

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra Biologie

**Kvantifikace mikroplastů ve vzorcích balených vod
a posouzení jejich vlivu na lidský organismus**

Diplomová práce

Autor: Petra Horáková
Studijní program: N0588A030001 Biologie a Ekologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.



Zadání diplomové práce

Autor: Petra Horáková

Studium: S20BI007NP

Studijní program: N0588A030001 Biologie a ekologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Název diplomové práce: **Kvantifikace mikroplastů ve vzorcích balených vod a posouzení jejich vlivu na lidský organismus**

Název diplomové práce: Quantification of microplastics in the samples of bottled waters and evaluation of impact of these particles on the human body

AJ:

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Diplomová práce se zaměřuje na detailní analýzu a kvantifikaci mikroplastových částic ve vybraných balených vodách různého typu. Zároveň slouží jako prostředek pro zdokonalení výzkumu využitého během bakalářské práce "*Analýza mikroplastových částic v balených nápojích*", a rozšiřuje spektrum informací náležitých problematice plastové kontaminace. Teoretická část shromažďuje fakta vyplývající z několika výzkumů zabývajících se zejména negativním dopadem mikroplastů na lidský organismus, kde tyto částice mohou působit řadu zdravotních rizik. Praktická část v podobě výzkumu se pomocí analytických metod obohacených o kovové naprašování vzorků snaží objasnit původ a množství detekovaných plastových částic, které mohou konzumací balených vod do těla vnikat. Cílem práce je mimo jiné také osvěta v oblasti mikroplastové problematiky.

1. Campanale, C., Massarelli, C., Savino, I., Locaputo, V., & Uricchio, V. F. (2020). A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *International journal of environmental research and public health*, 17(4), 1212. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041212>
2. Larue C, Sarret G, Castillo-Michel H, Pradas Del Real AE. A Critical Review on the Impacts of Nanoplastics and Microplastics on Aquatic and Terrestrial Photosynthetic Organisms. *Small*. 2021 May;17(20):e2005834. doi: 10.1002/sml.202005834. Epub 2021 Apr 2. PMID: 33811450.
3. Sendra M, Sparaventi E, Novoa B, Figueras A. An overview of the internalization and effects of microplastics and nanoplastics as pollutants of emerging concern in bivalves. *Sci Total Environ*. 2021 Jan 20;753:142024. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142024. Epub 2020 Aug 29. PMID: 33207452.

Zadávací pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Petra Horáková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce paní RNDr. Aleně Myslivcové Fučíkové, Ph.D. za užitečné postřehy, nápady a konzultace poskytnuté v průběhu celého studia, ale i propůjčené prostory a laboratorní vybavení nezbytně nutné pro realizaci výzkumu.

Děkuji také panu Bc. Marku Vojtovi, a to zejména za nespočet hodin a dní, které obětavě strávil na půdě fakulty při dohledu nad obsluhou skenovacího elektronového mikroskopu. Poskytl mi také důležité podklady pro vypracování podstatné části diplomové práce.

Zároveň si velmi cením nejen podpory, ale i trpělivosti kolegů a blízkých, kteří mi byli nápomocni v těch nejtěžších chvílích studia.

Anotace

HORÁKOVÁ, P., 2022: *Kvantifikace mikroplastů ve vzorcích balených vod a posouzení jejich vlivu na lidský organismus*. Hradec Králové, 2022. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D., 107s.

Diplomová práce se zaměřuje na detailní analýzu a kvantifikaci mikroplastových částic ve vybraných balených vodách různého typu. Slouží jako prostředek pro zdokonalení výzkumu využitého během bakalářské práce „*Analýza mikroplastových částic v balených nápojích*“ a zároveň rozšiřuje spektrum informací náležitých problematice plastové kontaminace. Teoretická část shromažďuje fakta vyplývající z několika výzkumů zabývajících se zejména negativním dopadem mikroplastů na lidský organismus, kde tyto částice mohou působit řadu zdravotních rizik. Praktická část v podobě výzkumu se pomocí analytických metod obohacených o kovové naprašování vzorků snaží objasnit původ a množství detekovaných plastových částic, které mohou konzumací balených vod do těla proniknout. Cílem práce je mimo jiné také osvěta v oblasti mikroplastové problematiky.

Klíčová slova

Mikroplasty, plastová kontaminace, ekotoxicita, odpadové hospodářství, úprava vody, kvantifikace, naprašování vodivých vrstev, elektronová mikroskopie zdravotní dopady.

Annotation

Title: Quantification of microplastics in samples of bottled waters and evaluation of impact of the human body

HORÁKOVÁ, P., 2022: *Quantification of microplastics in samples of bottled waters and evaluation of the human body*. Hradec Králové, 2022. Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis supervisor RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D. 107 p.

This thesis deals with the detailed analysis and quantification of microplastic particles in a selected sample of different bottled waters. It is a way to deepen the research presented in the bachelor thesis „*Analysis of microplastic particles in bottled beverages*“, and at the same time to broaden the spectrum of information about plastic pollution. In the theoretical part, facts are gathered from various research works, mainly dealing with the negative effects of microplastics on the human body, where these particles can cause various health risks. In the practical part of the study, an attempt is made to clarify the origin and the amount of detected plastic particles that can enter the body through the consumption of bottled water. The applied analytical methods are improved by the sputtered metal coatings. The aim of this work is also to raise awareness of the issue of microplastics.

Keywords

Microplastics, plastic contamination, ecotoxicity, waste management, water treatment, quantification, sputter coating, electron microscopy, health impacts.

Obsah

1	Úvod.....	10
1.1	Cíle práce.....	11
2	Teoretická část – literární přehled	12
2.1	Plastová kontaminace a její rizika.....	12
2.1.1	Environmentální důsledky nadprodukce plastů	13
2.1.2	Environmentální důsledky vzniku mikroplastů	15
2.2	Vliv mikroplastů na živé organismy.....	16
2.2.1	Toxicita mikroplastů u ryb	17
2.2.2	Toxicita mikroplastů u laboratorních myší.....	18
2.2.3	Toxicita mikroplastů v lidských buňkách in vitro.....	18
2.3	Vliv mikroplastů na lidský organismus	23
2.3.1	Cesty vstupu mikroplastů do organismu.....	24
2.3.2	Zdravotní rizika mikroplastů	27
2.3.3	Toxicita v závislosti na velikosti částic.....	32
2.3.4	Hodnocení zdravotních rizik.....	34
2.4	Problematika mikroplastů v současnosti: chronologicky.....	35
2.5	Detekce mikroplastů v balených vodách	38
2.5.1	Skenovací elektronová mikroskopie	38
2.5.2	Energiově disperzní spektroskop	43
2.5.3	Naprašování vzorků.....	44
3	Metodika zpracování	45
3.1	Charakteristika vzorků	45
3.1.1	Testované balené vody.....	45
3.2	Příprava vzorků.....	46

3.3	Filtrace.....	47
3.4	Prevence kontaminace.....	51
3.5	Zpracování a uchovávání vzorků	52
3.6	Doplnění vzorků.....	54
3.7	Iontové naprášení vzorků	55
3.8	Pozorování skenovacím elektronovým mikroskopem.....	57
3.9	Analýza částic	60
3.9.1	EDS analýza.....	60
3.9.2	Kvantitativní analýza	62
4	Výsledky	64
4.1	Prázdňý vzorek.....	64
4.2	Negativní kontrola	65
4.3	Kvalitativní analýza	65
4.3.1	Výskyt mikroplastů	66
4.3.2	Morfologie částic	69
4.3.3	Velikost částic	72
4.3.4	Původ částic.....	73
4.4	Kvantitativní stanovení	76
4.4.1	Stanovení potřebných veličin.....	76
4.4.2	Vyhodnocení.....	77
5	Diskuse	81
5.1	Použitá metodika.....	81
5.2	Hodnocení výsledků.....	82
5.3	Limitace metod.....	84
5.3.1	Technické limitace.....	84
5.3.2	Metodické limitace	85

6 Závěr.....	86
Seznam použité literatury	88
Seznam obrázků	101
Seznam tabulek.....	104
Seznam grafů	105
Seznam zkratk.....	106

1 Úvod

Nadměrná kumulace plastových částic je v současnosti prokázána prakticky ve všech složkách životního prostředí. Globálně jsou kontaminací zasaženy nejrůznější biomy, kde plasty působí řadu škod, a to především tím, že vlivem různých faktorů postupně degradují na drobnější fragmenty veřejně již známé jako mikroplasty. Kromě toho, že se během částečného rozkladu může uvolňovat spoustu toxických látek, velké obavy budí zpravidla jejich mikroskopická velikost, která značně usnadňuje celkový transport částic. Mikroplasty tak „nepozorovaně“ kolují po celé planetě a jejich detekce je velice obtížná. Obrovské riziko představují zejména pro biotickou složku přírody, neboť snadno pronikají skrze buněčné membrány do nitel živých organismů. Tělo není schopné cizorodý materiál zpracovat a následkem bývá obecně hromadění syntetických částic v útrobach jedinců, což může vést k mechanickému narušování sliznic nebo nejrůznějším změnám fyziologických funkcí. Pozřené mikroplasty se v organismu mohou chovat jako xenobiotika, která vstupují do potravního řetězce jako jeho nežádoucí součást, a dosáhnou-li v těle určité koncentrace, mohou ohrozit zdraví řady živočichů včetně člověka.

Teoretická část diplomové práce doplňuje poznatky obsažené v předešlé kvalifikační práci zaměřené na obecnou analýzu mikroplastů ve vodních zdrojích. Zároveň rozšiřuje dosud získaná fakta o aktuální poznatky a výsledky nejnovějších výzkumů v oblasti mikroplastové kontaminace. Literární souhrn je zacílen především na vliv mikroplastů na živé organismy, obzvláště na člověka.

Ve výzkumu, který tvoří praktickou část práce, došlo ke zdokonalení předchozí metodiky s cílem vyvarovat se drobných nedostatků, které by v konečném důsledku mohly značně ovlivňovat celkový závěr analýzy. Kvalitativní analýza byla doplněna analýzou kvantitativní, na jejímž základě bylo zhodnoceno riziko konzumace nejrůznějších typů balených vod kontaminovaných mikroplasty.

1.1 Cíle práce

Hlavní stanovené cíle diplomové práce jsou:

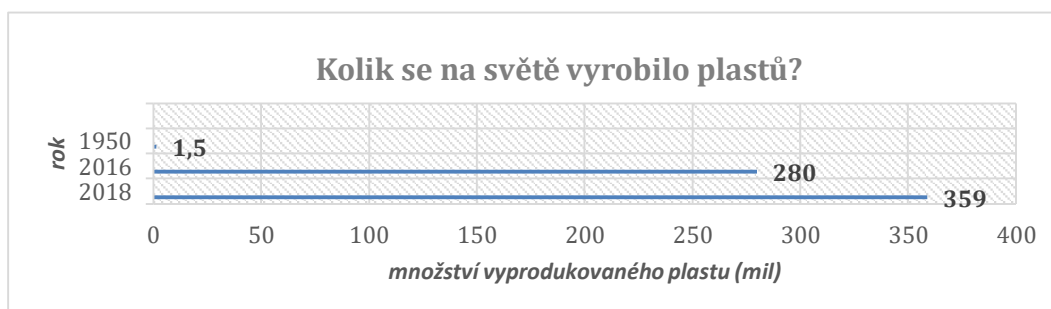
1. Za pomocí odborné literatury vypracovat literární rešerši zaměřenou na vliv mikroplastové kontaminace na životní prostředí, zejména na živé organismy a člověka.
2. Stanovit sjednocenou a ustálenou metodiku zahrnující filtrační laboratorní techniky a detekční postupy, zbavené nedostatků z předchozího výzkumu.
3. Zdokonalit vlastní praktické dovednosti v aplikaci analytických metod a získat základní povědomí o průběhu iontového naprašování vzorků.
4. Detekovat mikročástice v balených vodách určených v předchozím výzkumu jako *pozitivní* z hlediska mikroplastového znečištění a provést u těchto vod kvantitativní analýzu.
5. Shrnout výsledky pozorování a porovnat je v rámci diskuse s poznatky publikovanými v ostatních literárních zdrojích.
6. Na základě zjištěných výsledků posoudit kvalitu balených vod vyskytujících se na českém trhu a zprostředkovat jejich srovnání.
7. Rozšířit prostřednictvím obsahu práce osvětu o problematice plastové kontaminace a nastítnit alternativy budoucích opatření, které by obecně mohly zajistit redukci plastového odpadu v životním prostředí.

2 Teoretická část – literární přehled

2.1 Plastová kontaminace a její rizika

Bez plastových produktů se dnes člověk těžko dokáže obejít. Je to právě lidská činnost, která stojí na počátku vzniku syntetik, a stejně tak dramatického vzestupu produkce umělých hmot v posledních desetiletích. Plasty vzrostly na popularitě především zásluhou jejich nenahraditelných vlastností. Jsou lehké, snadno tvarovatelné a cenově dostupné. Současně disponují pevností, nízkou tepelnou vodivostí a vysokou odolností vůči mnohým fyzikálním i chemickým vlivům. Pomocí nejrůznějších aditiv, jako jsou stabilizátory, změkčovadla, barviva, ředidla a další látky, získáváme velice různorodé produkty o požadovaných vlastnostech, které činí plasty unikátními a komerčně využívanými (Andrady et Neal, 2009; Thompson et al., 2009).

Dle nejnovějších poznatků (ČTK, 2021) dosáhla v roce 2018 průmyslová produkce plastových hmot až 359 milionů tun, což znamená rapidní vzrůst v porovnání s minulým stoletím (viz Graf 1). Plasty, dříve jako převratný vynález a výtěžek vědy, začaly postupně přinášet mnoho společenských výhod a nabídly budoucí technologický a medicínský pokrok (Thompson et al., 2009). Během necelých sedmdesáti let tak produkce vzrostla více než dvěstěásobně a množství vyrobeného plastu v prvním desetiletí současného století se vyrovnalo množství vyrobenému za celé století přecházející. V důsledku pandemie koronaviru došlo na začátku roku 2020 k významnému poklesu výroby, která bohužel záhy opět vzrostla (ČTK, 2021).



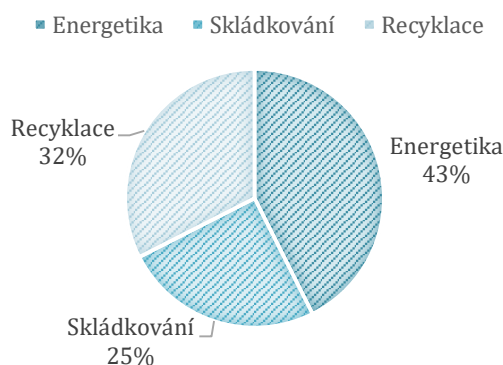
Graf 1: Rapidní vzrůst produkce plastových hmot mezi stoletími (upraveno dle ČTK, 2021)

Růst produkce a nadužívání plastů však není tím nejzávažnějším rizikem pro životní prostředí a všechny jeho složky. Je jím spíše nesprávné nakládání s odpady a současně absence adekvátního řešení, které by zajistilo redukci plastové kontaminace. Životní prostředí je tak doslova zamořeno plastovými částicemi různých velikostí a člověk tak výrazně ohrozil sám sebe (Thompson et al., 2009).

