Adsorpce rovněž závisí na velikosti povrchu adsorbentu. Čím větší je povrch mikroplastu, tím více je dostupných míst pro adsorpci. Proto jsou velmi problematické malé částice plastů, protože ty mají při stejném celkovém objemu jako jeden velký kus plastu mnohem větší povrch. U malých částic je také větší pravděpodobnost, že budou požřeny vodními živočichy [4].

2.6 Odběr vzorku

Analýza mikroplastů začíná odběrem vzorku. Výběr metody odběru vzorku je ovlivněn mnoha faktory, přičemž nejdůležitější roli hraje matrice (voda, půda, sedimenty, vzduch, živočichové). Mezi další faktory patří reprodukovatelnost, cenová náročnost a snaha o co nejmenší kontaminaci. Jsou využívány tři základní metody odběru vzorku mikroplastů, z nichž každá má své výhody i nevýhody:

- A. **Selektivní odběr vzorku.** Při selektivním odběru vzorku jsou sbírány mikroplasty viditelné pouhým okem. Využívá se především při odběru vzorku ze sedimentů. Nevýhodou této metody je, že některé částice mohou být přehlídny a lze takto sbírat jen kousky větší než 1 mm.
- B. **Odběr vzorku se snižováním objemu.** Při tomto typu odběru vzorku se velká část vzorku vyřazuje a ponechávají se pouze ty části, které jsou předmětem našeho zájmu.

Odběr vzorku se snižováním objemu se využívá především pro odběr vzorků z povrchové vody. Nevýhodou této metody je, že při snižování objemu může docházet ke ztrátám mikroplastů.

- C. **Hromadný odběr vzorku.** Při hromadném odběru vzorku je sbírán celý vzorek bez snižování objemu. Výhodou této metody je, že ve vzorku jsou všechny mikroplasty bez ohledu na jejich velikost. Se vzorkem je rovněž méně manipulováno, což vede k menší kontaminaci. Množství odebraného vzorku je ovšem z praktických důvodů značně limitováno [4].

Při vzorkování je velmi důležité snažit se zabránit kontaminaci vzorku. Je doporučováno před analýzou umýt všechno vybavení a zavírat vzorky i vybavení, když zrovna nejsou používány. Také je velmi důležité zabránit, aby se do vzorku dostala vlákna z oděvu. Tomu se dá předejít nenošením syntetického oblečení při vzorkování a manipulaci se vzorkem [1]. Někteří autoři při analýze mikroplastů používali nitrilové rukavice [3, 7]. Jako kontrolu kontaminace lze provést slepý pokus [5].

2.6.1 Sníh a led

Sníh i led obsahuje obvykle velmi málo organické hmoty a jiných pevných částic, proto je příprava vzorku před analýzou velmi jednoduchá a přímočará. Odebraný vzorek se nechá roztát a dále je s ním nakládáno jako se vzorkem vody. Výskyt mikroplastů v ledovcích není příliš veliký, protože se obvykle nacházejí daleko od hlavních zdrojů znečištění. Při vzorkování je proto nutné odebrat velké množství vzorku [5].

2.6.2 Mořská voda

Většina v literatuře popsaných odběrů vzorků pro analýzu mikroplastů byla provedena z prostředí moří a oceánů. Vzhledem k jejich rozlehlosti se nejčastěji využívá odběr vzorku se snižováním objemu [4]. Hromadný odběr vzorku byl využit například při analýze mikroplastů v Baltském moři, přičemž každý odebíraný vzorek měl objem 5 litrů [27].

Vzorky mohou být odebírány z mořské hladiny nebo z vodního sloupce. Pro odběr vzorku mikroplastů z povrchových vod se nejčastěji používá neustonová síť, jejíž původní účel je sběr drobných živočichů, žijících na hladině nebo těsně pod ní. Velikost ok sítě se pohybuje v rozmezí 53 μm až 3 mm, přičemž nejčastější rozměr je 333 μm [4]. Na otevřeném moři se často využívají vlečné sítě nebo katamarány, které jsou obvykle vlečeny rychlostí 1 až 5 uzlů a jsou vybaveny průtokoměrem [5].

Existují dva způsoby odebírání vzorku z vodního sloupce, a to horizontální a vertikální. Při podpovrchovém horizontálním vzorkování se síť spustí do určité hloubky, kde je konstantní rychlostí po stanovenou dobu vlečena a poté vytažena z vody. Tímto způsobem lze sledovat rozložení mikroplastů v různých hloubkách. Při vertikálním odběru lze použít síť, která je konstantní rychlostí vytahována z určité hloubky. Další možností je použít více uzavíratelných sítí, přičemž každá je otevřená jen určitý úsek vodního sloupce. Lze také použít hromadný odběr vzorku s následnou filtrací, nebo vodní čerpadlo [4].

2.6.3 Sladkovodní nádrže a toky

Při odběru vzorků z jezer, rybníků a přehrad se využívá podobných metod jako při vzorkování z moří. Nejčastěji se používají sítě s velikostí ok 300-800 μm [4]. Jiný způsob odběru vzorku byl využit při analýze vody z jezera Wuliangsuhai v Číně. Vzorky vody odebírali nerezovými kbelíky a ihned filtrovali přes síto (75 μm). Zbytky zachycené na sítu poté opláchli ultračistou vodou do skleněné lahve a uschovali k analýze [11].

Rozložení mikroplastů v řekách a jiných vodních tocích je silně ovlivněno vodním proudem a tvarem koryta vodního toku. Zpravidla je však větší výskyt mikroplastů uprostřed koryta řeky než u břehů. Na množství mikroplastů má vliv také roční období, a to především v oblastech, kde se střídá období dešťů a období sucha. Na tyto skutečnosti je třeba pamatovat při volbě místa a času vzorkování.

Nevýhodou oproti vzorkování z moře je, že voda ze sladkovodních toků obsahuje více organických zbytků z okolní vegetace [4].

2.6.4 Sedimenty

K získání reprezentativního vzorku ze sedimentů je vhodné využít hromadného vzorkování. Tento typ vzorkování ovšem vede ke sběru mnoha nechtěného materiálu, proto bývá hmotnost vzorku často redukována. To je prováděno proséváním suchého sedimentu na vzduchu nebo mokrého sedimentu pod vodou, což ovšem vede k zisku mikroplastů jen určitých velikostí. Další možností odběru vzorku používanou především u sedimentů na pobřeží je vizuální identifikace spojená s ručním tříděním. Tato metoda může vést k velkým chybám, protože úplně zanedbává mini-mikroplasty, které reprezentují 35-90 % všech mikroplastů v prostředí moří [4].

Vzorky sedimentů by neměly být odebírány plastovými lopatkami a do plastových nádob, aby nedocházelo ke kontaminaci [5]. Používají se nerezové lopatky a skleněné láhve [6] nebo papírové sáčky [8].

Při vzorkování sedimentů je nutné zaznamenat plochu, ze které byl vzorek odebrán (cm^2), nebo objem sedimentu (m^3) [5]. Někdy se také udává hmotnost odebraného sedimentu (g nebo kg). Toto užívání rozdílných jednotek vede ke komplikacím při porovnávání výsledků různých studií [4].

2.6.5 Vzorky ryb

Mikroplasty se nejčastěji do těl ryb dostávají pozřením, ačkoli za potenciální cestu vstupu je považováno i dýchání [5]. Z tohoto důvodu jsou nejčastěji studovány trávicí soustavy ryb, popřípadě žábry. Tyto orgány jsou zpravidla odděleny od zbytku ryby a podrobeny rozkladu.

Ve studii [28], ve které byly analyzovány mikroplasty v trávicích soustavách i žábrách ryb, použili k rozkladu organické tkáně 200 ml 10% roztoku hydroxidu draselného. Vzorky s hydroxidem byly zahřívány na 60 °C po dobu 24-48 hodin. Poté byl roztok dekantován a přefiltrován přes membránový filtr.

Velmi podobný postup byl zvolen ve studii [29], kde byl rovněž využit 10% hydroxid draselný a vzorek byl zahříván po dobu 24 hodin rovněž na teplotu 60 °C. Poté byl vzniklý roztok ponechán 24-48 hodin při pokojové teplotě. Po úplném rozkladu bylo přidáno 800 ml roztoku chloridu sodného o koncentraci $140 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a roztok byl ponechán 24 hodin při pokojové teplotě, aby došlo k vyplavání mikroplastů na hladinu. Poté byl supernatant přefiltrován přes filtr ze skleněných mikrovláken.

Kromě hydroxidu draselného lze využít rovněž hydroxid sodný, který byl využit například ve studii [30]. Studované trávicí soustavy byly nejprve sušeny 1 hodinu v sušárně při 60 °C. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 30 ml hydroxidu sodného a tato směs bylo ponechána tři dny při pokojové teplotě. Rozložený vzorek byl přefiltrován přes nerezové síto a zachycené částice byly vymyty do Petriho misky.