2.1.1 Environmentální důsledky nadprodukce plastů

Nejčastější způsob odstraňování plastového odpadu z prostředí je jeho využití v energetice nebo recyklace. Až čtvrtina vzniklých syntetik je ukládána na skládkách (Graf 2). Technologická, kapacitní a finanční omezení pro znovuzpracování odpadu jsou hlavním důvodem nízkého podílu recyklace v EU. Důsledkem nedostatečné recyklace plastových hmot v evropských zemích je kromě ekonomických ztrát také značné poškození životního prostředí, ať už se jedná o nárůst skleníkových plynů v atmosféře vlivem spalování, nebo o hmotnou kumulaci odpadu na skládkách i mimo ně (ČTK, 2021).

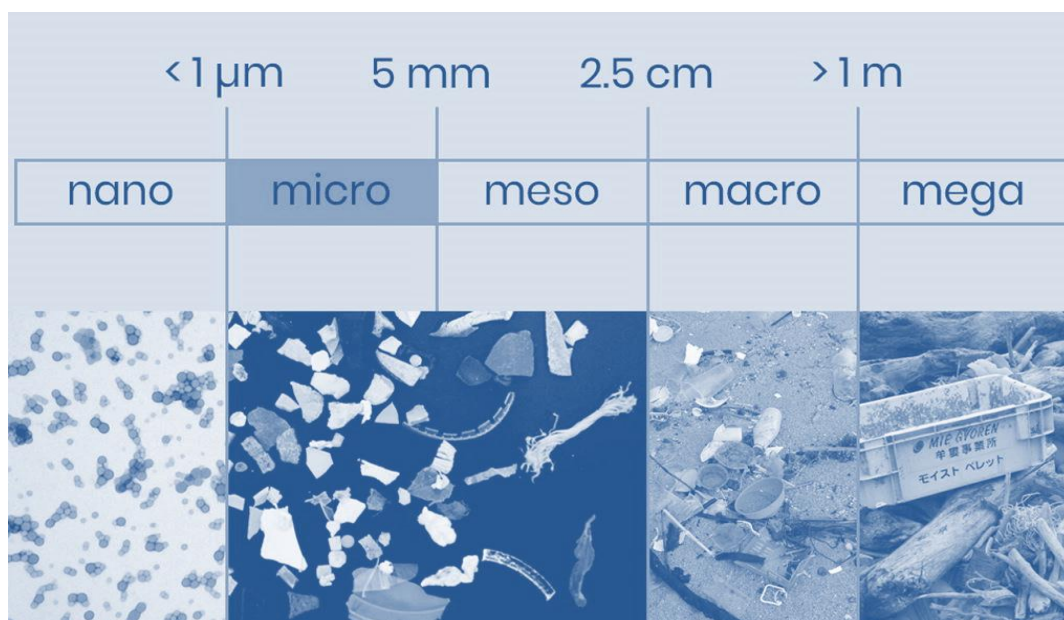
CO SE DĚJE S PLASTY V EVROPSKÝCH ZEMÍCH?



Graf 2: Podíl redukce plastového odpadu v EU (vypracováno dle ČTK, 2021)

Plasty, zahrnující obaly, odpad ze stavebnictví, elektrozařízení, součásti z vozidel s ukončenou životností a spoustu dalších syntetik, jsou hlavními složkami domácích i průmyslových odpadů. Kapacita pro ukládání odpadu na skládku je omezená a v některých lokalitách již plasty dosahují na skládkách maxima, nebo se k němu rychle blíží (Barnes et al., 2009).

Nedostatky v redukci nadbytečných plastů způsobují nárůst kumulace nežádoucího odpadu v životním prostředí. Dochází tak k celkovému narušování ekologické rovnováhy v ekosystémech a jejich společenstvech. Vlivem mechanických sil nebo UV záření může docházet k částečné degradaci makroskopického plastového odpadu nebo k odlučování menších fragmentů ze zdroje. Vzniklé částice pak mohou mít nejrůznější tvary a velikosti, s čímž souvisí i jejich rozdílný vliv na biotické a abiotické složky prostředí. Zároveň dochází k uvolňování vláken ze syntetických textilií a vyplavování plastových pelet a mikroperliček přidávaných do kosmetických výrobků. Plastové částice menší než 5 mm jsou označovány jako mikroplasty (viz Obrázek 1), případně nanoplasty, pohybují-li se jejich rozměry pod hodnotou 1 μm . Mikroplasty dále rozdělujeme na dvě základní skupiny; primární mikroplasty - vyrobené cíleně v mikroskopické velikosti, a sekundární mikroplasty - vzniklé rozpadem větších plastových kusů a vyznačující se tedy nerovnoměrným tvarem (Barnes, 2002; Wagner et al., 2014). Podrobná charakteristika, dělení a vlastnosti mikroplastů jsou kompletně popsány v předchozí bakalářské práci „Analýza mikroplastových částic v balených nápojích“.



Obrázek 1: Klasifikace plastových fragmentů dle velikosti (Kunz, ©2022)

Zdá se, že se průměrná velikost plastových částic v životním prostředí stále zmenšuje. Množství a globální distribuce mikroplastových fragmentů se v posledních několika desetiletích zvýšila. Environmentální důsledky těchto částic začínají být vědci postupně objasňovány (Barnes et al., 2009).

2.1.2 Environmentální důsledky vzniku mikroplastů

Mikroplasty mohou mít vliv na biologické i geologické přírodní procesy. Ovlivňují vlastnosti sedimentů, mají negativní dopad na fyziologické procesy organismů a jsou významným zdrojem znečištění všech složek životního prostředí. Plastové částičky také často slouží jako substrát pro mnohé organismy. Prostřednictvím neustálého koloběhu částic v rámci celé planety tak může docházet k zásadním změnám druhové diverzity v jednotlivých částech světa (Duis et Coors, 2016).

Kromě toho, že dochází k hmotné kumulaci plastů v krajině, částice navíc dokážou reagovat s prostředím. To znamená, že se během degradace plastů do okolí můžou uvolňovat nebezpečné látky, které jsou do umělých hmot přidávány za cílem zajistit jejich pevnost, pružnost a stabilitu. Vyluhování těchto látek může být velké riziko nejen pro abiotické složky prostředí, ale hlavně pro živé organismy. Jedná se často o polychlorované bifenyly (PCBs) ze skupiny perzistentních organických látek (POPs), bisfenoly, organochloridové pesticidy či polyaromatické uhlovodíky (PAH). Problém spočívá v jejich toxických účincích různého charakteru (Crampton, 2017).

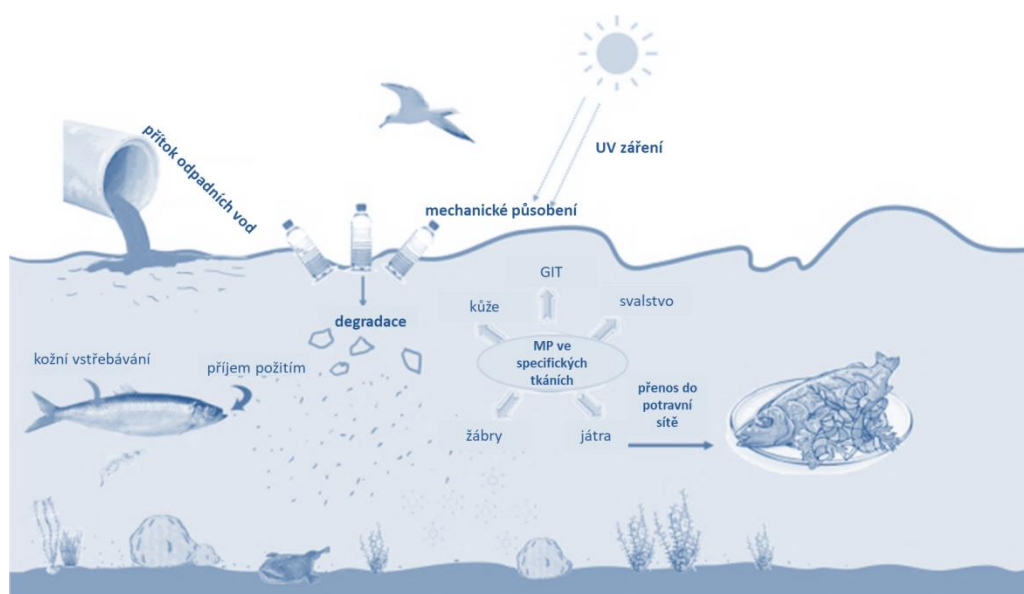
Aditiva vzbuzující zvláštní obavy jsou ftalátová změkčovadla a bisfenol A (BPA). BPA a ftaláty se nacházejí v mnoha masově vyráběných produktech včetně lékařských zařízení, obalů na potraviny, parfémů, kosmetiky, hraček, podlahových materiálů, počítačů a CD, a mohou představovat významný podíl plastových hmot. BPA je využíván jako jeden z monomerů při výrobě polykarbonátů, zatímco ftaláty nejsou chemicky vázány na plastovou matici, a proto se mohou z produktů snadno vyluhovat. Zvláštní pozornost přitahují zejména kvůli vysokým objemům a širokému využití v produkci syntetických polymerů. Existují značné obavy

z nepříznivých účinků těchto chemikálií na volně žijící zvířata a člověka – viz dále (Barnes et al., 2009).

2.2 Vliv mikroplastů na živé organismy

Nezpracované plastové odpady vyloučené do životního prostředí mohou snadno interagovat s živými organismy. Živočichům znemožňují pohyb, zejména ve vodním prostředí, kde dochází k největší kumulaci plastů. Syntetické fragmenty bývají živočichy požití často jako součást jiných pozřených organismů, nebo v důsledku záměny za jejich přirozenou potravu (Prinz et Korez, 2020).

Příjem plastových částic byl dokázán u spousty bezobratlých i obratlovců. Vzhledem k zanedbatelné velikosti mikroplastů a nanoplastů dochází ke snadnému transportu částic na různých úrovních, zejména trofickým přenosem z kořisti na predátora. Ve vodním prostředí se tak rozsáhlá expozice mikroplastům týká zejména dravých ryb (Harvey, 2016; Larue et al., 2021; Farrell et Nelson, 2013). Vstup mikroplastů do potravního řetězce skrze tkáně ryb je zobrazen na následujícím obrázku č. 2.



Obrázek 2: Vstup mikroplastů do potravního řetězce (upraveno dle Abbasi et al., 2018)

2.2.1 Toxicita mikroplastů u ryb

Existuje spousta studií popisujících toxické účinky a patologické stavy v tělech ryb, způsobené požitím mikroplastových fragmentů. Metodika experimentů je často založena na podávání mikroplastových potažmo nanoplastových částic živým zástupcům, s cílem pozorovat u daných jedinců vykazované změny. Použité částice byly většinou na bázi polystyrenu (PS) nebo polyethylenu (PE). Důležitým obecným jevem je, že toxicita vzniká obvykle z plastových částic menších než 100 μm , větší neprokázaly v řadě studií žádný významný účinek (Ašmonaitė et al., 2018; Jacob et al., 2019). Požívání mikroplastů může vést k abnormalitám chování týkajících se pohybu nebo například krmení. Často bývá narušen i přirozený průběh reprodukce u dospělých jedinců. Existují důkazy o přenosu mikroplastů z matky na potomky, kdy prenatální expozice mikroplastům ovlivnila časný vývoj novorozenců (Pitt et al., 2018; Wang et al., 2019).

V mnoha případech byly mikroplasty u ryb nalezeny nahromaděné ve střevech, játrech nebo žábřácích (viz Obrázek 2 a 3). Pozorované změny často souvisely se vznikem zánětů, narušením mikroflóry nebo změnami metabolických pochodů indukovaných oxidačním stresem. Ve vzácnějších případech byly mikroplasty nalezeny také v mozku ryb, kde často způsobily inhibovanou aktivitu acetylcholin-esterázy (AChE), která se účastní přenosu nervového vzruchu (Ding et al., 2018).



Obrázek 3: *Plastové úlomky nalezené v těle kranase duhového - Autor: Gyres Institut© (Thomson, 2018)*

Studie ukázaly, že některé druhy ryb často upřednostňují plastové fragmenty před planktonem, který je jejich běžnou potravou. Tato skutečnost vyvolává velké obavy vědců, neboť následkem bývá zakrnělý růst, změny chování a viditelné potlačení obranných reflexů. Jedinci jsou pak snadněji vystaveni potenciálním predátorům a mikroplasty se tak dále šíří prostřednictvím potravního řetězce k dalším taxonům (Harvey, 2016).

2.2.2 Toxicita mikroplastů u laboratorních myší

Chování mikroplastů v tělech savců začalo být postupně objasňováno díky studiím prováděným primárně na laboratorních myších. Nález plastových mikročástic byl potvrzen ve střevě, játrech a ledvinách savčích modelů (Yang et al., 2019). Patologické změny střeva zahrnují střevní zánět, dysbiózu střevní mikroflóry a sníženou sekreci hlenu. Mezi zaznamenané jaterní patologie patří zánět a poruchy metabolismu doprovázené změnami lipidového profilu (Luo et al., 2019; Li et al., 2019).

Studie na savčích modelech neodhalily žádné závažné následky, změny chování nebo jiné abnormality. Toxicita často závisela na velikosti plastu, koncentraci a vitalitě organismu. Obecně je stupeň mikroplastové toxicity pozorovaný u myší méně závažný než u ryb. Jedním z možných důvodů může být více cest vstupu mikroplastů do těla ryb (ústní otvor, žábry), zatímco experimenty s krměním myší se omezují pouze na gastrointestinální příjem (Yong et al., 2020).

2.2.3 Toxicita mikroplastů v lidských buňkách in vitro

V současnosti stále neexistuje dostatek podkladů pro komplexní zhodnocení vlivu mikroplastů na lidský organismus in vivo. Několik studií se však zabývalo účinkem mikroplastů na lidské buňky v kulturách in vitro. Dosud uváděné experimenty posuzující vliv mikroplastů na lidské buňky nenaznačovaly závažné cytotoxické nebo cytostatické účinky, ale prokázaly potenciál pro řadu negativních efektů v závislosti na typu buňky, velikosti mikroplastů/nanoplastů a stupni buněčného příjmu. Nejčastěji pozorované jevy v souvislosti se vstupem mikroplastů do buněk

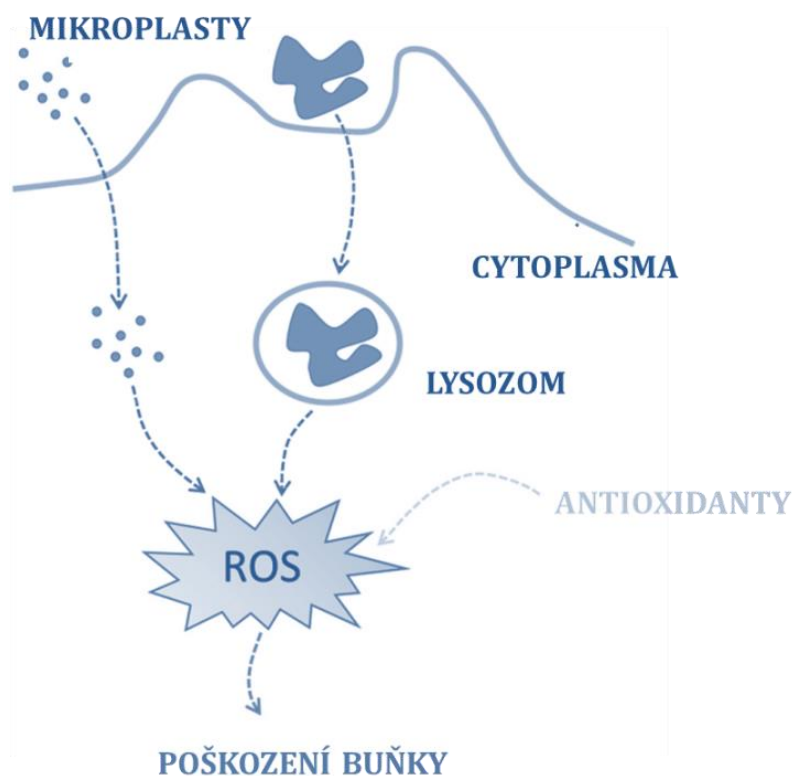
jsou produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a prozánětlivé reakce (Yong et al., 2020).

2.2.3.1 Mechanismus toxického účinku mikroplastů na lidské buňky

Obecně platí, že extrémně vysoké koncentrace mikroplastů jsou skutečně cytotoxické. Čím menší jsou rozměry plastových částic, tím snadněji mohou pronikat do buněk a migrovat mezi tkáněmi. Mikroplast respektive nanoplast vstupuje do buněk endocytózou nebo skrze fosfolipidovou membránu. Dle Prinzové a Korezové (2020) musí být částice menší než 50 nm, jinak není schopna organickou bariéru buňky překonat (Prinz et Korez, 2020).

Endocytované nanoplasty představují problém z několika důvodů. Mohou narušit stabilitu membrán při průniku do buněk, a pokud jsou přítomny ve vysokých koncentracích, mohou v cytosolu potenciálně interagovat s důležitými kompartmenty, jako jsou mitochondrie nebo jádro. Stejně tak mohou narušovat buněčné procesy, jako je například tvorba mitotických vřetének a chromozomální migrace během buněčného dělení (Yong et al., 2020).

Jakmile se cizorodý fragment vyskytuje v buňce, indukuje tvorbu ROS (viz Obrázek 4), jejichž nadbytek způsobuje oxidační stres. Buňky jsou chráněny prostřednictvím antioxidantů, které regulují hladinu ROS v buňce. Při přetrvávající kumulaci mikroplastů v buňce však nerovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty způsobuje její poškození. K buněčné smrti může dojít jednou z forem programované buněčné smrti (apoptóza, autofagie) nebo prostřednictvím nekrotického prasknutí plazmatické membrány (Prinz et Korez, 2020; Yong et al., 2020).



Obrázek 4: Schéma událostí po vstupu MP do buňky (upraveno dle Prinz et Korez, 2020)

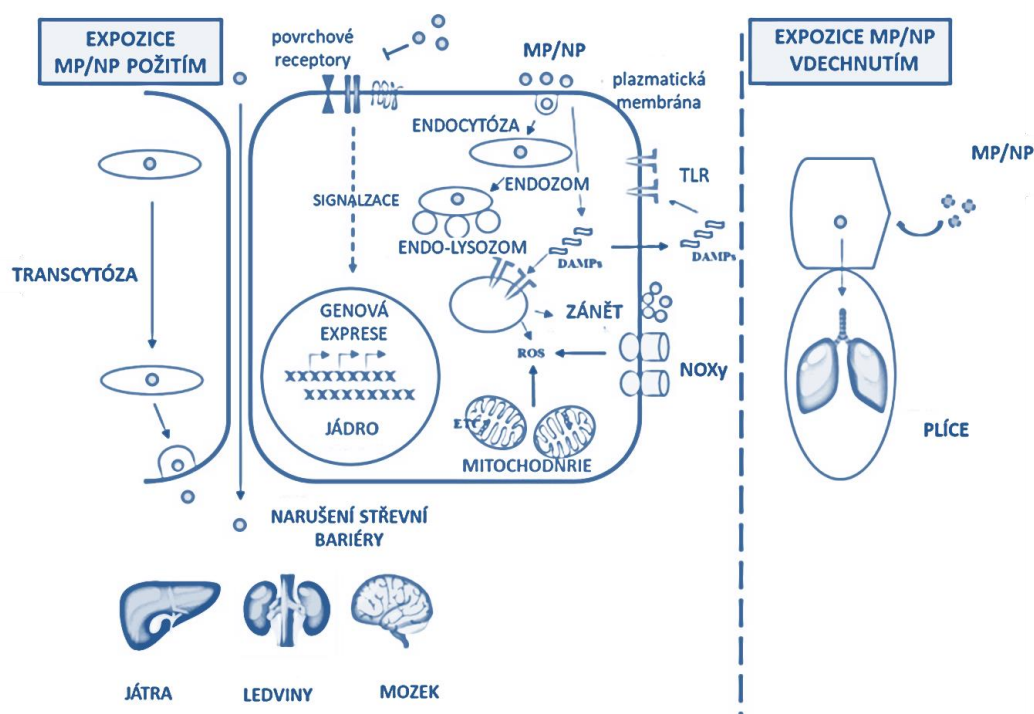
K produkci ROS v buňkách dochází dvěma způsoby: z mitochondriálního elektronového transportního řetězce (ETC) během aerobního dýchání nebo prostřednictvím oxidativních vzplanutí NADPH oxidáz (NOX). Zvýšení ROS prostřednictvím ETC by mohlo být výsledkem poškození mitochondriální funkce, zatímco v druhém případě se běžně jedná o důsledek bakteriální invaze, neboť NOXy jsou aktivovány bakteriálními produkty nebo cytokiny. Všechny buňky jsou evolučně vybaveny mechanismem vrozené imunity, který funguje obecně proti invazi patogenů nebo expozici xenobiotikům (Bedard et Krause, 2007; Riera Romo et al., 2016).

Složky vrozeného imunitního systému však mohou reagovat také na sadu endogenních nebo sekretovaných molekul souhrnně známých jako DAMPs, z anglického „damage-associated molecular patterns“, které zahajují neinfekční zánětlivou odpověď. Výsledkem bývá tzv. sterilní zánět neboli zánět bez patogenní infekce (De Lorenzo et al., 2018).

Cytokiny uvolněné z takto lokalizovaných zánětů pak přitahují cirkulující imunitní buňky, což by mohlo způsobit zhoršení a rozšíření zánětu vedoucí ke smrti buněk či tkání (Yong et al., 2020).

Dle Grevenové a kolektivu (2016) bylo skutečně prokázáno, že nanoplasty působí jako stresory na vrozený imunitní systém ryb, a je tedy pravděpodobné, že je tomu tak rovněž u savčích, potažmo lidských buněk.

Mechanismus toxického účinku mikroplastů na lidské buňky, kompletně popsany výše, je shrnut na obrázku č. 5.



Obrázek 5: Mechanismus toxického účinku MP na lidské buňky (upraveno dle Yong et al., 2020)

Schématický diagram znázorňuje potenciální buněčné mechanismy toxicity mikroplastů v savčích buňkách: Částice mohou být přijímány požitím či vdechnutím (viz dále). Pravděpodobně jsou schopné narušit plasmatickou membránu, střevní bariéru nebo i signalizaci buněčných povrchových receptorů, a změnit tak genovou expresi v jádře. Endocytované mikroplasty pravděpodobně ovlivňují funkci endocytárních drah. Stresy vyplývající z výše uvedeného by mohly aktivovat DAMPs indukující vrozenou imunitní odpověď zprostředkovanou toll-

like receptory (TLR). Vlivem přetrvávající přítomnosti cizorodých částic v buňce a neustávajícího stresu poté dochází k nadměrné produkci ROS. Mikroplasty se mohou dostat do oběhu, pokud je narušena střevně-vaskulární bariéra (viz dále). Speklativně může k transportu dojít i transcytózou skrze sliznici střeva a částice se tak dostanou i do jiných orgánů. Do plic se mikroplasty dostávají zpravidla skrze inhalaci kontaminovaného vzduchu (Yong et al., 2020).

S prokazatelným nárůstem syntetických materiálů v našem prostředí je zapotřebí více studií, abychom plně porozuměli riziku mikroplastů pro lidské zdraví, což vyžaduje znalosti o expozici člověka, patogenezí a účincích na jednotlivé části organismu (Prata et al., 2020).

2.3 Vliv mikroplastů na lidský organismus

Již prokázaná všudypřítomnost mikroplastů v životním prostředí a ve spotřebitelských produktech vede u člověka k nevyhnutelné expozici (Prata et al., 2020). Lidé jsou vystaveni mikroplastům téměř denně a je pravděpodobné, že se jejich příjem může zvyšovat. Některé studie totiž odhadují, že pokud budou pokračovat současné trendy produkce a zpracování odpadů, bude se do roku 2050 v životním prostředí a na skládkách vyskytovat 12 miliard tun plastového odpadu a do roku 2060 se objem syntetického odpadu na planetě ztrojnásobí (Geyer et al., 2017; Lebreton & Andrady, 2019). Situace byla v posledních letech negativně ovlivněna také spotřebou nadměrného množství osobních ochranných pomůcek (OOP) a obličejových masek v rámci celosvětové pandemie COVID-19 (Benson a kol., 2021).

Existuje několik cest a příčin průniku mikroplastů do živých soustav. Každá z nich představuje různě závažné riziko pro lidský organismus (Lett et al., 2021).

Částice mohou být z těla vyloučeny bez jakýchkoliv změn, anebo naopak setrvávají v tkáních. Zde bývají zpracovány pomocí složek přirozené imunitní odpovědi tak, aby byl jejich škodlivý efekt potlačen. Zpráva Evropského úřadu pro bezpečnost potravin zároveň uvedla, že lidské tělo je pravděpodobně schopno zbavit se více než 90 % požitých mikroplastů vylučováním močí nebo stolicí (EFSA, 2016).

Dle Lett a kolektivu (2021) je nepravděpodobné, že by byl člověk vystaven mikroplastům prostřednictvím akutních expozičních příhod, po nichž by následovalo období bez expozice. Rozlišení akutní a dlouhodobé kontinuální expozice je důležité při zvažování toxicity částic a celkové schopnosti organismu odstraňovat nahromaděné mikroplasty.

Při vyšších koncentracích příjmu se částice v organismu kumulují a mohou mít negativní vliv na zdraví člověka (Harvey, 2016).

2.3.1 Cesty vstupu mikroplastů do organismu

Mikroplasty se do těla dostávají zpravidla třemi způsoby příjmu: požitím částicemi kontaminovaných potravin (dietární expozice), vdechováním mikroplastů přítomných ve vzduchu (inhalační expozice), případně skrze narušenou pokožku (dermální expozice) prostřednictvím textilií, kosmetických výrobků nebo prachu (Prata et al., 2020).

2.3.1.1 Dietární expozice

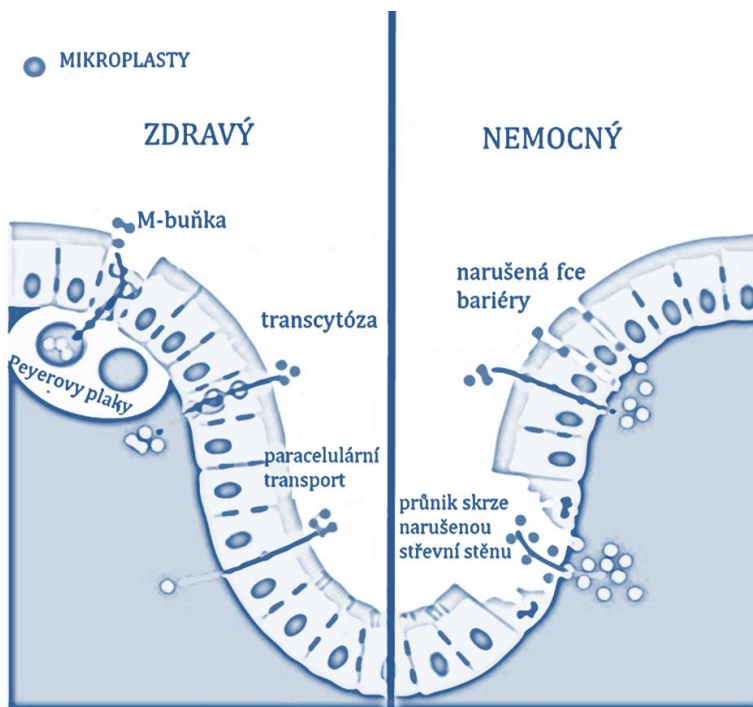
Požítí je považováno za nejčastější způsob expozice člověka mikroplastům. Tento typ expozice můžeme dále rozdělit na přímý a nepřímý. K přímému požití dochází konzumací vody nebo potravin, které byly kontaminovány primárními či sekundárními mikroplasty, často v důsledku nevhodné úpravy, zpracování, skladování nebo balení surovin (Smith et al., 2018; Lett et al., 2021). Nepřímé požití, označované také jako trofický přenos, zahrnuje konzumaci organismů, jejichž tkáně jsou již mikroplastovými částicemi kolonizovány (Miller et al., 2020).

Plastové částičky byly detekovány v řadě potravin. Největší množství částic může člověk požít konzumací ryb a mořských plodů, zejména mušlí a ústřic (Yao et al., 2021). Mikroplasty byly dále odhaleny v kuchyňské soli, cukru, medu, ale i v jiných potravinách (Smith et al., 2018). Významným zdrojem jsou mimo jiné i balené nápoje a pitná voda (Jin et al., 2021), což bylo také potvrzeno v rámci praktické části diplomové práce.

Velké obavy v oblasti mikroplastové problematiky představují plastové nádoby a obaly, ze kterých se při špatném skladování pravděpodobně odlučují mikroskopické fragmenty přímo do potravin (Rist et al., 2018). Současně může být pokrm kontaminován těmi nejmenšími nanoplasty prostřednictvím prachu, který se šíří vzduchem a usazuje se na nejrůznějších předmětech, včetně nádobí (Catarino et al., 2018).

Pozřené částice prochází trávicím traktem spolu s potravou a ve střevě mohou být adsorbovány specializovanými M-buňkami, které pokrývají střevní lymfoidní tkáň

– Peyerovy plaky. M-buňky jsou součástí vrozené slizniční imunity a předávají informaci o zachycených cizorodých částicích dalším buňkám imunitního systému. Vstřebávání částic skrze slizniční bariéru závisí také na charakteru natrávené potravy a stavu střeva (Ensign et al., 2012). Narušená epiteliální bariéra s největší pravděpodobností umožňuje snadnější vstup částic do oběhového systému (viz Obrázek 6).



Obrázek 6: Vstup mikroplastů do organismu v závislosti na stavu střevního epitelu (upraveno dle Bredeck et al., 2022)

2.3.1.2 Inhalační expozice

Mikroplasty jsou uvolňovány do vzduchu prostřednictvím syntetických textilií a oděrem plastových materiálů. Individuální inhalace se odhaduje na 26–130 vzduchem přenášených mikroplastů za den (Prata, 2018).