Ve studii [31] byla rozkládána celá těla ryb pomocí peroxidu vodíku, ovšem průměrná délka ryb byla jen 1,75 cm. Ryby byly nejprve sušeny 24 hodin při 60 °C, poté bylo přidáno 5-10 ml 30% peroxidu vodíku a tato směs byla ponechána přes noc. Poté byly vzorky zahřívány na 60 °C na vodní lázni po dobu 36-48 hodin nebo dokud vzorek nebyl čirý. Rozložený vzorek byl poté přefiltrován přes filtrační papír.

2.6.6 Ostatní biologické vzorky

Mikroplasty mohou být pozřeny rovněž mlži, korýši, mořskými savci a ptáky. Většina studií se zaměřuje na analýzu střevního obsahu, mini-mikroplasty ovšem byly nalezeny

i ve tkáních. K oddělení mikroplastů od vzorku se využívá především vizuální detekce nebo chemický rozklad biologického materiálu.

Při vizuální detekci je obvykle vzorek sledován optickým mikroskopem a nalezené mikroplasty jsou vybírány pomocí pinzety. Rovněž je možné vymývat vzorek destilovanou vodou a poté pozorovat vodu s případnými mikroplasty v Petriho misce. Nevýhodou této metody je, že mini-mikroplasty mohou být přehlédnuty [4].

Další možností je rozložit tkáň působením kyselin, hydroxidů nebo enzymů. Hydroxid sodný byl použit při analýze mikroplastů v krevetách, přičemž roztok o koncentraci $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ nechali působit 12 hodin při $60 \text{ }^\circ\text{C}$ [3]. Další často využívanou bází je hydroxid draselný. 10% hydroxid draselný byl použit k oddělení mikroplastů z trávicí soustavy ptáků. Vzorek s hydroxidem byl umístěn na 48 hodin do inkubátoru při $65 \text{ }^\circ\text{C}$ a poté ponechán 24 hodin při pokojové teplotě [32]. Ve studii [33], ve které analyzovali mikroplasty ve šnečích, bylo porovnáváno, zda je lepší využít k rozkladu jejich těl 30% peroxid vodíku nebo kyselinu dusičnou o koncentraci $22,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Reakce s peroxidem vodíku byla velmi bouřlivá, vznikalo mnoho pěny a samotný rozklad trval velmi dlouho, proto bylo rozhodnuto, že je vhodnější použít kyselinu dusičnou. Kyselina dusičná byla rovněž použita při analýze mikroplastů z trávicích soustav mořských želv, přičemž následně použili laurethsulfát sodný k odstranění mastných zbytků [2]. Rozklad pomocí enzymu je popsán ve studii [16], kde použili proteinázu K k rozkladu tkání sépií.

2.7 Metody analýzy mikroplastů

Po odběru a úpravě vzorku zpravidla následuje detekce a kvantifikace mikroplastů. Nejčastěji je využívána vizuální detekce možných mikroplastů, následována potvrzením jejich struktury například pomocí spektrálních metod [1].

2.7.1 Optické metody

Vzorek může být prozkoumán pouhým okem nebo za použití optického mikroskopu. Optické metody se používají k určení barvy, tvaru, struktury povrchu a dalších charakteristik, které mohou napovědět, zdali se jedná o mikroplast [1]. Nalezené mikroplasty mohou být odděleny od ostatních nečistot pomocí pinzety [4]. Jedná se o velmi rychlou, jednoduchou a levnou metodu, ale je velmi obtížné rozeznat mikroplasty od jiných částic [1]. Mikroplasty mohou být přehlédnuty vlivem jejich průhlednosti nebo vlivem organického materiálu nahromaděném na jejich povrchu. Abychom tomuto zabránili je potřeba vzorek prohledávat pečlivě a metodicky. Protože u optických metod dochází k záměně mikroplastů

za jiné částice poměrně často, jsou tyto metody obvykle doprovázeny dalšími technikami, pomocí kterých se určí složení jednotlivých částic [4]. Za tímto účelem se nejčastěji používají spektrální metody, například infračervená spektrometrie nebo Ramanova spektrometrie [1].

V některých případech, zvláště pokud není k dispozici potřebná instrumentace, lze optické metody využít jako jedinou metodu k identifikaci mikroplastů. K ověření, zdali je nalezená částice skutečně mikroplastem lze využít test horkou jehlou. Při tomto testu je horký konec jehly přikládán k jednotlivým částicím a je sledováno, zdali se zkoumaná částice při zahřátí rozpustí. Touto metodou ovšem nelze určit druh polymeru [1].

2.7.2 Rastrovací elektronová mikroskopie

Rastrovací (skenovací) elektronový mikroskop (SEM) slouží k zobrazování povrchu vzorků. Na povrch vzorku se nechá dopadat úzký proud elektronů, který se pohybuje v pravoúhlém rastru [34]. Dochází k elastickému odrazu elektronů od vzorku, ty jsou zaznamenány detektorem a převedeny na signál. U prvků s vyšším protonovým číslem dochází k produkování více těchto zpětně odražených elektronů, což se na výsledném snímku projeví světlejším odstínem. U většiny elektronů nedochází k elastickému odrazu, může docházet k vyražení elektronů ze vzorku, tzv. sekundárních elektronů, nebo k emisi rentgenového záření [4]. Sekundární elektrony vznikají těsně pod povrchem a jsou velmi důležité při určování obrazu povrchu vzorku. Pokud je k dispozici vhodný detektor rentgenového záření, můžeme získat informaci o prvkovém složení vzorku [34].

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) poskytuje velmi jasné obrázky mikroplastů s velkým zvětšením. Tuto metodu lze využít ke sledování změn mikroplastů v životním prostředí, lze sledovat jednotlivé praskliny a důlky v jejich povrchu. Pokud je k dispozici energiově disperzní analyzátor (EDS) k detekci rentgenového záření, můžeme odlišit mikroplasty obsahující uhlík od anorganických částic. Nevýhodou této metody je pracnost přípravy vzorků a velká časová náročnost. Touto metodou také nelze určit barvu částic [1].

2.7.3 Pyrolýzní plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Pyrolýzní plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Pyr-GC-MS) je vhodná metoda k analýze syntetických polymerů i kopolymerů [5]. Vzorek je zahříván v inertní atmosféře nebo ve vakuu a dochází k tepelnému rozkladu makromolekulárních

látek na molekuly s nižšími molárními hmotnostmi [4]. Produkty pyrolýzy jsou separovány pomocí chromatografické kolony a detekovány hmotnostním spektrometrem. Složení produktů pyrolýzy a z něj i původního vzorku lze získat interpretací spektra nebo porovnáním s knihovnou spekter. Podle účelu analýzy lze využít kromě hmotnostního spektrometru i jiné detektory [5].

Nevýhodou této metody je, že se jedná o metodu destruktivní a se vzorkem již nejde provádět žádné další analýzy. Analýza velkého množství mikroplastů je limitována tím, že každý vzorek musí být manuálně přemístěn do přístroje a analyzován zvlášť. Limitován je rovněž rozsah velikostí takto studovaných mikroplastů. Velkou výhodou pyrolýzní plynové chromatografie je, že vyžaduje jen minimální předúpravu vzorku. Například vzorek sedimentů, u kterého je podezření, že obsahuje mikroplasty, stačí nejprve extrahovat organickým rozpouštědlem, aby došlo k odstranění nízkomolekulárních látek, a poté může být přímo umístěn do vzorkovací komory. Další výhodou této metody je, že kromě informace o druhu polymeru můžeme současně identifikovat i případná aditiva [4].

2.7.4 Spektrometrie nukleární magnetické rezonance

Při spektrometrii nukleární magnetické rezonance (NMR) dochází k získání informací o chemickém okolí jader pomocí sledování chování jader vystavených současně magnetickému poli a elektromagnetickému záření [4].

Jednou z kvantových vlastností protonů a neutronů je jejich spin, a pro tyto částice má hodnotu $s = 1/2$. Výsledkem vzájemného působení spinů protonů a neutronů v jádře je jaderný spin I . U jader se sudým počtem protonů i neutronů má jaderný spin hodnotu 0, pro jádra s lichým počtem protonů i neutronů nabývá hodnot 1,2,3, ... a pro jádra, kde je počet protonů sudý a neutronů lichý nebo naopak, nabývá jaderný spin hodnot $1/2, 3/2, 5/2, \dots$. Magnetickou rezonanci lze měřit pouze u nuklidů, u kterých je hodnota jaderného spinu různá od nuly. S jaderným spinem souvisí magnetické kvantové číslo jader, které nabývá hodnot $m_I = -I, -I+1, \dots, I$.

S nenulovým spinem jader je spojen jaderný magnetický moment μ , jehož směr je v prostředí bez vnějšího magnetického pole náhodný. Při působení vnějšího magnetického pole dochází ke štěpení energetických hladin jader. Jaderné magnetické momenty jádra s magnetickým kvantovým číslem $1/2$ jsou orientovány souhlasně se směrem magnetické indukce, čemuž odpovídá tzv. základní stav. Naopak u jader s magnetickým kvantovým číslem $-1/2$ jsou jaderné magnetické momenty orientovány nesouhlasně vzhledem ke směru magnetické indukce, čemuž odpovídá excitovaný stav [35].