Ukládání částic v dýchacím systému je ovlivněno zejména velikostí, kdy mikroplasty menších rozměrů postupují zpravidla hlouběji do plic. Ačkoliv bývají často vdechnuty i částice větších velikostí (jednotky - desítky μm), nedochází u nich k ukládání v plicích zásluhou mukociliární clearance (MC). Jedná se o mechanismus dýchacích cest, který chrání plíce před velkými vdechovanými

částicemi. Pomocí mikroskopických řasinek jsou částice suspendovány v hlenu, který je v dýchacím endotelu pravidelnými pohyby přenášen zpět směrem do hltanu, kde jsou částice společně s hlenem vykašlány nebo spolknuty (Gasperi et al., 2018).

Vdechnuté částičky mohou být v rámci přirozené imunity pohlceny plicními makrofágy nebo migrují do oběhového systému, což vede k translokaci částic napříč různými tkáněmi. Velké množství cizorodých částic v dýchacím systému může vyvolat intenzivní uvolňování chemotaktických faktorů, které brání migraci makrofágů a zvyšují tak permeabilitu buněčných membrán vedoucí k zánětům (Donaldson et al., 2000). U běžné populace je příjem mikroplastů prostřednictvím inhalace ve srovnání s dietární expozicí téměř zanedbatelný. Symptomy spojené s rozvojem onemocnění dýchacích cest byly pozorovány zejména u pracovníků exponovaných nadměrnému množství syntetického prachu např. v textilním průmyslu nebo při výrobě PVC.

Nedávná studie (Lim et al., 2021) prováděná na potkanech prokázala, že kontinuální inhalační expozice mikroplastům způsobuje řadu změn hematologických a biochemických markerů. Došlo k expresi zánětlivých proteinů - transformujících růstových faktorů (TGF α , TGF β) - a znásobení počtu bílých krvinek, což svědčí o podstatném zánětu. Autoři naznačují, že kontinuální expozice v důsledku zvýšení úrovně znečištění mikroplasty by mohla znamenat změny fyziologických funkcí organismu na vyšší úrovni (Lim et al., 2021).

Plastové částice byly v organismu člověka detekovány také v rámci biopsie nádorové plicní tkáně, ale vzájemná kauzalita mikroplastové kumulace a rakovinného bujení nebyla přímo prokázána. Je nicméně velmi pravděpodobné, že při vysoké koncentraci nebo individuální citlivosti organismu mohou vzduchem přenášené mikroplasty způsobit poškození dýchacího systému (Prata et al., 2020).

2.3.1.3 Dermální expozice

Ačkoliv bylo prokázáno, že plastové nanočástice mohou prostupovat dermální bariérou, příjem mikroplastů skrze pokožku je považován za nejméně častý způsob

expozice (Revel et al., 2018). Stejně jako v ostatních případech je vstup a transport částic v organismu usnadněn narušením souvislosti tkáně v podobě mechanického poranění nebo jiné abnormality. Zdrojem kontaminace mohou být často syntetické textilie nebo kosmetické přípravky s obsahem umělých abraziv přidávaných do výrobků, jako jsou krémy nebo zubní pasty za účelem čistící schopnosti (Lett et al., 2021; Prata et al., 2020). Z tohoto důvodu americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválil zákon omezující výrobu a distribuci přípravků obsahujících syntetické mikroperličky (tzv. microbeads). Zákon vstoupil v platnost roku 2015 a vztahuje se na kosmetiku vyrobenou po roce 2017 a léčiva vyrobená po roce 2018 (FDA, 2015). Dermální expozice je spojována také s monomery a přísadami plastů, jako jsou například BPA nebo ftaláty, které jsou součástí většiny každodenně používaných plastových produktů (Campanele et al., 2020).

2.3.2 Zdravotní rizika mikroplastů

Velké množství kumulujících se mikroplastů vede k cytotoxicitě a translokaci do okolních tkání, kde přetrvávají. Obtížné vylučování syntetik z těla může způsobit chronické záněty, případně iniciovat vznik zhoubných nádorů. Zároveň se mikroplasty pravděpodobně podílejí na zvyšujícím se výskytu imunitních nebo neurodegenerativních onemocnění. Mohou uvolňovat toxické chemikálie nebo působit jako vektory pro nebezpečné mikroorganismy (Crawford et Quinn, 2017).

Některé studie mimo jiné potvrdily, že mikroplasty mohou mít negativní dopad na energetickou homeostázu a ovlivňovat tak příjem a výdej látek daného organismu (Watts et al., 2015; Xu et al., 2017).

Mikroplasty kdysi považované za inertní částice s nulovou toxicitou jsou nyní prokázány jako potenciálně škodlivé pro živé organismy, v závislosti na expozici a citlivosti jedince (Anbymani et Kakkar, 2018).

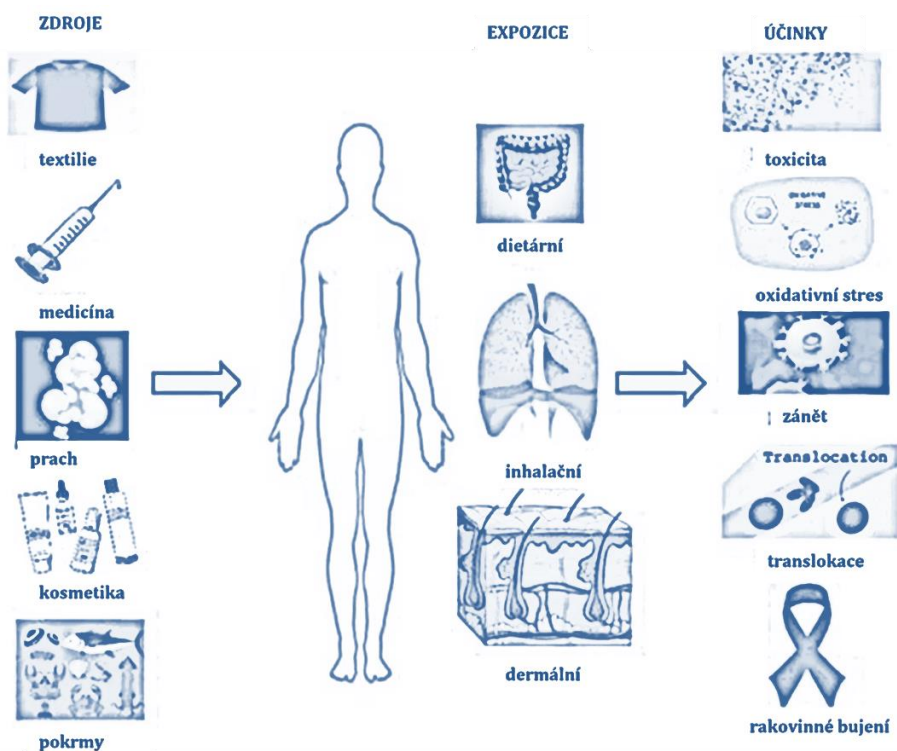
2.3.2.1 Cytotoxicita

Toxicita na úrovni buněk je výsledkem toxicity plastových částic, oxidačního stresu a zánětu. Uvnitř buněk nejsou mikroplasty vázány na membránu a interagují s buněčnými strukturami. Při vyšší koncentraci příjmu dochází k akumulaci částic

v buňkách a tvorbě oxidačního stresu, který zapříčiní poškození buňky a následnou buněčnou smrt – více viz 2.2.3.1 (Prata et al., 2020).

2.3.2.2 Translokace mikroplastů do oběhového systému

Nejpravděpodobnějším místem akumulace mikroplastů jsou Peyerovy plaky, které tvoří součást slizniční imunity v tenkém střevě (viz 2.3.1.3). Prostřednictvím přítomných M-buněk může být mikroplast fagocytován a transportován z lumenu do krevního řečiště (Lett et al., 2021). Translokace je zvláště pravděpodobná během zánětu, a to v důsledku zvýšené permeability epiteliální bariéry. Sliznice gastrointestinálního traktu (GIT) může být narušena změnou střevního mikrobiomu vlivem podvýživy či nadměrného příjmu cukrů a nasycených tuků (West-Eberhard, 2019; Prata et al., 2020). Hwang a kolektiv (2020) předpokládají, že přibližně 1-4 % mikroplastů vstupujících do střeva se následně přemísťuje do krve. V oběhu mikroplasty způsobují záněty (viz Obrázek 7), cévní okluzi, zvýšenou srážlivost (hyperkoagulabilitu), a bývají zdrojem cytotoxicity postihující krevní buňky (Canesi et al., 2015).



Obrázek 7: Cesty expozice člověka mikroplastům a související rizika (upraveno dle: Sana et al., 2020)

Bylo také zjištěno, že krevní proteiny, jako je albumin a globulin, interagují s nanoplasty za vzniku protein-plastických komplexů. Pokud jsou takovéto agregované komplexy přítomny ve velkém množství, mohly by potenciálně vést k zablokování krevních cév. Zatímco zatížení erytrocytů nanoplasty v nízkém poměru 1:50 neovlivnilo funkce erytrocytů, 10–50krát vyšší koncentrace potvrdila jejich poškození vyvolané mechanickým, osmotickým a oxidačním stresem. Zároveň však není jisté, že by se v lidském oběhu za přirozených podmínek mohla vyskytnout velká akutní akumulace nanoplastových částic (Mohr et al., 2014; Pan et al., 2016).

Prostřednictvím krevního řečiště se plastové částice mohou dostat také do dalších orgánů, zejména jater a ledvin, které jsou zodpovědné za metabolismus a vylučování xenobiotik (Deng et al., 2017). Po dosažení prahové hodnoty by kontinuální akumulace částic v hepatocytech a renálních tubulárních buňkách mohla vést k významnému poškození funkce zasažených orgánů (Liu et al., 2015; Monti et al., 2015).

2.3.2.3 Neurotoxická a neurodegenerativní onemocnění

Velká řada xenobiotik prokazatelně přispívá k neurotoxické, která je důvodem vzniku nevratných změn v podobě neurodegenerativních onemocnění, jako je například Alzheimerova choroba nebo demence. Dle Barbozy a kolektivu (2018) jsou mikroplasty jedny z látek, které mohou narušit funkci nervového systému, a to v důsledku přímého kontaktu s translokovanými částicemi nebo působením prozánětlivých cytokinů. Vlivem vznikajícího oxidačního stresu dochází k poškození neuronů. Testování toxicity in vivo skutečně ukázalo, že mikroplasty mohou narušovat funkci AchE, která je pro přenos nervového vzruchu nezbytná (Barboza et al., 2018).

2.3.2.4 Reprodukční a vývojová toxicita

Reprodukční a vývojová toxicita byla zkoumána na několika organismech a bylo prokázáno, že dochází zejména k poškození gamet nebo embrya. Mikroplasty mohou způsobovat hormonální poruchy, záněty a poškození pohlavních orgánů,

což vede k následným malformacím. Částice jsou schopny interagovat s choriovou membránou a ovlivnit tak vývoj plodu. Reprodukční toxicita mikroplastů ve výsledku způsobí abnormální vývoj potomstva a mikroplasty se mohou přenést z rodiče na potomka (Duan et al., 2020; Yin et al., 2021).

Chorion obklopující embryo chrání plod před škodlivými účinky polutantů. Obsahuje velké množství pórů o velikosti 500 nm, které brání vstupu větších částic skrze membránu. Lee a kolektiv (2019) uvádí, že nanoplasty o velikosti 50-200 nm mohou proniknout chorionem a negativně ovlivnit embryo. Větší plastové částice nejsou schopny bariéru membrány překonat a hromadí se na povrchu, čímž může být snížena absorpce kyslíku embryem. Vnitřní prostor membrány pak vytváří hypoxické prostředí, mění se srdeční frekvence plodu a může dojít k významnému ovlivnění vývoje (Chen et al., 2020a).

Kromě přímého poškození embrya narušují mikroplasty reprodukci tím, že ovlivňují sekreci hormonů a způsobují endokrinní poruchy. Mikroplasty prokazatelně snižují hladinu luteinizačního hormonu (LH), lutein stimulujícího hormonu (LSH) nebo testosteronu, a mohou způsobit degeneraci varlat, zánět nebo abnormality spermií. Toxicita může souviset také s narušením lipidové dvojvrstvy pohlavních buněk. Poškození integrity membrány, která je klíčová při buněčném dělení, může vést k zástavě vývoje v průběhu embryogeneze (Tallec et al., 2018).

2.3.2.5 Mikroplasty jako chemické a biologické riziko

Kromě fyzikálního rizika v podobě mechanického narušování tkání při vysokých koncentracích cizorodých částic v organismu mohou mikroplasty představovat také značné chemické a biologické riziko. Toxický monomer a přísady se mohou vyluhovat z mikroplastové matrice uvnitř organismu a vystavovat tkáně chemikáliím, jako jsou ftaláty nebo BPA (Cole et al., 2011). Pokud některé z těchto chemikálií vyluhovaných z plastových hmot dosáhnou v těle organismu určité koncentrace, mohou se chovat jako endokrinní disruptory. Jedná se o chemické, hormonálně aktivní látky, které mají často karcinogenní, popřípadě mutagenní

nebo teratogenní účinky. I při nízkých koncentracích interferují s endogenními hormony. Ovlivňují syntézu, transport, navázání, působení nebo i vylučování přirozených hormonů a celkově tak narušují řadu fyziologických pochodů v buňkách (Wagner et Oehlmann, 2009).

Částice na sebe mohou vázat také ostatní potenciálně toxické a karcinogenní látky ze skupiny POPs, například PCBs nebo PAU, které byly identifikovány v mikroplastech získaných ze životního prostředí. Při požití by organismy mohly být vystaveny vyšším koncentracím těchto chemikálií nebo dokonce zesílení jejich toxicity. Nicméně expozice POPs důsledkem příjmu mikroplastů se zdá být zanedbatelná ve srovnání s příjmem z potravy a vody (Bakir et al., 2016; Crawford et Quinn, 2017)

Mikroplasty mohou dále sloužit jako vektory pro mikroorganismy, které označujeme jako patogenní pro člověka, například bakterie rodu *Vibrio spp.* Prostřednictvím kolonizace syntetických částic tak patogeny snadno pronikají do hostitelského organismu, migrují mezi tkáněmi a mohou u člověka způsobovat závažná infekční onemocnění. Plastové částičky chrání mikroorganismy před imunitním systémem a vytváří mechanické poškození tkání, které může podpořit a rozšířit stávající infekci (Kirstein et al., 2016).

Dle publikace autora Zhu a kolektivu (2018) mikroplasty způsobují změnu druhové rozmanitosti střevního mikrobiomu u půdních organismů. Po požití určitého množství částic by takový efekt mohl nastat i u člověka.

Změny střevního mikrobiomu následně mohou vést k nepříznivým účinkům, jako je proliferace škodlivých druhů, endotoxémie nebo změny střevní permeability. Negativní účinky látek a mikroorganismů zaleží na typu pozřené mikroplastu, době expozice, charakteru kontaminantu a druhu či zdravotním stavu hostitele (West-Eberhard, 2019)

2.3.3 Toxicita v závislosti na velikosti částic

Současný výzkum mikroplastů se zaměřuje především na transport, bioakumulaci a celkovou toxicitu. Stávající přehledy však nanoplasty a mikroplasty prezentují jako celek a zanedbávají odlišnou toxicitu těchto skupin (Yin et al., 2021).