Rozdíl energií mezi základním a excitovaným stavem je velmi malý a je závislý na síle vnějšího magnetického pole. Počet jader v základním a excitovaném stavu lze popsat pomocí Boltzmannova rozdělení. Z něj lze vypočítat, že při pokojové teplotě bude o něco více jader v základním stavu než ve stavu excitovaném. Pokud je jádro v základním stavu vystaveno elektromagnetickému záření odpovídajícímu rozdílu energetických hladin, dojde k absorpci tohoto záření a přechodu jádra do excitovaného stavu. Energetický rozdíl mezi základním a excitovaným stavem obvykle odpovídá frekvenci 20-1000 MHz.

Spektrometrie nukleární magnetické rezonance je velmi užitečná technika, pomocí které lze určit chemickou strukturu polymerních řetězců mikroplastů. Tato metoda může také sloužit k určení stupně krystalinity a k získání informací o větvení a takticitě daného polymeru. Pomocí této metody lze rovněž detekovat chemické změny v plastových materiálech, například oxidační stavy [4].

2.7.5 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) je nejčastěji užívanou metodou ke zjištění druhu polymeru, kterým je mikroplast tvořen. Vzorek je ozařován infračerveným zářením a část fotonů je vzorkem absorbována, zatímco jiná část se vzorkem neinteraguje a prochází přímo skrz něj. Molekuly, které absorbují fotony, získají energii a dojde ke změně jejich rotačních a vibračních stavů. Infračervená spektrometrie je tedy metoda, která sleduje, při kterých vlnových délkách vzorek absorbuje infračervené záření a na základě výsledného spektra je možné získat informace o molekulách přítomných ve vzorku. Protože každý druh plastu má jedinečné uspořádání atomů, žádné dva druhy polymerů nebudou poskytovat stejné spektrum.

Infračervená spektrometrie může být problematická z hlediska přípravy vzorků. Například transmisní měření vyžaduje, aby byl vzorek dostatečně průhledný, aby infračervené záření mohlo procházet skrz vzorek. U mnoha polymerů je toto nedosažitelné a je třeba vzorek upravit [4].

Jednou z možností úpravy vzorku je lisování KBr tablet. Vytvoří se homogenní směs bromidu draselného se vzorkem, která je slisována na tabletu a umístěna do speciálního držáku. Bromid draselný je využíván proto, že obsahuje iontovou vazbu a v důsledku toho jen velmi málo absorbuje infračervené záření. Získaná KBr tableta může obsahovat směs více polymerů, písek a další nečistoty. Výsledné spektrum bude obsahovat signály všech těchto materiálů. Interpretace takového spektra bude velmi obtížná a nebude možné klasické porovnání s knihovnou spekter. Další nevýhodou je časová náročnost této techniky [5].

K analýze mikroplastů je často používána technika zeslabeného úplného odrazu – ATR (Attenuated Total Reflectance). Při této technice musí být vzorek v těsné blízkosti krystalu, který je obvykle složen z germania, diamantu nebo selenidu zinečnatého (ZnSe) [4]. Paprsek infračerveného záření je veden krystalem a na jeho vnitřním okraji je odražen. Velmi malé množství infračerveného záření proniká do vzorku mikroplastu přitlačeného na krystal a interaguje s ním. Neabsorbované záření je odraženo zpět do ATR krystalu a vedeno do detektoru. V porovnání s technikou KBr tablet je příprava vzorku minimální a mnohé částice mohou být analyzovány přímo. Některé mikroplasty jsou pokryty vrstvičkou biofilmu nebo jiných kontaminantů. U těchto částic je nízká hloubka průniku infračerveného záření nevýhodou, protože výsledné spektrum může být silně rušeno cizími signály. Řešením je odstranit tyto nečistoty ultrazvukem, peroxidem vodíku, kyselinou chlorovodíkovou, hydroxidem sodným nebo lze vnější vrstvu odříznout.

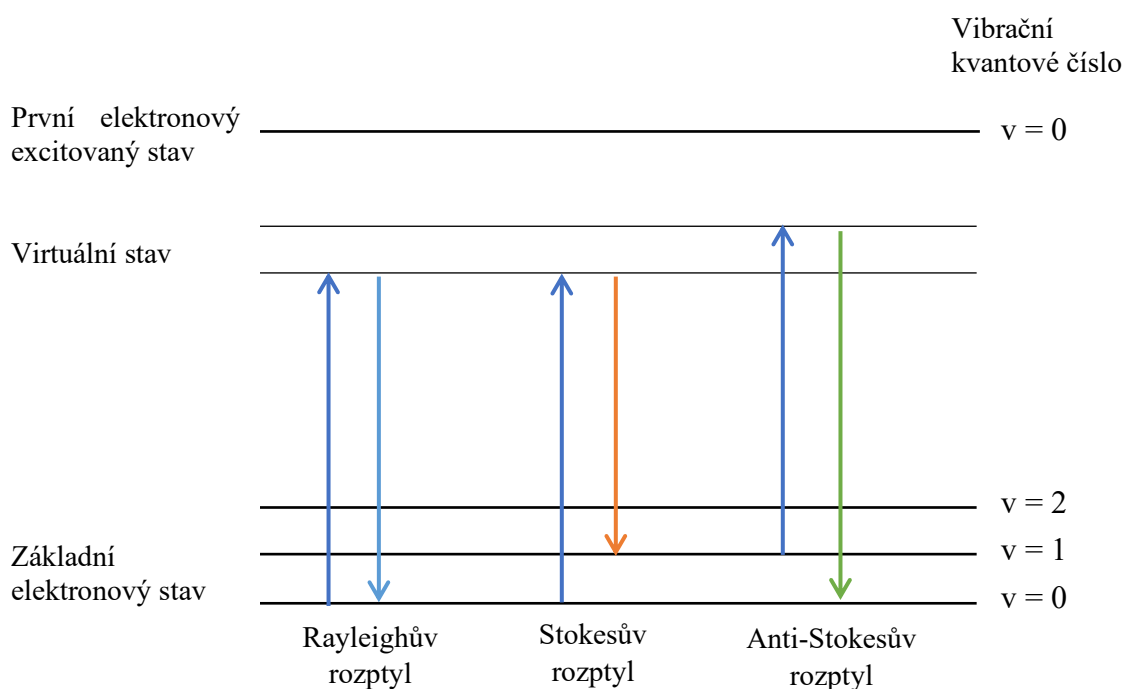
Pro mikroplasty, které jsou příliš malé, než aby je bylo možné analyzovat technikou ATR, lze použít metodu difuzní reflexe – DRIFTS (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy). Vzorek je smíchán s bromidem draselným a touto směsí prochází paprsek infračerveného záření, který s mikroplasty interaguje. V porovnání s technikou KBr tablet je to metoda méně časově náročná, ale také méně citlivá a při analýze mikroplastů není příliš využívána [5].

Jakmile je získáno infračervené spektrum, může být porovnáno s databází spekter k určení druhu polymeru. Různá spektra pro stejný druh plastu se mohou mírně lišit, například vlivem nečistot. Vzorek musí být také dostatečně suchý, jinak bude ve spektru výrazný signál okolo 3300 cm^{-1} , který může zakrýt jiné píky. Někdy může být ve spektru i signál oxidu uhličitého. Nekvalitní signály ve spektru mohou poskytnout také zvětralé mikroplasty. V důsledku těchto nesrovnalostí je doporučeno přijímat spektra, která mají s referenčním spektrem z elektronické databáze podobnost větší než 70 %. Spektra s podobností 60-70 % by měla být interpretována ještě manuálně a spektra s podobností menší než 60 % by měla být zamítnuta [4].

2.7.6 Ramanova spektrometrie

Ramanova spektrometrie je technika založená na neelastickém rozptylu světla. Vzorek je ozařován monochromatickým zářením, dochází k absorpci dopadajícího fotonu a přechodu do virtuálního stavu. Tento stav okamžitě zaniká a dochází k emisi fotonu. Foton může být rozptýlen elasticky (Rayleighův rozptyl) nebo neelasticky (Ramanův rozptyl) [5]. Většina rozptýleného záření je ve formě Rayleighova rozptylu a rozptýlené fotony mají stejnou

frekvenci jako fotony dopadající na vzorek. K Ramanovu rozptylu dochází v průměru pouze u jednoho fotonu z 30 miliónů fotonů [4]. Energetický rozdíl mezi původními a neelasticky rozptýlenými fotony se nazývá Ramanův posun. Pokud mají rozptýlené fotony nižší energii než fotony dopadající na vzorek, jedná se o Stokesův posun, pokud mají rozptýlené fotony energii vyšší, nazývá se tento jev anti-Stokesův posun. Princip Rayleighova, Stokesova a anti-Stokesova rozptylu je znázorněn na obrázku (Obr. 1). Ramanovo spektrum je obvykle zaznamenáváno ve Stokesově oblasti, protože anti-Stokesova oblast poskytuje stejné informace, ale s menší citlivostí [5].



Obrázek 1- Schematické znázornění Rayleighova, Stokesova a anti-Stokesova rozptylu.