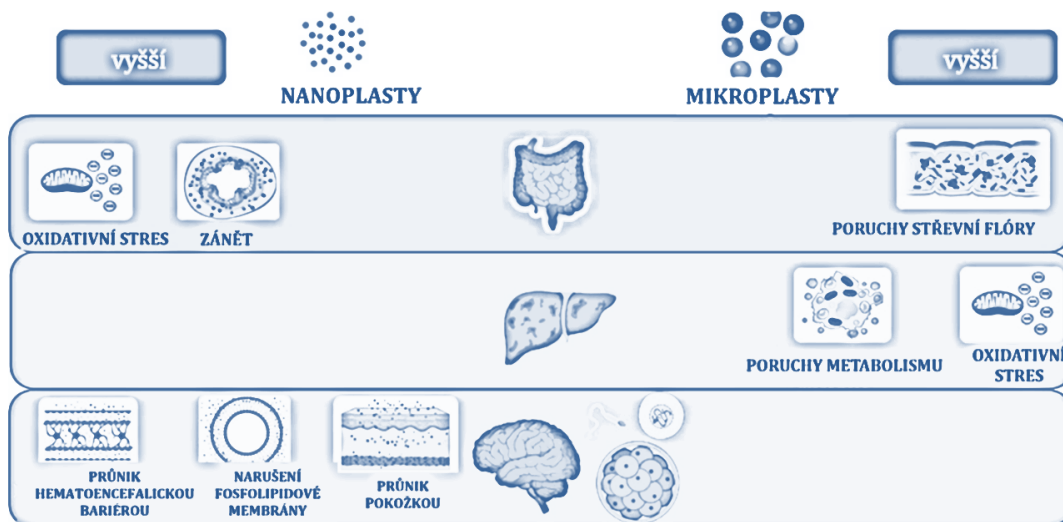
Obecně se má za to, že mikroplast menší velikosti má vyšší biologickou dostupnost. Prostřednictvím menších rozměrů a většího specifického povrchu mají nanoplasty schopnost prodloužit retenční čas v těle, a jsou tedy toxičtější pro biotu (Rist et al., 2017).

Bylo zjištěno, že v některých orgánech je ale toxický účinek zcela opačný (viz dále). Větší částice vykazují vyšší destruktivní sílu a ve srovnání s nanoplasty způsobují rychlejší stresovou reakci poruchy metabolismu (Yin et al., 2019).

Plasty mají velice stabilní chemickou strukturu, ale fyzikální vlastnosti jednotlivých částic se mohou lišit, a to v závislosti na jejich velikosti. Jeden z výzkumů realizovaných v Číně ukázal, že u nanoplastů je mnohem vyšší pravděpodobnost agregace než u mikroplastů (Sun et al., 2020). Čím je rozměr mikroplastu větší, tím obtížněji dochází ke kolizi a tvorbě shluků s ostatními částicemi, čímž může být usnadněn přímý kontakt plastů s tělními buňkami, které jsou následně často poškozeny. K tomuto účinku může docházet například v játrech, kde je toxicita lipofilních plastových částic ovlivněna mimo jiné také syntézou a distribucí lipidů. Mikroplasty zde v porovnání s nanoplasty obtížněji vytváří shluky se vzniklými molekulami tuku a jejich destruktivní účinky nejsou dostatečně potlačeny (Yin et al., 2021).

Plastové částice větší velikosti naproti tomu vykazují nižší toxicitu na nervovou soustavu a reprodukci. Konverze mikroplastů na nanoplasty může výrazně pozměnit toxický mechanismus a odpovídajícím způsobem poškodit nervy či reprodukční funkce. Nervová a pohlavní soustava mohou zásluhou bariér mezi orgánem a krevním řečištěm blokovat průnik větších částic. Podobně je to se strukturou střeva zvrásněného mikroklky. V těchto tkáních je záchyt a akumulace nanoplastů ve srovnání s mikroplasty mnohem vyšší – Obrázek 8 (Yin et al., 2021).

JAKÝ JE ROZDÍL V TOXICITĚ?



Obrázek 8: Přehled toxických účinků v závislosti na velikosti částic (upraveno dle Yin et al., 2021)

Dle studií, zabývajících se účinky plastových úlomků na rybí organismy (Huang et al., 202; Ding et al., 2018), se za stejných fyziologických podmínek organismu nanoplasty snadněji hromadí ve střevech, zatímco mikroplasty spíše v játrech.

Antioxidační systém těla je obecně citlivější na stimulaci nanoplasty a produkuje vyšší úroveň oxidačního stresu (viz 2.2.3.1). Naproti tomu mikroplasty způsobují zpravidla větší míru poruchy střevní flóry, která se projevuje především výraznější změnou mikrobioty a vznikem zánětů (Kang et al., 2020).

Výzkumy týkající se mikroplastové kontaminace byly v posledních letech zaměřeny na různé druhy živočichů (Yang et al., 2019; Yong et al., 2020), zejména na vodní organismy (Yao et al., 2021; Barboza et al., 2018; Abbasi et al., 2018; Harvey, 2016). Doposud ale nebylo vědecky dokázáno, zda existuje druhová specifita v rozdílu toxicity mezi mikroplasty a nanoplasty. Současně existují různé typy mikroplastů a výzkum se zaměřuje především na takové, které jsou zdrojem závažného znečištění, jako je polystyren (PS), polyetylen (PE) a polypropylen (PP). Různé složky plastů způsobují, že jejich vlastnosti jsou velmi odlišné, což může také ovlivnit rozdíl v toxicitě mezi jednotlivými částicemi. Současný výzkum toxicity mikroplastů navíc není dostatečně komplexní, zejména v případě dýchací a endokrinní soustavy (Yin et al., 2021).

2.3.4 Hodnocení zdravotních rizik

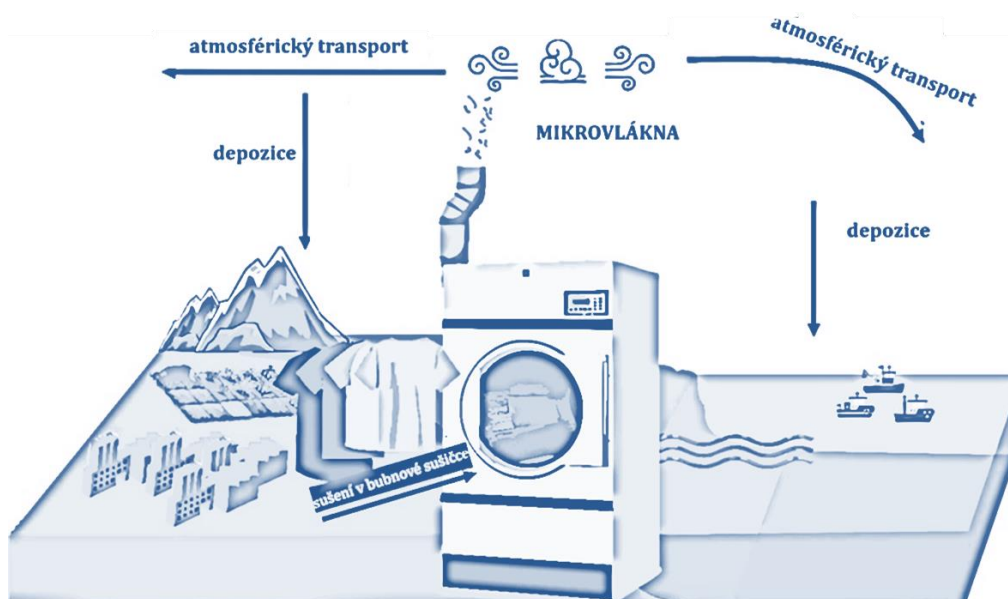
Expozici člověka mikroplastům lze určit pomocí typických diagnostických postupů. Aplikace biologického monitoringu a hodnocení expozice pomocí biomarkerů je v případě samotných mikroplastů velice obtížná, neboť se jedná o velmi heterogenní skupinu různého původu, vlastností a velikostí, a tudíž i účinky na prostředí a živé organismy mohou být různé. V rámci humánního biomonitoringu lze určit expozici člověka výše zmíněným toxickým látkám (PCBs, PAU), jejichž zdrojem v organismu mohou být právě požitá mikroplasty. Lidé jsou syntetickým částicím exponováni všemi třemi známými cestami: inhalačně, perorálně i transdermálně. Gastrointestinální expozici lze určit analýzou vzorků stolice, zatímco bronchiální výplachy mohou poskytnout informace o kontaminaci dýchacího ústrojí. Biopsie a tkáně získané z pitev mohou být použity při histologickém stanovení mikroplastů. Stále je však zapotřebí u těchto vzorků vyvinout metody identifikace, které zahrnují například barvení histologických řezů usnadňující detekci částic. Analýza bude vždy omezena dostupností tkáně a také potenciální kontaminací vzorků, nejčastěji v důsledku rozšířeného používání plastových materiálů v lékařství. Vzhledem k prokázané translokaci mikroplastů do oběhového systému a dalších vzdálených tkání a orgánů lze k vyhodnocení expozice a s ní spojených rizik využít také vzorky krve nebo moči. Účinky mikroplastů na lidské zdraví mohou být stanoveny studiemi na savčích modelech, jako jsou myši nebo krysy (viz kapitola 2.2.2), popřípadě na buněčných kulturách in vitro – viz kapitola 2.2.3 (Prata et al, 2020).

Jedním z důvodů nedostatečného množství informací o dopadech mikroplastů na lidský organismus je obtížná detekce (Prata et al., 2020), ale i přísná opatření bezpečnosti pro manipulaci s lidskými vzorky (Vyhláška č. 306/2012 Sb.).

2.4 Problematika mikroplastů v současnosti: chronologicky

Je známo, že mikroplasty jsou již téměř všudypřítomné. V uplynulých letech, kdy je plastovým odpadům a nakládání s nimi věnována maximální pozornost, byly mikroplasty nalezeny ve sladkých vodách i v mořích (Wagner et al., 2014), ve vzduchu (Gasperi et al., 2018), v půdě (Boots et al., 2019), v tělech mnohých organismů (Yong et al., 2020), v potravinách (Jin et al., 2021), ale i ve stolici člověka (Schwabl et al., 2019), čímž byl poprvé průkazně podložen příjem plastových částic lidským organismem. V posledním roce přibylo velké množství studií a opatření, které by se mohly stát milníky v problematice mikroplastové kontaminace, a objasňují spoustu dosud nepodložených teorií. V této kapitole je chronologicky seřazen souhrn těch nejvýznamnějších událostí za rok 2022.

Nová vědecká studie z ledna 2022 v Hongkongu odhalila, že jedním z hlavních zdrojů kontaminace ovzduší mikroplasty jsou sušičky na prádlo (Obrázek 9). Tao a kolektiv (2022) tvrdí, že při sušení syntetických oděvů se ventilačním otvorem uvolňuje až 40x více vláken než při praní. Vědci v rámci studie navrhli také vlastní filtrační systém, který by měl být schopen mikrovlákna zachytit a eliminovat tak únik do ovzduší (Tao et al., 2022).



Obrázek 9: Kontaminace ovzduší prostřednictvím sušičky na prádlo (upraveno dle: Tao et al., 2022)

Na začátku roku také prošel v evropských zemích, včetně České republiky, prvním čtením návrh zákona *o omezení dopadu vybraných plastových výrobků na životní prostředí*, jehož cílem byla implementace stejnojmenné směrnice Evropského parlamentu a Rady EU. Nový zákon by měl doplnit již stávající *zákon o odpadech* (Zákon č. 541/2020 Sb., ©2022), a kromě zákazu produkce vybraných plastových výrobků upravuje také pravidla pro nakládání s odpady a povinnosti při označování a uvádění produktů na trh. Zákaz produkce a distribuce se týká především jednorázových plastových výrobků, jako jsou brčka, plastové příbory, talíře, nápojové kelímky, vatové tyčinky nebo tyčky k podpěře balónků. Zákon vyšel v platnost v srpnu roku 2022 s účinností od října (Beck, 2022; Zákon č. 243/2022 Sb., ©2022).

V březnu 2022 byly mikroplasty poprvé objeveny a kvantifikovány v lidské krvi týmem vědců z Amsterdamské Univerzity (Leslie et al., 2022). Studie potvrdila hypotézu, že při expozici člověka mikroplastům mohou být částice následně translokovány do krevního řečiště. *„Zbývá určit, zda jsou plastové částice přítomny v plazmě nebo jsou nesený specifickými typy buněk. Pokud jsou mikroplasty přítomné v krevním řečišti skutečně nesený imunitními buňkami, vyvstává také otázka, zda takové expozice mohou potenciálně ovlivnit imunitní regulaci nebo vyvolat onemocnění.“*, uvádí v závěru studie Leslie a kolektiv (2022).

V dubnu britští vědci z Hull York Medical School potvrdili objev mikroplastových částic v nejhlubších částech plic žijících pacientů. Do té doby byly mikroplasty izolovány pouze z odumřelých tkání při pitvě. Pozitivní nález byl potvrzen u 85 % pacientů a nejčastěji zastoupeným plastem byl PET. Pro autory studie bylo překvapivé zejména to, že poměrně velké částice nebyly dříve odfiltrovány nebo zachyceny imunitním systémem a dostaly se i do nejhlubších částí plic, které jsou standardně velmi úzké (Jenner et al., 2022).

Původem indická vědkyně přišla v průběhu roku s ekologickou novinkou. Zjistila, že rostlinné extrakty z lusků ibišku jedlého (nazývaného také „okra“) mohou úspěšně napomáhat odstranění mikroplastů z odpadních vod. Nečistoty včetně mikroplastů jsou standardně odstraňovány pomocí flokulantů, což jsou často

chemikálie, které usnadní agregaci částic, které jsou následně ve slucích odstraňovány ze dna. Z důvodu potenciální toxicity těchto látek se tým docentky Srinivasanové rozhodl otestovat přírodě blízkou alternativu s použitím rostlinných polysacharidových extraktů (viz Obrázek 10). Metoda byla potvrzena jako účinná a autoři se chystají postup aplikovat pro komerční využití (Srinivasan, 2022).



Obrázek 10: Extrakt z okry jako flokulant v pitné vodě (Srinivasan, 2022; ilustrace Israel G. Vargas©)

Na začátku června byla vydána studie Avesové a kolektivu (2022), která jako první potvrdila přítomnost mikroplastových částic i v čerstvě napadeném sněhu na Antarktidě. Částice byly nalezeny ve všech testovaných vzorcích odebraných z různých částí kontinentu. „Nález mikroplastů v čerstvém sněhu na Antarktidě bohužel zdůrazňuje rozsah plastového znečištění i v těch nejodlehlejších oblastech světa“, konstatovala autorka výzkumu (Aves et al., 2022).

Na podzim tým italských vědců ve své studii potvrdil mikroplasty i v mateřském mléce, a to u 75 % vzorků. Autoři tím poukazují na možné negativní dopady na kojence a doporučují těhotným ženám vyhýbat se potravinám baleným v plastu či jiným zdrojům kontaminace. Zároveň apelují na prosazování zákonů upravujících pravidla pro snížení plastového znečištění (Ragusa et al., 2022).

2.5 Detekce mikroplastů v balených vodách

V současné době již existují vyzkoušené metodické postupy pro efektivní detekci mikroplastů ve vodách. Stěžejním krokem výzkumu je v každém případě filtrace. Zatímco vzorky pro testování vod povrchových nebo odpadních jsou nejprve odebírány do laboratorních lahví nebo čerpány pomocí speciálních vzorkovačů, vody balené jsou filtrovány přímo z nakoupených lahví. Pro správnou interpretaci výsledků koncentrace mikroplastů by u testovaných vzorků měl být uveden zdroj (značka), druh (pramenitá, minerální, kojenecká) a typ (neperlivá, jemně perlivá, perlivá) balené vody, případně i výrobní šarže. Vzorky balených vod není nutné před samotnou filtrací dále upravovat, zbavovat nečistot či jinak zpracovávat, jako je tomu zejména u odpadních nebo i povrchových vod (Koelmans et al., 2019).

Jednou z nejefektivnějších analytických metod pro stanovení tvaru, velikosti, počtu a základního složení mikroplastových částic v balených vodách je, dle Pivokonského a kolektivu (2020), rastrovací elektronová mikroskopie v kombinaci s energiově disperzní rentgenovou spektroskopií (SEM-EDS).

2.5.1 Skenovací elektronová mikroskopie

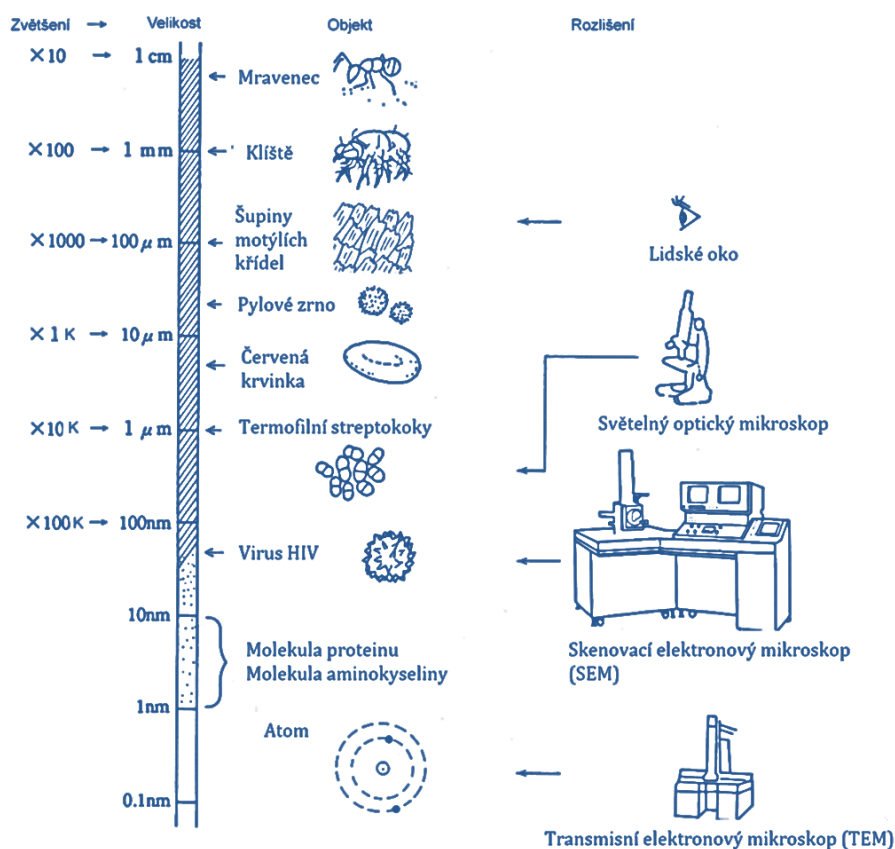
Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) je metoda zobrazování a zvětšování těch nejmenších mikroskopických objektů či struktur, které jsou za normálních okolností lidskému oku neviditelné. Na rozdíl od optického mikroskopu využívá místo světelného paprsku proud elektronů. Obraz je vytvářen skenováním elektronového paprsku na povrchu vzorku – proto název skenovací elektronový mikroskop (Ul-Hamid, 2018). Pro analýzu vnitřních struktur vzorku je nutno použít transmisní elektronový mikroskop (TEM), který k zobrazování využívá elektronový paprsek procházející vzorkem skrz (Navrátil et Rosina, 2005).

Zásluhou kratší vlnové délky elektronového záření je mikroskop schopen rozeznat ty nejjemnější rysy a detaily materiálů, jež nejsou optickým mikroskopem viditelné. Nejnovější typy SEM dokáží rozlišit i objekty menší než 1 nm, které zvětší až milionkrát (UPOL, ©2022).

Mikroskop se používá také pro charakterizaci materiálů a poskytuje informace o povrchové struktuře. Interakce vzorku s elektronovým paprskem emituje rentgenové záření, jehož energii lze zachytit prostřednictvím EDS detektoru pro určení prvkového složení zkoumaného objektu – viz dále (Ul-Hamid, 2018).

2.5.1.1 Rozlišení obrazu v SEM

Lidské oko není schopné rozlišit objekty menší než 200 μm . Rozlišení lidského oka je tedy 200 μm . Limit rozlišení je dán nejmenší rozlišitelnou vzdáleností oddělující dva objekty. Znamená to, že dva objekty oddělené vzdáleností menší než 200 μm se lidskému oku jeví jako jeden. U světelného mikroskopu lze dosáhnout rozlišení až 0,2 μm . Čím nižší je tedy hodnota minimální rozlišitelné vzdálenosti, tím vyšší je rozlišení mikroskopu. V případě elektronového mikroskopu je k tvorbě obrazu použit elektronový paprsek s mnohem kratší vlnovou délkou než viditelné světlo, čímž je dosaženo vyššího limitu rozlišení (viz Obrázek 11), a to až v řádech desetin nm (Ul-Hamid, 2018).

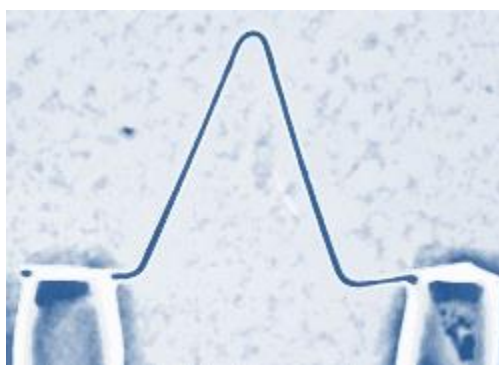


Obrázek 11: Spektrum rozlišitelných velikostí jednotlivými mikroskopy (upraveno dle: UPOL, ©2022)

2.5.1.2 Komponenty SEM a tvorba obrazu

Přístroj je složený ze tří hlavních částí: elektronového sloupce, vzorkové komory a počítačového ovládacího systému. Podstatnou část přístroje tvoří také sekundární komponenty jako vakuová čerpadla, vodní chladič nebo elektronika, bez nichž SEM nemůže fungovat (Ul-Hamid, 2018).

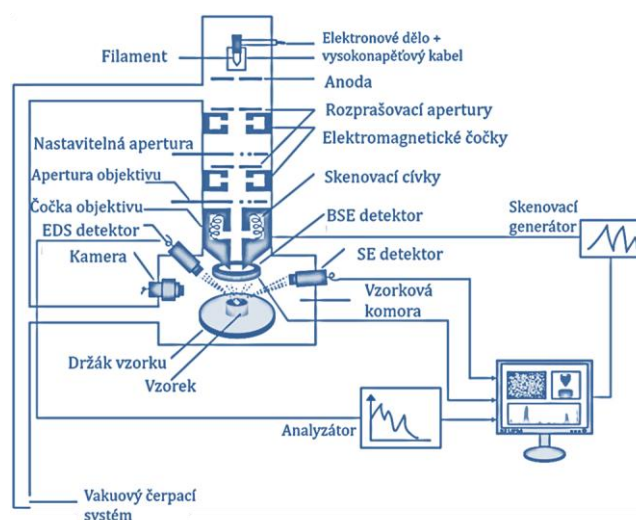
Elektronový sloupec (kolona) je válcovité těleso umístěné nad komorou vzorku a je po celou dobu udržován ve vakuu, aby bylo zabráněno interakci se vzduchem a rozptylu emitovaných elektronů. Nejvyšší část sloupce tvoří sestava katod s přidruženými elektrodami označovaná jako **elektronové dělo**, které generuje elektronový paprsek. Síla a rychlost, kterou elektrony prochází kolonou, je ovlivněna použitým urychlovacím napětím, které se standardně pohybuje mezi 2 a 30 kV, a závisí na typu vzorku nebo zvolené analýze. Existuje několik variant SEM v závislosti na typu použitého zdroje elektronů. Jedním z nejpoužívanějších je filamentový SEM, který byl pro analýzu použit i v tomto výzkumu. Filament (vlákno) je slabý drátek (průměr $\geq 100 \mu\text{m}$) vyrobený z žáruvzdorného wolframu, vytvarovaný do vlásenky ve tvaru V (viz Obrázek 12). Při pozorování je filament zahříván elektrickým proudem až na teplotu $2500 \text{ }^\circ\text{C}$, čímž dochází k emisi elektronů ze špičky vlákna (Ul-Hamid, 2018). Nevýhodou filamentového zdroje je nízká výstupní energie a krátká životnost. Výhodou je nízká hodnota vakua potřebná pro provoz (Šafářová, ©2022).



Obrázek 12: Wolframový filament „V“ jako zdroj elektronů v SEM (Převzato z: NANOSCIENCE, ©2022)

Proud elektronů je nasměrován ke vzorku pomocí měděných **elektromagnetických čoček** umístěných uvnitř sloupce. Čočky vytváří vhodné elektromagnetické pole a elektronový paprsek je zaostřen a zmenšen 100 až 5000krát na velikosti sondy 0,5 pm až 10 nm, aby mohlo dojít k zobrazení a analýze povrchu. Počet a úhel sbíhajících se elektronů procházejících sloupcem řídí tzv. **apertury**, což jsou obdélníkové proužky molybdenu s otvory o různém poloměru, kterými prochází řízený paprsek. Zabraňují tak vychýlení elektronů z dráhy a zvyšují rozlišení obrazu. Pro dosažení vysokého rozlišení je použita malá apertura, kdežto pro chemickou analýzu je využívána apertura velká. Elektronový paprsek je dokonale zaostřen pomocí **čočky objektivu** a dopadá na povrch vzorku v jediném místě. Proud elektronů je skenován zleva doprava pomocí dvou sad **skenovacích cívek** umístěných v sestavě čoček objektivu (Obrázek 13). Signál generovaný ze zájmového místa vzorku je zpracován **detektorem** a zobrazen na odpovídajícím pixelu monitoru (Ul-Hamid, 2018).

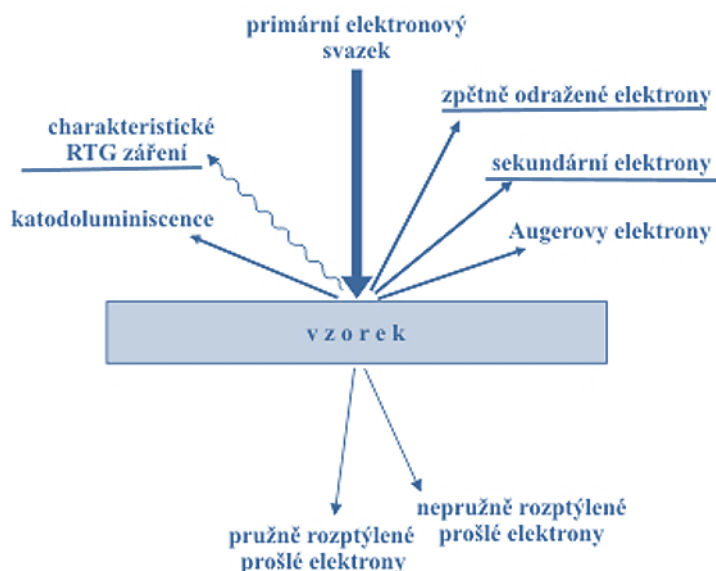
Vzorková komora je umístěna na bázi elektronového sloupce. V komoře je umístěn výsuvný stůlek a držák vzorku, kamera pro snímání vzorku a několik detektorů pro zobrazování a mikrochemickou analýzu. Komora je udržována ve vakuu, které ale nemusí být tak vysoké jako v případě elektronového sloupce. Obě sekce mají tedy vlastní vakuový systém. Velikost zkoumaného vzorku je omezena pouze rozměrem držáku vzorku a objemem vakuové komory (FZU, 2017; Ul-Hamid, 2018).



Obrázek 13: Schéma konstrukce SEM (upraveno dle: Ul-Hamid, 2018)

Moderní SEM je ovládán počítačovým systémem s vhodnou softwarovou platformou. Skrze příslušný program je ovládána většina funkcí elektronového mikroskopu, jako je například odvodušnění komory, pohyb stolku s držákem vzorku, výkon filamentu, mikrochemická analýza, ukládání dat a další (Ul-Hamid, 2018).

Při interakci elektronů se vzorkem dochází k tvorbě signálů (Obrázek 14), které se odráží od povrchu vzorku a jsou zpracovány různými typy detektorů zabudovanými v konstrukci SEM. **Sekundární elektrony (SE)** se odráží z místa dopadu primárního elektronového svazku a jejich zpracováním příslušným detektorem získáme informaci o topografii částic. Sekundární elektrony jsou tedy využívány k analýze povrchů či struktur a jejich detekce pod určitým úhlem vytváří trojrozměrný efekt. **Zpětně odražené elektrony (BSE)** jsou emitovány z větší hloubky pozorované struktury a umožňují tak rozeznávat i materiálové rozdíly. Dopadem primárního elektronového svazku dochází také ke vzniku charakteristického **rentgenového záření (RTG)**. Tento signál je zpracován speciálním EDS detektorem, který je schopný vyhodnotit chemické složení pozorovaných částic ve formě prvkových spekter (MATCA, ©2022).