Energetická změna mezi dopadajícím a rozptýleným zářením je charakteristická pro jednotlivé typy vazeb, se kterými záření interaguje. Z Ramanova spektra můžeme získat informace o struktuře molekul vzorku a rovněž jej můžeme porovnat s referenčními Ramanovými spektry, a tím identifikovat druh polymeru ve vzorku. Ramanova spektrometrie je vhodná k analýze mikroplastů, protože je citlivá na nepolární molekuly. Touto technikou lze detekovat jednoduché i dvojně vazby mezi uhlíky (C-C, C=C), které často tvoří páteř polymerních řetězců plastů. Ramanova spektrometrie je považována za komplementární techniku k infračervené spektrometrii, protože vykazuje vyšší citlivost na nepolární symetrické vazby, zatímco infračervená spektrometrie má vyšší citlivost k polárním skupinám [4].

Ramanova spektrometrie je nedestruktivní metoda, která vyžaduje jen minimální úpravu vzorku. Komplikace při interpretaci Ramanova spektra může způsobovat degradace vzorku působením slunečního záření. Například u PVC dochází po fotodegradaci ke snížení intenzit píků o vlnočtech 693 a 637 cm^{-1} , které odpovídají charakteristické vazbě C-Cl [1].

Do většiny plastových výrobků jsou během jejich výroby přidávána aditiva a barviva. Tyto nečistoty mohou absorbovat dopadající záření, může docházet k zahřívání vzorku, které může dokonce vyústit v tepelnou degradaci vzorku. Barviva a aditiva mohou rovněž ovlivnit Ramanovo spektrum přítomností cizích píků a fluorescence [4]. Překryvu Ramanových pásů vlivem fluorescence lze zabránit použitím jiné vlnové délky laseru. Také je možné prodloužit dobu působení laseru na vzorek před zaznamenáním spektra, takže může docházet k laserem indukované degradaci nečistot v místě působení laseru a tím ke snížení fluorescence. Kromě aditiv a barviv mohou fluorescence vzorku způsobovat také samotné mikroplasty nebo biofilmy na jejich povrchu [5].

Pomocí Ramanovy spektrometrie lze analyzovat mikroplasty větší než 1 μm , zatímco pomocí FTIR lze zkoumat pouze vzorky větší než 10-20 μm [1]. Další výhodou Ramanovy spektrometrie v porovnání s infračervenou spektrometrií je, že píky v Ramanově spektru jsou obvykle užší než v IR spektrech, což vede k lepšímu rozlišení blízkých píků. Mezi další výhody této metody lze zařadit také to, že voda se v Ramanových spektrech projevuje velmi slabě, a je tedy možné měřit mokré vzorky [5].

2.8 Mikroplasty v rybách

V této kapitole jsou stručně uvedeny výsledky výzkumů týkajících se mikroplastů v rybách.

Baalkhuyur a kol. analyzovali mikroplasty z trávicích soustav ryb z Arabského zálivu. K určení druhu polymeru použili infračervenou spektrometrii s Fourierovou transformací. Mikroplasty našli v 8 rybách ze 140, z čehož vyplývá, že 5,71 % zkoumaných ryb obsahovalo mikroplasty. Nalezené mikroplasty byly z polyethylenu a polypropylenu [30].

Lin a kol. studovali 26 druhů ryb z ústí Perlové řeky na jihu Číny. Z 337 zkoumaných ryb, 141 kusů obsahovalo mikroplasty. Průměrný počet mikroplastů v jedné rybě byl 0,57. Nejčastějším druhem polymeru byl polyethylen tereftalát [28].

Cordova a kol. se zabývali mikroplasty pozřenými rybami u ústí řeky Ciliwung v Jakartě. Mikroplasty byly nalezeny v 75 % zkoumaných ryb. Průměrný počet mikroplastů na rybu byl 1,97 [31].

Abidli a kol. zkoumali mikroplasty v rybách ze Středoziemního moře, konkrétně z lagun Bizerte a Ghar el Melh. Ve Středozemním moři je největší koncentrace plovoucích plastů na světě, čemuž odpovídají i výsledky tohoto výzkumu. Mikroplasty byly nalezeny v trávicích soustavách všech zkoumaných ryb. Jedním ze zkoumaných druhů byl očnatec obecný. Průměrné množství mikroplastů nalezené u tohoto druhu bylo v laguně Bizerte $66,40 \pm 5,12$ a v laguně Ghar El Melh $42,00 \pm 6,08$ kusů mikroplastů na jednu rybu (nejistoty výsledků jsou vyjádřeny ve formě směrodatných odchylek). Pomocí techniky FTIR-ATR určili, že všechny zkoumané mikroplasty byly z polypropylenu nebo polyethylenu [29].

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

- Hydroxid draselný šupinky p.a., KOH, PENTA Chemicals, Česká republika
- Hydroxid draselný p.a. KOH, Mach chemikálie, Česká republika
- Tetramethylamoniumhydroxid (TMAH), $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$, 25% roztok v methanolu, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Methanol, CH_3OH , PENTA Chemicals, Česká republika
- Chloroform, CHCl_3 , PENTA Chemicals, Česká republika

3.2 Přístroje

- Písková lázeň typ SD7, Harry Gestigkeit GmbH, Německo
- Laboratorní váhy KERN EW2200-2NM, Kern&Sohn GmbH, Německo
- Lyofilizátor L10-55 PRO, Gregor Instruments, Česká republika
- Mikroskop LPT 3113i-T, Arsenal, Česká republika
- Infračervený spektrometr Nicolet iS50 FT-IR, Česká republika
 - iS50 ATR, krystal: diamant, dělič paprsku: KBr, zdroj: IR, rozsah: $4000-400\text{ cm}^{-1}$, detektor: DTGS ATR, počet skenů: 64, rozlišení: 8 cm^{-1}

3.3 Další pomůcky

- Membránové filtry Pragopor 4, nitrocelulóza, velikost pórů: $0,85\text{ }\mu\text{m}$, Pragochema, Česká republika
- Filtry ze skleněných mikrovláken GF/A, velikost pórů: $1,6\text{ }\mu\text{m}$, Whatman, Velká Británie
- Sestava pro vakuovou filtraci pro membránové filtry průměru 47 a 50 mm
- Skleněné laboratorní nádoby
- Teploměr

3.4 Vzorky ryb

V této práci bylo použito 10 ryb. V šesti případech se jednalo o kapra obecného. Tito kapři pocházeli z České republiky a byli zakoupeni na vánočních trzích. Kapr obecný (*Cyprinus carpio*) patří do skupiny ryb s trávicím ústrojím bez žaludku. Absence žaludku je kompenzována rozšířenou přední částí střeva [36]. V této práci byl analyzován pouze obsah střev kaprů, protože ostatními částmi trávicí soustavy jako je dutina ústní, hltan a jícen

potrava prochází velmi rychle a není tedy pravděpodobné, že by se v nich mikroplasty vyskytovaly.

Dále byly zkoumány 4 ryby mořské. Jednalo se o makrely obecné (*Scomber scombrus*) pocházející ze severovýchodního Atlantiku. Z moře byly odloveny pomocí kruhových zátahových sítí a čereny. V této práci bylo z důvodu menší velikosti ryb a k usnadnění preparace pracováno s veškerým obsahem dutiny břišní.

3.5 Pracovní postup

3.5.1 Příprava vzorků

Nejprve byly opatrně odděleny výše zmíněné orgány ryb od okolní tkáně a uloženy do skleněných lahviček. Ty byly skladovány v mrazničce při teplotě přibližně -18 °C.

Jednotlivé vzorky byly očíslovány, přičemž vzorky 1-6 odpovídají střevům kapra obecného a vzorky 7-10 orgánům makrely obecné. Všechny vzorky byly nejprve zváženy. Čtyři vzorky střev kaprů a všechny vzorky orgánů makrel byly umístěny do lyofilizátoru, kde byly při teplotě -52 °C a tlaku 2,0 hPa sušeny po dobu 20 hodin. Vysušené vzorky byly rovněž zváženy. Hmotnost vzorků před a po vysušení udává tabulka (Tab. II).

Tabulka II - Hmotnosti vzorků před a po vysušení, procentuální úbytek hmotnosti

Číslo vzorku	Hmotnost vzorku před vysušením (g)	Hmotnost vzorku po vysušení (g)	Procentuální úbytek hmotnosti (%)
1	63,9	25,8	59,6
2	32,2	6,9	78,6
3	42,3	12,2	71,2
4	72,1	29,5	59,1
5	63,5	-	-
6	48,5	-	-
7	18,1	7,6	58,0
8	30,7	12,7	58,6
9	15,3	7,1	53,6
10	23,7	9,8	58,6

Zbýlé dva vzorky kapřích střev byly vytaženy z mrazničky a ponechány rozmrazit.