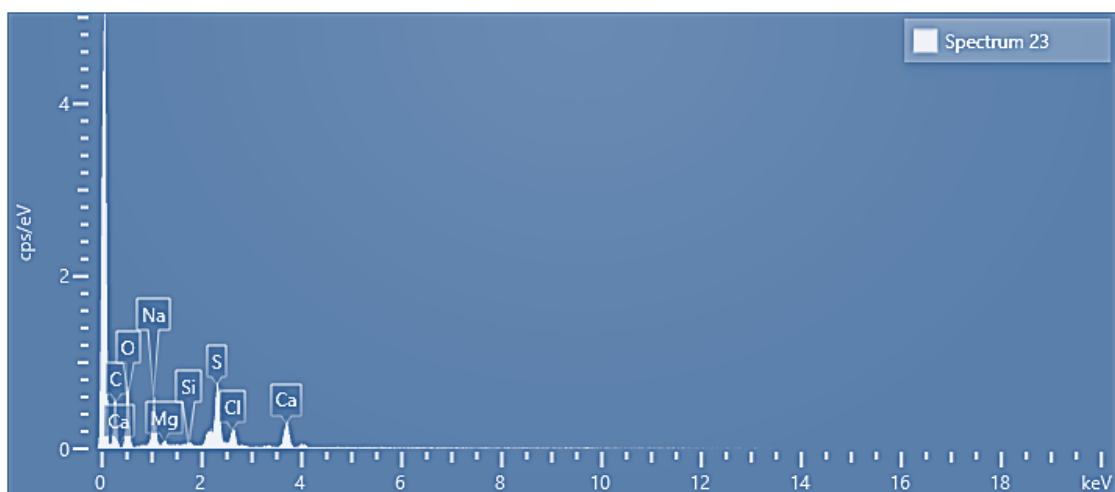


Obrázek 14: Přehled signálů vznikajících interakcí primárního elektronového svazku a vzorku (upraveno dle: MATCA, ©2022)

2.5.2 Energiově disperzní spektroskop

U většiny vzorků je žádoucí vyhodnotit nejen morfologii pozorovaných struktur, ale i informaci o chemickém složení. Proto je elektronový mikroskop často opatřen komponenty, které zajistí kompletní identifikaci částic. Nejčastěji využívanou technikou pro mikrochemickou analýzu je energiově disperzní rentgenová spektroskopie (EDS). V koloně SEM je umístěn EDS detektor, který zpracovává signál vznikající při dopadu elektronů na povrch vzorku a zároveň nijak neovlivňuje zobrazovací schopnost přístroje (Ul-Hamid, 2018). Provoz detektoru je opět řízen počítačovým systémem a průběh analýzy sledován na monitoru. Mikrochemická analýza prostřednictvím EDS je rychlá, účinná a nedestruktivní metoda identifikace a ověřování materiálů (Cais, 2015).

Interakce proudu primárních elektronů s povrchem vzorku generuje charakteristické rentgenové záření. EDS detektor sbírá tento signál kolimační trubicí, která zajistí odklon nežádoucích elektronů. Na základě změřené intenzity a distribuce vzniklé energie dochází k identifikaci prvků obsažených v testované oblasti. Detekce zahrnuje nejen spektrum prvků (viz Obrázek 15), ale i jejich koncentrace v analyzované oblasti vzorku, a výsledkem je tedy kvalitativní i kvantitativní analýza. Na základě poměru obsažených prvků je možné určit původ pozorovaných struktur (Ul-Hamid, 2018).

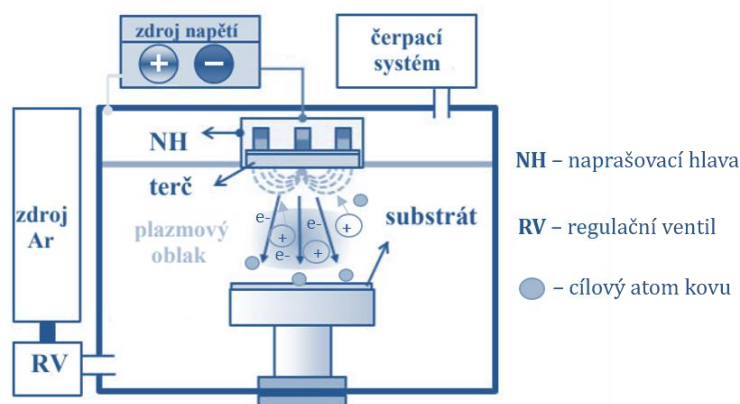


Obrázek 15: Prvkové spektrum - EDS analýza (zdroj vlastní)

2.5.3 Naprašování vzorků

Kvůli špatné vodivosti některých materiálů by vzorky měly být potaženy vodivým materiálem, čímž je zabráněno nabíjení částic elektronovým paprskem a špatné kvalitě obrazu. Nejspolehlivější a nejúčinnější metodou nanášení vodivých vrstev je iontové naprašování vzorku (Cais, 2015). Dochází k rovnoměrnému rozložení vodivé vrstvy ze všech směrů, a proto se používá pro efektivní zpracování i těch nejčlenitějších a nejdrsnějších povrchů. Jako povlakový materiál je nejčastěji využíváno zlato, ale i platina, palladium a další kovy. Naprašování je provedeno v přítomnosti inertního plynu (nejčastěji argon) za vysokého až středního vakua, kterého je dosaženo pomocí rotačního čerpadla. Pro efektivní průběh pokovení je nutné, aby v naprašovací komoře nebyly přítomny žádné molekuly H_2O ani O_2 , které by mohly způsobit poškození vzorku (Ul-Hamid, 2018, Fitl et al., ©2022).

Po odčerpání vzduchu a vytvoření vakua je do naprašovací komory vpuštěno optimální množství argonu z lahve prostřednictvím regulačního ventilu (viz Obrázek 16). Vysoké napětí aplikované mezi katodou (terčem) a anodou (platforma vzorku) vytváří plazmový oblak iontů. Argon je ionizován prostřednictvím magnetického pole a vzniklé kationty bombardují kovový terč, čímž dochází k erozi povrchu terče a extrakci atomů kovu, které jsou následně ukládány na povrch vzorku v tenké vrstvě. Na cestě ke vzorku cílové atomy naráží na ionty argonu, který napomáhá disperzi atomů kovu a umožňuje tak rovnoměrné pokrytí i nepravidelných struktur (Ul-Hamid, 2018, Fitl et al., ©2022).



Obrázek 16: Schéma iontového naprašování vzorků (Upraveno dle: Fitl et al., ©2022)

3 Metodika zpracování

Metodická část práce je zaměřena na charakteristiku předmětu analýzy, kterým jsou jednotlivé typy balených vod různých značek, u jejichž vzorků byly v průběhu bakalářského výzkumu detekovány mikroplastové částice. Současně popisuje postupy během přípravy, filtrace, zpracování a uchování vzorků, včetně přístrojového vybavení a použití. Cílem metodické části výzkumu bylo zdokonalit detekci a pozorování, odstranit nedostatky shledané v přechozích analýzách a stanovit co nejúčinnější postup pro rychlou a hodnotnou identifikaci mikroplastů ve vzorcích. Součástí byla také kvantitativní analýza zrealizovaná prostřednictvím rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM).

3.1 Charakteristika vzorků

Před započítím samotného výzkumu byl stanoven předmět a cíl analýzy. Na základě výsledků zjištěných během bakalářského studia byly vybrány balené vody čtyř různých značek, u jejichž lahví byly již mikroplasty prokázány.

3.1.1 Testované balené vody

Pro co nejvíce objektivní porovnání vzorků z hlediska mikroplastové kontaminace byly od každého výrobce zvoleny čtyři typy vod vyskytující se na českém trhu napříč všemi značkami, a sice: neperlivá, jemně perlivá, perlivá a ochucená balená voda s citronovou příchutí. Vzorky byly vybírány tak, aby v rámci všech testovaných vod počet minerálních a pramenitých druhů odpovídal poměru 1:1. Speciální skupinu tvořily vzorky balené ve skle a kategorie kojeneckých vod, pro které platí přísnější požadavky úpravy před stáčením do PET lahví (viz Vyhláška MZ č. 275/2004 Sb.). Tyto typy vod byly dostupné pouze od některých výrobců, a proto sloužily zejména jako ozvláštňující prvek výzkumu. Analýze bylo podrobena celkem 20 různých typů balených vod (přehled v Tabulce 1).

Tabulka 1: Přehled testovaných balených vod (zdroj vlastní)

ZNAČKA	DRUH	TYP (1,5 l)				SPECIÁLNÍ	
<i>MATTONI</i>	minerální	neperlivá	jemně perlivá	perlivá	ochucená (citron)	sklo	
<i>DOBŘÁ VODA</i>	minerální	neperlivá	jemně perlivá	perlivá	ochucená (citron)		
<i>NATURA</i>	pramenitá	neperlivá	jemně perlivá	perlivá	ochucená (citron)	kojenecká sklo	
<i>SAGUARO</i>	pramenitá	neperlivá	jemně perlivá	perlivá	ochucená (citron)	kojenecká	

Z minerálních druhů vod byly do výzkumu zařazeny jedny z nejprodávanějších českých značek *Mattoni* a *Dobrá voda*. Tyto vzorky doplnily pramenité vody značky *Natura* a *Saguaro* (běžně dostupné v potravinových řetězcích Lidl)¹. Vody balené ve skle se podařilo opatřit pouze od značek *Mattoni* a *Natura*. Kategorii kojeneckých vod nabízí výhradně výrobci balených vod pramenitých, tedy *Natura* a *Saguaro*. Souhrnné počty vzorků od jedné značky se tedy nepatrně lišily (Tab. 1).

Celkem bylo zakoupeno 20 různých vzorků balených vod. Od každé lahve bylo opatřeno vždy po dvou kusech odlišné šarže (Obr. 17) s cílem porovnání shodných vod (stejného výrobce a vlastností) mezi sebou. Výrobky se pravděpodobně lišily i podmínkami skladování, neboť jednotlivé lahve byly obstarány z různých prodejen. Všechny testované lahve jsou znázorněny na obrázku č. 17.



Obrázek 17: Balené vody použité ve výzkumu; různé šarže balených vod (zdroj vlastní)

3.2 Příprava vzorků

Testování bylo podrobena celkem 40 lahví, které byly označeny příslušným číslem a písmeny „a“ nebo „b“ v závislosti na šarži (viz Tabulka 2). Jednotlivé lahve byly ihned po zakoupení skladovány v laboratoři při konstantní teplotě vzduchu pod laboratorním stolem z důvodu minimalizace záření, které by mohlo přispět k odlučování fragmentů ze zdroje.

¹ Charakteristika druhů balených vod a možnosti úpravy dle Vyhlášky č. 275/2004 Sb., jsou více rozvedeny v přechodí bakalářské práci (Horáková, 2020)

Tabulka 2: Přehled testovaných vzorků

Vzorek č. [1,5 l]	ZNAČKA	TYP	MATERIÁL OBALU	DRUH
1a 1b	Mattoni	neperlivá	plast	minerální
2a 2b	Mattoni	jemně perlivá	plast	minerální
3a 3b	Mattoni	perlivá	plast	minerální
4a 4b	Mattoni	ochucená	plast	nealko. nápoj
5a 5b	Mattoni	jemně perlivá	sklo	minerální
6a 6b	Dobrá voda	neperlivá	plast	minerální
7a 7b	Dobrá voda	jemně perlivá	plast	minerální
8a 8b	Dobrá voda	perlivá	plast	minerální
9a 9b	Dobrá voda	ochucená	plast	nealko. nápoj
10a 10b	Natura	neperlivá	plast	pramenitá
11a 11b	Natura	jemně perlivá	plast	pramenitá
12a 12b	Natura	perlivá	plast	pramenitá
13a 13b	Natura	ochucená	plast	nealko. nápoj
14a 14b	Natura	jemně perlivá	sklo	pramenitá
15a 15b	Natura	kojenecká	plast	kojenecká
16a 16b	Saguaro	neperlivá	plast	pramenitá
17a 17b	Saguaro	jemně perlivá	plast	pramenitá
18a 18b	Saguaro	perlivá	plast	pramenitá
19a 19b	Saguaro	ochucená	plast	nealko. nápoj
20a 20b	Saguaro	kojenecká	plast	kojenecká

Před dalším zpracováním byly popsány Petriho misky potřebnými údaji pro snadnou identifikaci vzorku při navazujících postupech výzkumu (viz dále). Do Petriho misek byly ukládány filtry se zachycenými částicemi získanými prostřednictvím filtrace jednotlivých lahví. Důkladnou filtrací byl zhotoven vzorek připravený pro následnou analýzu.

3.3 Filtrace

Hledané částice musely být nejprve odděleny od vodní matrice. Každý vzorek byl přefiltrován metodou vakuové filtrace za sníženého tlaku a částice byly zachyceny na filtru vhodném pro další analýzu.

K filtraci všech testovaných vzorků byla použita odolná filtrační aparatura Duran® z borosilikátového skla o objemu 2000 ml/500 ml, do níž byl pinzetou umístěn hydrofilní polyesterový membránový filtr Porafil® (Obrázek 18) o průměru 47 mm.

Velikost pórů, dle výrobce (Plab, ©2022), odpovídá velikosti 0,2 μm , což se jeví jako ideální hodnota porozity pro zachycení i těch nejmenších částic.



Obrázek 18: Polyesterový membránový filtr (zdroj vlastní)

Původně byly pro analýzu zvoleny polytetrafluorethylenové (PTFE) filtry, které hodnotí Pivokonský a kolektiv (2020) jako ideální pro analýzu mikroplastů, avšak z důvodu hydrofobicity se nepodařilo filtraci provést ani po několika pokusech aktivace methanolem a zvýšenou teplotou.

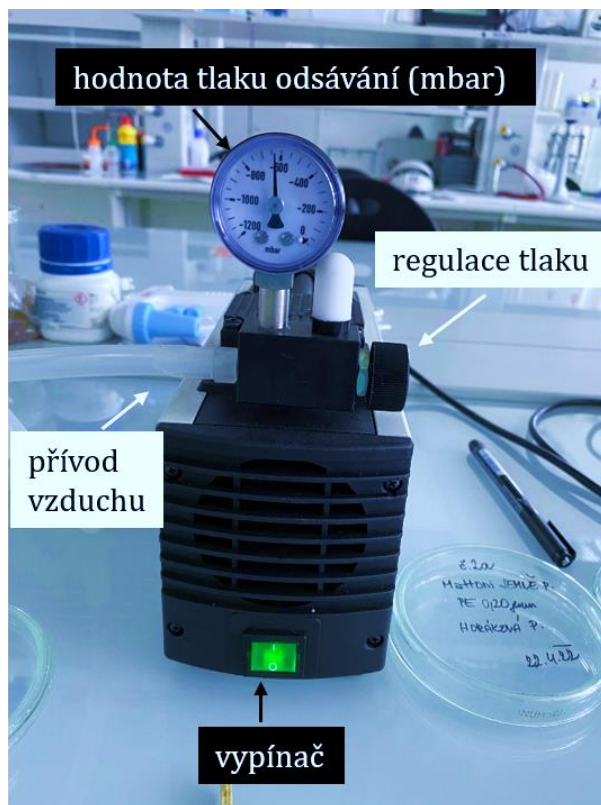
Z důvodu dosažení co nejkvalitnějších výsledků pozorování bylo upuštěno od použití filtrů ze skelných mikrovláken i od membránových filtrů s velikostí pórů větší než 0,20 μm (Obrázek 19).



Obrázek 19: Přehled ostatních testovaných filtrů (zdroj vlastní)

Od každého vzorku bylo přefiltrováno 1,5 litru vody, což je objem odpovídající obvykle jedné PET lahvi. Pro maximalizaci množství uvolněných částic byla lahev nejprve protřepána. Obsah lahve byl nalit do filtrační nálevky o maximálním objemu 500 ml a filtrát byl zachycen ve filtrační baňce o objemu 2000 ml. Oba tyto komponenty byly propojeny filtračním nástavcem, který disponuje také vývodem pro připojení hadicové vývěvy.