3.5.2 Rozklad vzorků pomocí tetramethylamoniumhydroxidu

Rozklad pomocí tetramethylamoniumhydroxidu byl proveden u jednoho vysušeného a jednoho nevysušeného vzorku kapřích střev (vzorky č. 2 a 6). Oba vzorky byly vloženy do Erlenmeyerovy baňky a ke každému z nich bylo přidáno 160 ml

tetramethylamoniumhydroxidu, 25% roztok v methanolu. Vzniklé směsi byly promíchány a zahřívány na pískové lázni na teplotu 60 °C. Po 4 hodinách byla malá část roztoku se vzorkem č. 6 přefiltrována za sníženého tlaku. Byl zkoušen membránový filtr Pragopor 4 i filtr GF/A, Whatman. V obou případech filtrace probíhala velmi pomalu, proto byl zbytek roztoku vrácen na pískovou lázeň a zahříván dalších 15 hodin. Poté byl přefiltrován za sníženého tlaku přes membránový filtr Pragopor 4. Roztok se vzorkem č. 2 byl zahříván na pískové lázni po dobu 21 hodin a nadále s ním nebylo pracováno, viz kapitola 4.1.

3.5.3 Rozklad vzorků pomocí hydroxidu draselného

Druhý nevysušený vzorek kapřích střev (vzorek č. 5) byl vložen do Erlenmeyerovy baňky a bylo přidáno 500 ml 10% roztoku hydroxidu draselného. Baňka se vzniklou směsí byla zahřívána na pískové lázni na teplotu 60 °C po dobu 23 hodin. Poté byl roztok přefiltrován za sníženého tlaku přes filtr od společnosti Whatman a filtr byl promyt destilovanou vodou.

Tento typ rozkladu byl rovněž použit u tří vysušených vzorků kapřích střev (vzorky č. 1, 3 a 4). Ty byly přeneseny do Erlenmeyerových baněk a do každé bylo přidáno 250 ml 10% roztoku hydroxidu draselného. Baňky byly zahřívány na pískové lázni na teplotu 60 °C po dobu 21 hodin. Poté byly jednotlivé roztoky přefiltrovány za sníženého tlaku přes filtry společnosti Whatman. Filtr odpovídající vzorku č. 3 byl promyt destilovanou vodou, filtr získaný při filtraci vzorku č. 1 methanolem a filtr, který odpovídá vzorku č. 4, chloroformem. Všechny filtry byly usušeny při laboratorní teplotě.

Vzorky makrel byly rovněž rozkládány pomocí 10% hydroxidu draselného. U vzorků č. 7 a 8 bylo použito 300 ml a u vzorků č. 9 a 10 bylo použito 200 ml hydroxidu draselného. Směsi vzorků a roztoků hydroxidu byly zahřívány na přibližně 60 °C po dobu 22 hodin, poté byly roztoky přefiltrovány za sníženého tlaku. U vzorku č. 9 byl zkoušen membránový filtr Pragopor 4, ale filtrace byla velmi pomalá, proto byl zbytek roztoku přefiltrován přes filtr společnosti Whatman. Dále bylo pracováno s oběma filtry. Vzorky č. 7, 8 a 10 byly přefiltrovány přes filtry od společnosti Whatman. Filtry byly promyty destilovanou vodou a usušeny při laboratorní teplotě.

Použité metody rozkladu jsou pro větší přehlednost shrnuty v tabulce (Tab. III).

Tabulka III - Použité metody rozkladu

Číslo vzorku	Lyofilizace	Rozkladné činidlo	Délka zahřívání (hod.)
1	Ano	KOH	21
2	Ano	TMAH	21
3	Ano	KOH	21
4	Ano	KOH	21
5	Ne	KOH	23
6	Ne	TMAH	19
7	Ano	KOH	22
8	Ano	KOH	22
9	Ano	KOH	22
10	Ano	KOH	22

3.5.4 Vyhledávání podezřelých částic a jejich identifikace

Filtry se zachycenými pevnými částicemi byly prohledávány pod mikroskopem při pětinasobném zvětšení. Nalezené částice, u kterých bylo podezření, že by se mohlo jednat o mikroplasty, byly postupně přeneseny pomocí pinzety na ATR krystal infračerveného spektrometru a bylo změřeno infračervené spektrum dané částice. Před každým měřením vzorku bylo měřeno pozadí. Naměřená spektra byla porovnána s knihovnou spekter.

4. Výsledky a diskuse

4.1 Použité metody rozkladu

V této práci byly využity dva druhy rozkladů, a to rozklad lyofilizovaného a nelyofilizovaného vzorku pomocí hydroxidu draselného, a rozklad lyofilizovaného a nelyofilizovaného vzorku pomocí tetramethylamoniumhydroxidu (TMAH).

Filtrace roztoku získaného rozkladem nelyofilizovaného vzorku pomocí TMAH probíhala velmi pomalu, usazenina na filtru byla hnědá a gelovitá a nebylo možné z ní vybrat jednotlivé částice, které by potenciálně mohly být mikroplasty. Roztok po rozkladu lyofilizovaného vzorku TMAH vypadal obdobně, proto bylo rozhodnuto ho nefiltrovat a nadále s ním nepracovat.

Jako vhodnější se ukázal rozklad pomocí hydroxidu draselného. Filtrace trvala kratší dobu a usazené částice bylo možné z filtru pomocí pinzety přenést k měření na FTIR spektrometru. K rozkladu lyofilizovaných vzorků bylo zapotřebí menšího množství roztoku KOH než u vzorku nelyofilizovaného.

Při rozkladu orgánů makrel bylo záměrně použito dvou různých objemů (200 a 300 ml) roztoků hydroxidu draselného k rozkladu vzorků o podobných hmotnostech. Nebyla ovšem nalezena souvislost mezi použitým množstvím KOH a rychlostí filtrace.

V této práci byly použity dva druhy filtrů. Ukázalo se, že membránové filtry Pragopor 4, jejichž velikost pórů je 0,85 μm , nejsou k tomuto účelu příliš vhodné. Póry filtru se velmi rychle ucpaly a filtrace téměř ustala. Menší velikost pórů sice vede k zachycení většího počtu částic, jejich velikost však nebyla vhodná pro použitou techniku měření na krystalu ATR. Jako vhodnější se ukázaly filtry ze skleněných mikrovláken GF/A od společnosti Whatman, které mají velikost pórů 1,6 μm .

4.2 Nalezené podezřelé částice

Na všech zkoumaných filtrech bylo nalezeno celkem 74 podezřelých částic, z toho ve 26 případech se jednalo o vlákna. Přesné počty nalezených podezřelých částic u jednotlivých vzorků udává tabulka (Tab. IV). Některé nalezené částice jsou zachyceny na obrázku (Obr. 2).

Tabulka IV - Počty nalezených částic u jednotlivých vzorků

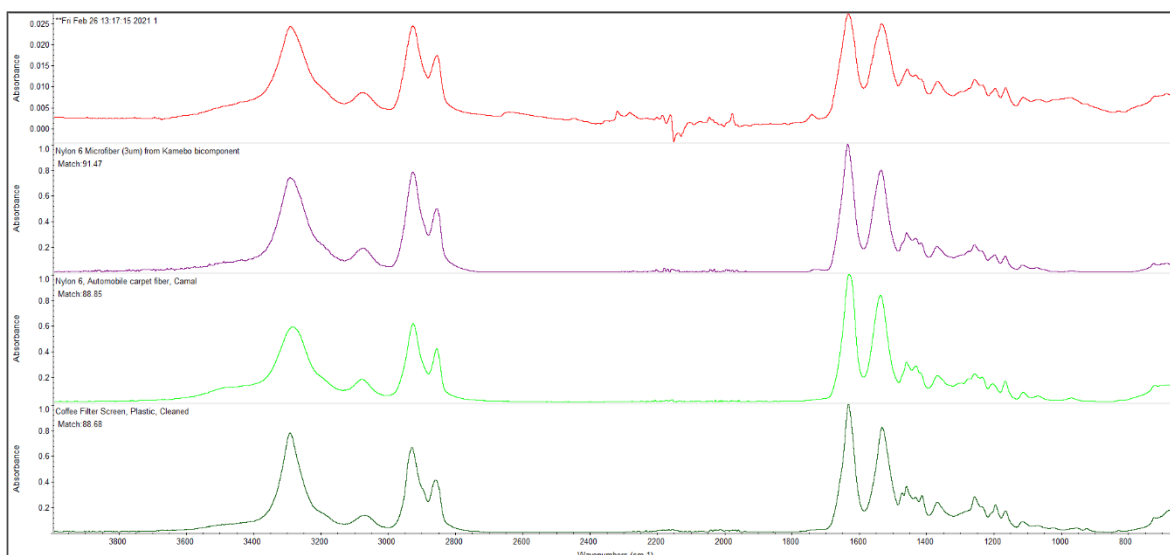
Číslo vzorku	Počet nalezených částic	Počet vláken
1	10	8
2	-	-
3	10	4
4	4	3
5	11	4
6	-	-
7	13	3
8	11	1
9	8	1
10	7	2



Obrázek 2 - Nalezené částice

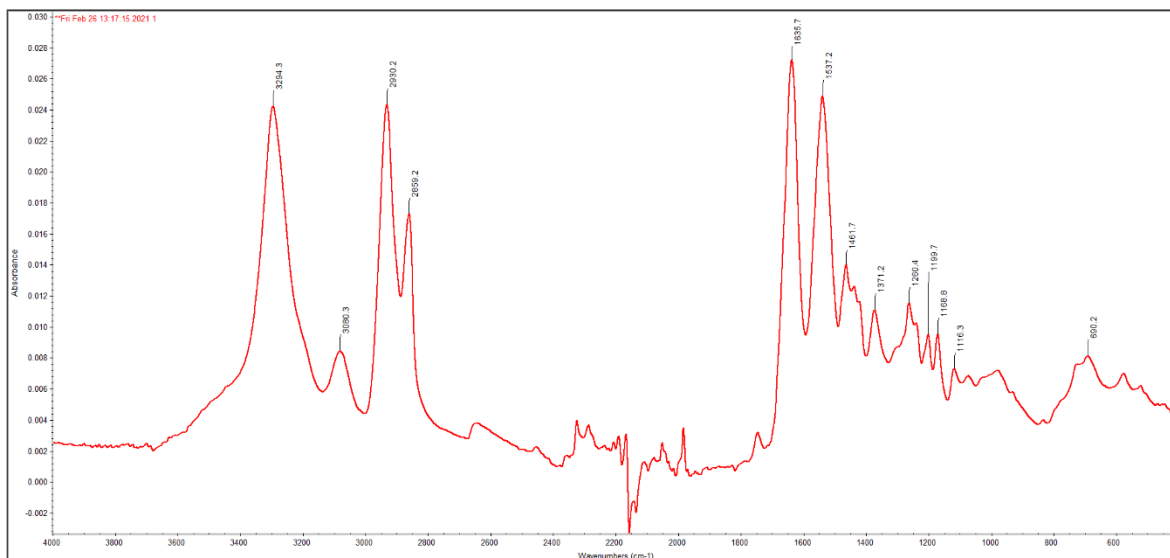
4.3 Naměřená spektra

Jediná částice, která byla vyhodnocena jako syntetický polymer, byla nalezena ve vzorku č. 1. Jednalo se o bezbarvé tuhé vlákno. Na obrázku (Obr. 3) je spektrum této částice a tři nejpodobnější spektra z knihovny spekter. Jak lze vidět, jedná se o nylon 6. Nylon 6 je mimo jiné využíván na výrobu rybářských vlasců a sítí. Vlákno se mohlo z těchto rybářských pomůcek uvolnit a následně být pozřeno námi zkoumaným kaprem.



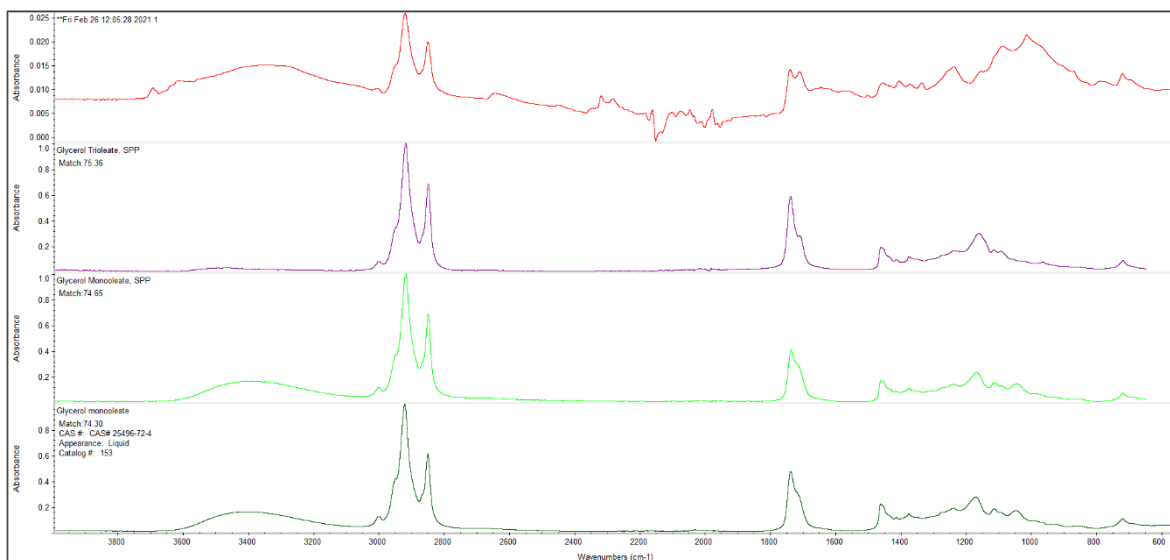
Obrázek 3 - Naměřené spektrum (po ATR korekci) a tři nejpodobnější spektra z knihovny spekter. Shora: 1. Naměřené spektrum 2. Nylon 6, shoda: 91,47 3. Nylon 6, vlákno z koberce automobilu, shoda: 88,85 4. Kávoový filtr, plastový, shoda: 88,68

Na obrázku (Obr. 4) je ještě jednou spektrum částice z nylonu 6, tentokrát i s označením vlnočtů jednotlivých píků. Pík o vlnočtu $3294,3 \text{ cm}^{-1}$ odpovídá valenční vibraci vazby N-H ve skupině $-\text{CO}-\text{NH}-$ (trans), pík s vlnočtem $3080,3 \text{ cm}^{-1}$ odpovídá svrchnímu tónu amidického pásu II. Píky o vlnočtech $2930,2$ a $2859,2 \text{ cm}^{-1}$ odpovídají valenčním vibracím ve skupinách CH_2 . Pík s hodnotou $1635,7$ lze přiřadit valenční vibraci $\text{C}=\text{O}$ ve skupině $-\text{CO}-\text{NH}-$. Další pík o hodnotě $1537,2 \text{ cm}^{-1}$ odpovídá deformační vibraci vazby N-H ve skupině $-\text{CO}-\text{NH}-$ (trans). Píku o hodnotě $1461,7 \text{ cm}^{-1}$ lze přiřadit deformační vibraci skupiny CH_2 . Pík s hodnotou vlnočtu $1260,4$ odpovídá amidickému pásu III. Pík o hodnotě $690,2 \text{ cm}^{-1}$ odpovídá mimorovinné vibraci vazby N-H. Interpretace tohoto spektra byla provedena pomocí tabulky k interpretaci IR spekter [37].



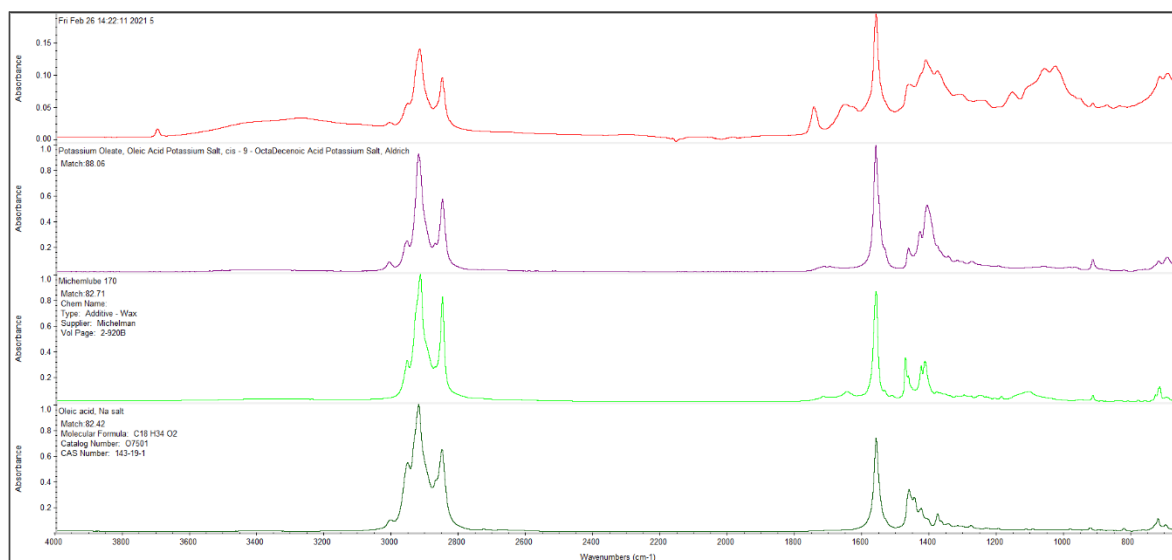
Obrázek 4 - Naměřené spektrum nylonu 6 s hodnotami vlnočtů jednotlivých píků. Hodnoty píků zleva: $3294,3 \text{ cm}^{-1}$, $3080,3 \text{ cm}^{-1}$, $2930,2 \text{ cm}^{-1}$, $2859,2 \text{ cm}^{-1}$, $1635,7 \text{ cm}^{-1}$, $1537,2 \text{ cm}^{-1}$, $1461,7 \text{ cm}^{-1}$, $1371,2 \text{ cm}^{-1}$, $1260,4 \text{ cm}^{-1}$, $1199,7 \text{ cm}^{-1}$, $1168,8 \text{ cm}^{-1}$, $1116,3 \text{ cm}^{-1}$, $690,2 \text{ cm}^{-1}$

První spektrum na obrázku (Obr. 5) poskytla částice nalezená ve vzorku 1. Pomocí knihovny spekter bylo určeno, že se jedná o glycerol-trioleát nebo glycerol-monooleát, tedy o estery kyseliny olejové a glycerolu. Kyselina olejová, která patří mezi běžné mastné kyseliny v tucích, se hojně nachází v živočišných tkáních. Estery kyseliny olejové a glycerolu jsou kapalné látky, proto je možné se domnívat, že zkoumaná částice měla složení odlišné, a tyto lipidy tvořily pouze vrstvu na jejím povrchu. Filtr, ze kterého pochází tato částice, byl za účelem odstranění tuků promyt methanolem. Pravděpodobně bylo použito příliš malé množství methanolu, nebo se nechal působit příliš krátkou dobu.



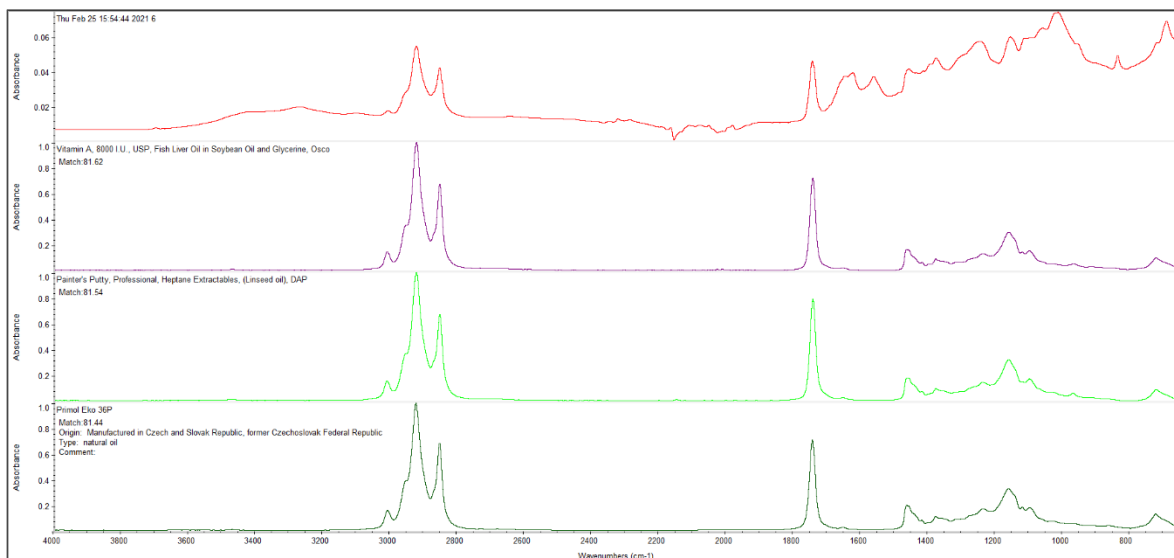
Obrázek 5 - Naměřené spektrum a tři nejpodobnější spektra z knihovny spekter. Shora: 1. Naměřené spektrum 2. Glycerol-trioleát, shoda: 75,36 3. Glycerol-monooleát, shoda: 74,65 4. Glycerol-monooleát, shoda 74,30

Další naměřené spektrum a tři spektra z knihovny s nejvyšší shodou jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 6). Částice, o jejíž spektrum se jedná, pochází ze vzorku 4. Porovnáním s knihovnou spekter lze určit, že se pravděpodobně jednalo o draselnou sůl kyseliny olejové. Tato látka mohla vzniknout během rozkladu alkalickou hydrolyzou tuků a olejů. Například výše zmíněný glycerol-trioleát reaguje s hydroxidem draselným za vzniku glycerolu a draselné soli kyseliny olejové.



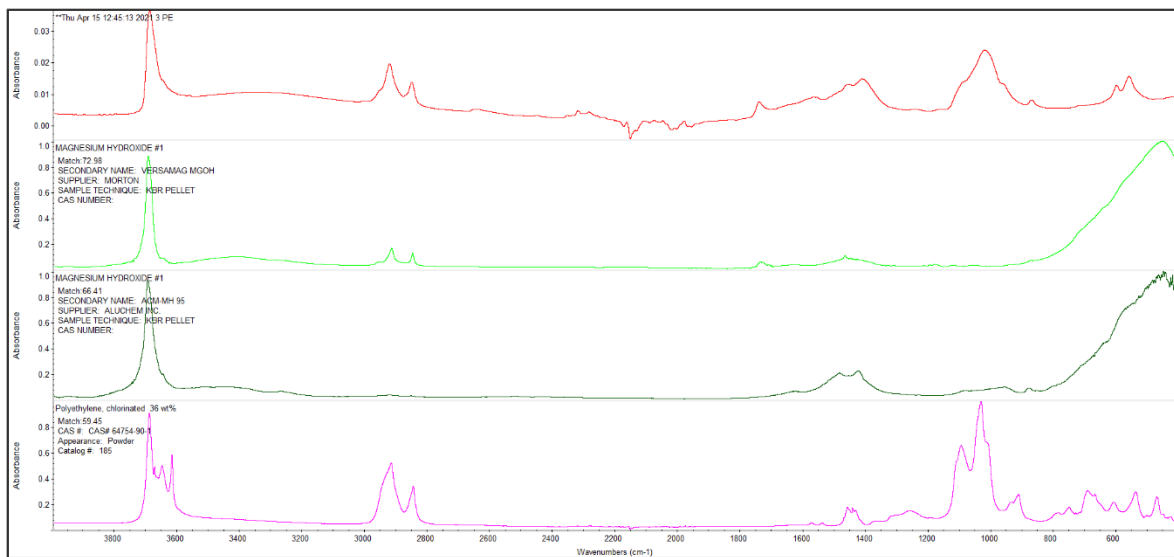
Obrázek 6 - Naměřené spektrum a tři nejpodobnější spektra z knihovny spekter. Shoda: 1. Naměřené spektrum 2. Draselná sůl kyseliny olejové, shoda: 88,06 3. Michelumbe 170, shoda: 82,71 4. Sodná sůl kyseliny olejové, shoda: 82,42

Dalšímu naměřenému spektru, které lze nalézt na obrázku (Obr. 7), bylo s největší shodou přiřazeno spektrum vitamínu A. Vitamin A se běžně vyskytuje v rybím oleji. Částice, která poskytla toto spektrum, pocházela ze vzorku 5.



Obrázek 7 - Naměřené spektrum a tři nejpodobnější spektra z knihovny spekter. Shora: 1. Naměřené spektrum 2. Vitamin A, shoda: 81,62 3. Malířský tmel, profesionální, shoda: 81,54 4. Primol Eko 36P, shoda: 81,44

Ve vzorku č. 9 byla nalezena částice, jejíž spektrum je na obrázku (Obr. 8). Pomocí knihovny spekter bylo zjištěno, že podobné spektrum má i chlorovaný polyethylen. Shoda mezi tímto a naměřeným spektrem byla pouze 59,45, proto nelze nalezenou částici s jistotou prohlásit za mikroplast.



Obrázek 8 - Naměřené spektrum a tři nejpodobnější spektra z knihovny spekter. Shora: 1. Naměřené spektrum 2. Hydroxid hořečnatý, shoda: 72,98 3. Hydroxid hořečnatý, shoda: 66,41 4. Chlorovaný polyethylen, shoda: 59,45

5. Závěr

V teoretické části této bakalářské práce bylo popsáno, co jsou to mikroplasty, jejich vlastnosti a způsoby jejich vzniku. Dále byla popsána rizika spojená s výskytem mikroplastů v životním prostředí, především ve spojení s aditivami přidávanými do plastových výrobků, s těžkými kovy a perzistentními organickými polutanty. Jedna kapitola byla věnována bioplastům jako možné alternativě běžných plastů. Velká část této práce se zabývá metodami odběru vzorku z jednotlivých složek životního prostředí a metodám, které lze při analýze mikroplastů využít. Hlavní důraz je přitom kladen na spektrální metody.

V experimentální části byly zkoumány mikroplasty v trávicích soustavách deseti ryb. Jednalo se o 6 kaprů obecných pocházejících z České republiky a 4 makrely obecné, které byly uloveny v severovýchodním Atlantiku. Zkoumané orgány byly nejprve vypreparovány a následně rozkládány. Část vzorků byla rozkládána přímo, ostatní byly před samotným rozkladem lyofilizovány. Byla porovnávána dvě rozkladná činidla, a to tetramethylamoniumhydroxid a hydroxid draselný. Jako lepší postup se ukázalo vzorek nejprve lyofilizovat a poté rozložit pomocí 10% roztoku hydroxidu draselného. Po rozkladu byly vzorky přefiltrovány a filtry byly prohledávány pomocí mikroskopu. Nalezené částice byly analyzovány pomocí infračervené spektrometrie. Ze 74 zkoumaných částic se pouze v jednom případě jednalo o mikroplast, konkrétně o vlákno z nylonu 6. Ramanova spektrometrie vzhledem k omezeným časovým možnostem pro experimentální část práce nebyla použita.

V této práci byly analyzovány pouze mikroplasty viditelné pouhým okem, protože je bylo potřeba pomocí pinzety přenést na ATR krystal infračerveného spektrometru. V budoucnu by bylo dobré se zaměřit na analýzu mini-mikroplastů (1 μm - 1 mm) a nanoplastů (<1 μm). Dále je třeba se zaměřit na odstranění tuků naadsorbovaných na povrchu pevných částic, které způsobují při měření technikou ATR značné problémy.

6. Seznam použité literatury

- [1] A. B. Silva, A. S. Bastos, C. I. L. Justino, J. P. da Costa, A. C. Duarte, T. A. P. Rocha-Santos, Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry – A review, *Analytica Chimica Acta* 1017 (2018) 1-19.
- [2] A. G. M. Caron, C. R. Thomas, K. L. E. Berry, C. A. Motti, E. Ariel, J. E. Brodie, Ingestion of microplastic debris by green sea turtles (*Chelonia mydas*) in the Great Barrier Reef: Validation of a sequential extraction protocol, *Marine Pollution Bulletin* 127 (2018) 743-751.
- [3] B. Nan, L. Su, C. Kellar, N. J. Craig, M. J. Keough, Identification of microplastics in surface water and Australian freshwater shrimp *Paratya australiensis* in Victoria, Australia, *Environmental Pollution* 259 (2020) 113865.
- [4] C. B. Crawford, B. Quinn, *Microplastic Pollutants*, Elsevier, Amsterdam 2017
- [5] T. A. P. Rocha-Santos, A. C. Duarte, *Characterization and Analysis of Microplastics*, Elsevier, Amsterdam 2017.
- [6] J. H. Dekiff, D. Remy, J. Klasmeier, E. Fries, Occurrence and spatial distribution of microplastics in sediments from Norderney, *Environmental Pollution* 186 (2014) 248-256.
- [7] S. M. A. Rahman, G. S. Robin, M. Momotaj, J. Uddin, M. A. M. Siddique, Occurrence and spatial distribution of microplastics in beach sediments of Cox's Bazar, Bangladesh, *Marine Pollution Bulletin* 160 (2020) 111587.
- [8] A. Patchaiyappan, S. Z. Ahmed, K. Dowarah, S. Jayakumar, S. P. Devipriya, Occurrence, distribution and composition of microplastics in the sediments of South Andaman beaches, *Marine Pollution Bulletin* 156 (2020) 111227.
- [9] R. O. Castro, M. L. da Silva, M. R. C. Marques, F. V. de Araújo, Spatio-temporal evaluation of macro, meso and microplastics in surface waters, bottom and beach sediments of two embayments in Niterói, RJ, Brazil, *Marine Pollution Bulletin* 160 (2020) 111537.
- [10] H. Aslam, T. Ali, M. M. Mortula, A. G. Attaelmanan, Evaluation of microplastics in beach sediments along the coast of Dubai, UAE, *Marine Pollution Bulletin* 150 (2020) 110739.
- [11] R. Mao, Y. Hu, S. Zhang, R. Wu, X. Guo, Microplastics in the surface water of Wuliangshuai Lake, northern China, *Science of The Total Environment* 723 (2020) 137820.
- [12] R. Egessa, A. Nankabirwa, H. Ocaya, W. G. Pabire, Microplastic pollution in surface water of Lake Victoria, *Science of The Total Environment* 741 (2020) 140201.
- [13] C. R. Gerolin, F. N. Pupim, A. O. Sawakuchi, C. H. Grohmann, G. Labuto, D. Semensatto, Microplastics in sediments from Amazon rivers, Brazil, *Science of The Total Environment* 749 (2020) 141604.
- [14] C. Wang, R. Xing, M. Sun, W. Ling, W. Shi, S. Cui, L. An, Microplastics profile in a typical urban river in Beijing, *Science of The Total Environment* 743 (2020) 140708.
- [15] I. F. Sequeira, J. C. Prata, J. P. da Costa, A. C. Duarte, T. Rocha-Santos, Worldwide contamination of fish with microplastics: A brief global overview, *Marine Pollution Bulletin* 160 (2020) 111681.
- [16] A. R. Oliveira, A. Sardinha-Silva, P. L. R. Andrews, D. Green, G. M. Cooke, S. Hall, K. Blackburn, A. V. Sykes, Microplastics presence in cultured and wild-caught cuttlefish, *Sepia officinalis*, *Marine Pollution Bulletin* 160 (2020) 111553.
- [17] R. Li, S. Zhang, L. Zhang, K. Yu, S. Wang, Y. Wang, Field study of the microplastic pollution in sea snails (*Ellobium chinense*) from mangrove forest and their relationships with microplastics in water/sediment located on the north of Beibu Gulf, *Environmental Pollution* 263 (2020) 114368.

- [18] A. Dehaut, A. Cassone, L. Frère, L. Hermabessiere, C. Himber, E. Rinnert, G. Rivière, C. Lambert, P. Soudant, A. Huvet, G. Duflos, I. Paul-Pont, Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization, *Environmental Pollution* 215 (2016) 223-233.
- [19] S. L. Wright, R. C. Thompson, T. S. Galloway, The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review, *Environmental Pollution* 178 (2013) 483-492.
- [20] G. Kutralam-Muniasamy, F. Pérez-Guevara, I. Elizalde-Martínez, V. C. Shruti, Review of current trends, advances and analytical challenges for microplastics contamination in Latin America, *Environmental Pollution* 267 (2020) 115463.
- [21] R. C. Moore, L. Loseto, M. Noel, A. Etemadifar, J. D. Brewster, S. MacPhee, L. Bendell, P. S. Ross, Microplastics in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the Eastern Beaufort Sea, *Marine Pollution Bulletin* 150 (2020) 110723.
- [22] A. Abraham, H. Park, O. Choi, B. Sang, Anaerobic co-digestion of bioplastics as a sustainable mode of waste management with improved energy production – A review, *Bioresource Technology* 322 (2021) 124537.
- [23] P. Kalač, J. Tříška, L. Kolář, E. Jírovcová, *Chemie životního prostředí*, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice 2010.
- [24] A. I. S. Purwiyanto, Y. Suteja, Trisno, P. S. Ningrum, W. A. E. Putri, Rozirwan, F. Agustriani, Fauziyah, M. R. Cordova, A. F. Koropitan, Concentration and adsorption of Pb and Cu in microplastics: Case study in aquatic environment, *Marine Pollution Bulletin* 158 (2020) 111380.
- [25] Q. Wang, Y. Zhang, X. Wangjin, Y. Wang, G. Meng, Y. Chen, The adsorption behavior of metals in aqueous solution by microplastics effected by UV radiation, *Journal of environmental science* 87 (2020) 272-280.
- [26] I. Holoubek, A. Kočan, I. Holoubková, J. Kohoutek, *Perzistentní organické polutanty*, Planeta 2001.
- [27] M. Tamminga, E. Hengstmann, E. K. Fischer, Microplastic analysis in the South Funen Archipelago, Baltic Sea, implementing manta trawling and bulk sampling, *Marine Pollution Bulletin* 128 (2018) 601-608.
- [28] L. Lin, L. Ma, H. Li, Y. Pan, S. Liu, L. Zhang, J. Peng, L. Fok, X. Xu, W. He, Low level of microplastic contamination in wild fish from an urban estuary, *Marine Pollution Bulletin* 160 (2020) 111650.
- [29] S. Abidli, N. Akkari, Y. Lahbib, N. T. E. Menif, First evaluation of microplastics in two commercial fish species from the lagoons of Bizerte and Ghar El Melh (Northern Tunisia), *Regional Studies in Marine Science* 41 (2021) 101581.
- [30] F. M. Baalkhuyur, M. A. Qurban, P. Panickan, C. M. Duarte, Microplastics in fishes of commercial and ecological importance from the Western Arabian Gulf, *Marine Pollution Bulletin* 152 (2020) 110920.
- [31] M. R. Cordova, E. Riani, A. Shiomoto, Microplastics ingestion by blue panchax fish (*Aplocheilichthys sp.*) from Ciliwung Estuary, Jakarta, Indonesia, *Marine Pollution Bulletin* 161 (2020) 111763.
- [32] J. Carlin, C. Craig, S. Little, M. Donnelly, D. Fox, L. Zhai, L. Walters, Microplastics accumulation in the gastrointestinal tracts in birds of prey in central Florida, USA, *Environmental Pollution* 264 (2020) 114633.
- [33] A. Panebianco, L. Nalbone, F. Giarratana, G. Ziino, First discoveries of microplastics in terrestrial snails, *Food Control* 106 (2019) 106722.
- [34] T. Maňka, Srovnání zobrazovacích možností transmisního a rastrovacího elektronového mikroskopu, bakalářská práce, Vysoké učení technické v Brně, Brno 2014.

- [35] K. Záruba a kol., Analytická chemie (2. díl), Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2016.
- [36] T. Lotocki, L. Vetešník, Biologie ryb: trávicí soustava (1. díl), Český rybář, České Budějovice 2011.
- [37] J. Krofta, Návodů pro laboratorní cvičení z analytické chemie II., VŠCHT, Praha 2001.