Prostřednictvím vývěvy byl z nástavce odsáván vzduch, tlakem odpovídajícím hodnotě přibližně 400-600 milibarů (Obrázek 20), čímž v hrdle aparatury vzniká částečné vakuum a je tedy zajištěna vyšší rychlost a efektivita filtrace. Čím vyšší je hodnota tlaku vyvinutého vývěvou, tím nižší tlak vzniká uvnitř aparatury z důvodu většího množství odčerpaného vzduchu. Tím je zajištěna obecně kvalitnější filtrace. Tlak odsávání vzduchu byl u každého vzorku regulován podle potřeby, v závislosti na konkrétním typu a syčení balené vody.



Obrázek 20: Hadicová vývěva a její nastavení při filtraci (zdroj vlastní)

Klíčem ke snadné a plynule probíhající filtraci je také stoprocentní vzájemné nasedání jednotlivých komponent aparatury. Tuto funkci zajišťoval mimo jiné také teflonový držák, v němž byl pevně ukotven vyjímatelný filtrační kotouč s položeným membránovým filtrem. Pro maximální soudržnost všech částí aparatury byla využita také hliníková svorka.

Filtrační nálevka byla opatřena také příklopkou v podobě víka z Petriho misky pro minimalizaci vzdušné kontaminace.

Filtrační aparatura a všechny její části jsou popsány na obrázku č. 21.

S cílem maximalizace množství zachycených částic byl každý vzorek zpracován dvojnásobnou filtrací skrze jeden shodný filtr a původní lahev byla během druhé filtrace několikrát propláchnuta filtrovanou vodou.



Obrázek 21: Filtrační aparatura Duran® (zdroj vlastní)

3.4 Prevence kontaminace

Kvalita analýzy byla zajištěna postupy, které zaručují maximální možnou prevenci kontaminace vzorků syntetickými částicemi. Mezi nejzásadnější opatření patří vyhýbaní se plastovým předmětům a pomůckám po celou dobu trvání výzkumu od přípravy vzorků až po samotnou analýzu částic.

Experiment probíhal v uzavřené, pravidelně čištěné laboratoři s podlahou z omyvatelného materiálu pro minimalizaci výskytu jakýchkoliv nežádoucích částic. Se vzorky a pomůckami bylo manipulováno v bavlněném oblečení z důvodu rizika kontaminace syntetickými mikrovláknami. Součástí prevence bylo také sepnutí vlasů do gumičky, průběžné mytí rukou a obezřetnost při používání make-upu nebo krémů, které by mohly obsahovat syntetické mikroperličky. Jednorázové laboratorní rukavice, které jsou vyráběny nejčastěji ze syntetických materiálů, byly použity pouze v nezbytně nutných případech (např. manipulace s komponenty elektronového mikroskopu). Ačkoliv výzkum probíhal částečně v období

celosvětové pandemie COVID-19, polypropylenové obličejové masky nebylo vůbec nutné použít.

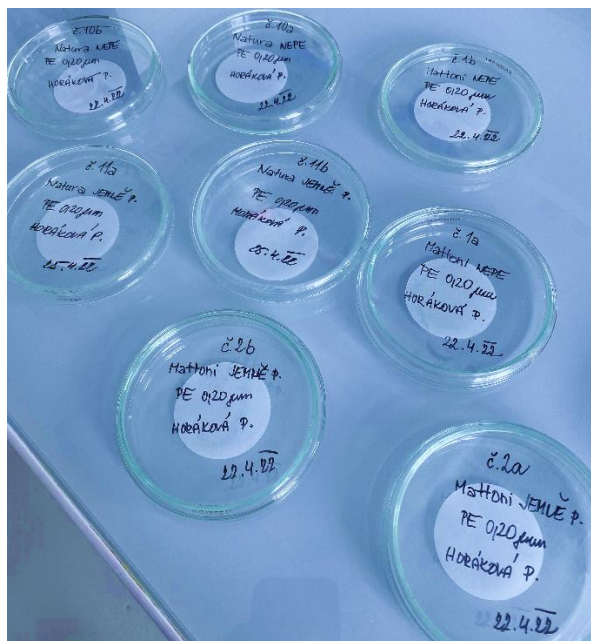
Pro vyhodnocení úrovně možné kontaminace byl analyzován také kontrolní vzorek kohoutkové destilované vody H₂O, kde byl očekáván nulový nález mikročástic (viz Výsledky). Tento vzorek sloužil pouze jako ověření správnosti metodického postupu.

Každá testovaná lahev byla nejprve opláchnuta destilovanou vodou z vnější strany, aby byla zachována potřebná čistota prostředí, rukou a pomůcek. Filtrační aparatura byla proplachována destilovanou vodou před i po ukončené filtraci. Pokud bylo filtrováno více vzorků za sebou, aparatura byla promývána vždy před filtrací každého následujícího vzorku.

Při jakékoliv manipulaci s filtry během výzkumu bylo nutné dbát na jejich zakrytí kvůli případné vzdušné kontaminaci. Filtry byly uchovávány v původním obalu a bezprostředně po filtraci byly uloženy do příslušné Petriho misky.

3.5 Zpracování a uchování vzorků

Ihned po dokončené filtraci obsahu lahve byla nejprve odpojena hadička vývěvy od aparatury. Celá aparatura byla opatrně rozložena a z filtračního kotouče byl vyňat membránový filtr. S filtry bylo po celou dobu výzkumu manipulováno pouze pomocí jednoduché pinzety, aby nedošlo k poškození filtru nebo částic na něm zachycených. Membránový filtr byl přenesen do čisté Petriho misky nadepsané odpovídajícími parametry vzorku. Na každé Petriho misce bylo vyznačeno: číslo a písmeno vzorku, značka a typ testované vody, typ filtru, porozita filtru a datum filtrace (Obrázek 22).



Obrázek 22: Zpracované vzorky uložené v nadepsaných Petriho miskách (zdroj vlastní)

Takto připravené Petriho misky byly bezprostředně po vložení filtru ponechány na nějakou dobu pootevřené, aby došlo k redukci přebytečné vlhkosti. Poté byly vzorky uchovány v klasickém skleněném exsikátoru pro dosažení nezbytného vysušení vzorku (Obrázek 23). Tento postup byl aplikován u všech testovaných vzorků.



Obrázek 23: Skleněný exsikátor se vzorky (zdroj vlastní)

3.6 Doplnění vzorků

V průběhu již trvajících výzkumu byly k analýze připojeny další 2 značky minerálních vod balených v recyklovaném plastu (tzv. rPET), který vzniká recyklací panenského PET materiálu. rPET se nově stává součástí nápojových lahví za účelem plnění legislativních norem a omezení jednorázového syntetického odpadu. Z důvodu omezeného výběru těchto nově distribuovaných lahví bylo možné do výzkumu zapojit z minerálních vod pouze značky *Kláštorná Kalcia* a *Evian*. Lahev vyrobenou z recyklovaného PET nově nabízí i již dříve testovaná pramenitá voda *Natura*, která byla taktéž do studie zařazena. Analýza byla tedy doplněna celkem o 3 nové balené vody, tzn. 6 nových vzorků (viz Tabulka 3).

Tabulka 3: Přehled vzorků doplněných ke zpracování

Vzorek č. [1,5 l]	ZNAČKA	TYP	MATERIÁL OBALU	DRUH
21a 21b	Kláštorná Kalcia	jemně perlivá	plast - rPET	minerální
22a 22b	Evian	neperlivá	Plast - rPET	minerální
23a 23b	Natura	jemně perlivá	plast - rPET	pramenitá

Dle zákona musí od roku 2025 nápojové PET lahve obsahovat minimálně 25 % rPET (Zákon 243/2022 Sb., ©2022). Všechny tři testované značky aktuálně vyrábí lahve ze 100 % recyklovaného PET materiálu (viz Obrázek 24).



Obrázek 24: Testované vody balené v 100% rPETu – Evian, Kláštorňá Kalcia, Natura (zdroj vlastní)

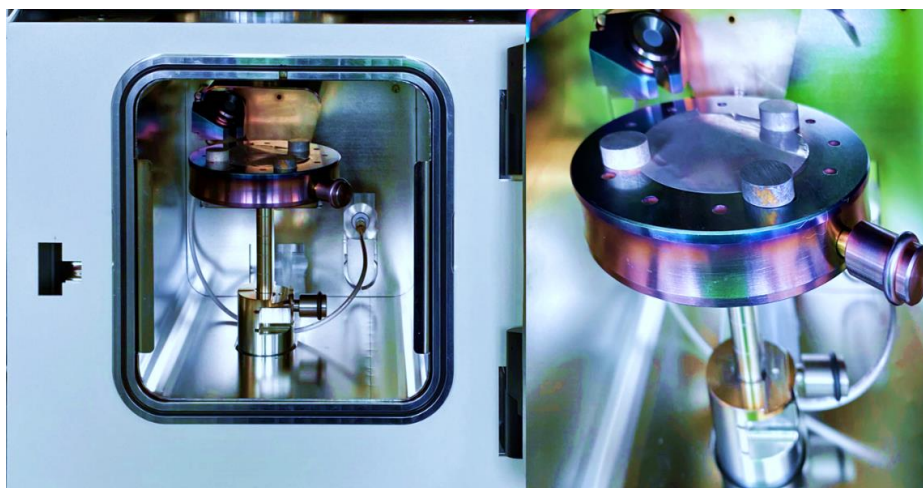
3.7 Iontové naprášení vzorků

Z důvodu špatné vodivosti filtru a plastových částic na něm zachycených byly vzorky pokryty vrstvou kovu pomocí iontové naprašovačky Leica EM ACE 200 (viz Obrázek 25). Naprášení kovem je standardní metoda zpracování vzorku pro následné SEM analýzy. Homogenní vrstva kovu zajišťuje fixaci preparátu, minimalizaci poškození částic a daleko vyšší kvalitu obrazu při pozorování elektronovým mikroskopem.



Obrázek 25: Naprašovačka kovů a argonová tlaková lahev (zdroj vlastní)

Před zahájením jakékoliv práce s naprašovačkou byla vždy nejprve otevřena tlaková lahev s argonem. Naprašovačka byla zapnuta vypínačem na zadní straně přístroje. Vzorek byl vyjmut z Petriho misky umístěné v exsikátoru a filtr byl pomocí pinzety přemístěn na stolek naprašovací komory. Ke stolku byl vzorek filtru připevněn pomocí tří až čtyř kovových těžítek (Obrázek 26).



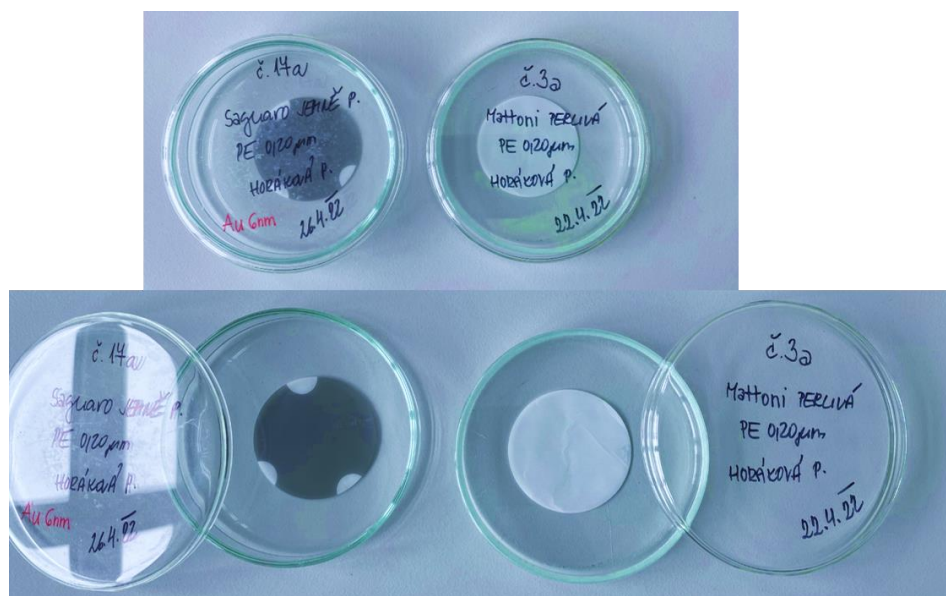
Obrázek 26: Naprašovací komora s pokoveným vzorkem (zdroj vlastní)

Na displeji přístroje byl nastaven konstantní rozprašovací proud (30 mA), způsob naprašování („directional“) pro rovnoměrné nanesení vrstvy, typ použitého vodivého materiálu (zlato nebo platina) a požadovaná tloušťka naneseného filmu (6 nm). Po nastavení požadovaných parametrů (viz Obrázek 27) byl spuštěn naprašovací proces zahrnující odvzdušnění pro vytvoření středního až vysokého vakua v naprašovací komoře a následně samotné pokovení vzorku.



Obrázek 27: Nastavení naprašovačky (zdroj vlastní)

Proces probíhal ve dvou cyklech střídajících vypouštění a vypouštění argonu, a trval zhruba 5 minut. Po jeho ukončení byla komora opět zavzdušněna a teprve poté bylo možné otevřít naprašovací komoru a vyjmout vzorek zpět do Petriho misky. Ačkoliv je pokovení maximálně viditelné, misky s naprášenými filtry byly pro jistotu označeny červenou fixou (Obrázek 28).

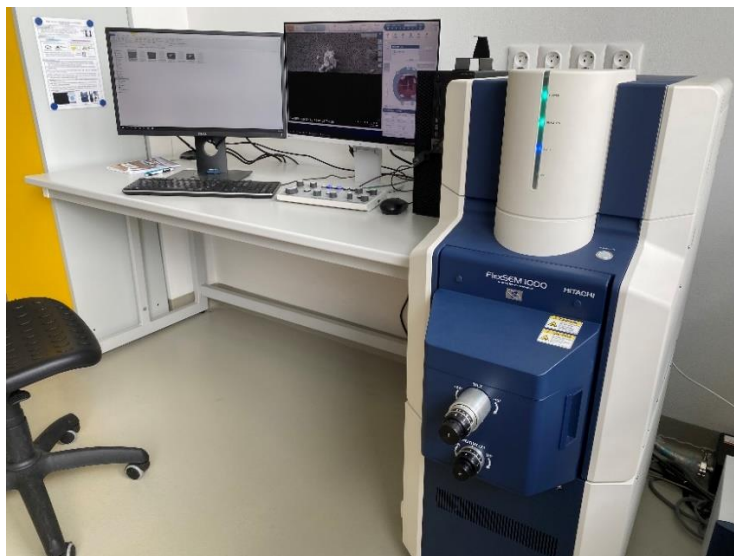


Obrázek 28: Rozdíl mezi pokovenými /vlevo/ a nepokovenými filtry (zdroj vlastní)

Při práci s naprašovačkou kovů byla dodržována přísná opatření pro zachování čistoty vnitřní komory, ale i z důvodu zamezení znečištění vzorku. Přístroj byl ovládán pouze v rukavicích a se vzorky bylo manipulováno pomocí čisté pinzety.

3.8 Pozorování skenovacím elektronovým mikroskopem

Membránový filtr se zachycenými částicemi byl pozorován prostřednictvím rastrovacího (skenovacího) elektronového mikroskopu HITACHI FlexSEM 1000 v laboratoři Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové (Obrázek 29). Po dobu pozorování byly vzorky uchovávány ve skříňovém exsikátoru s absorpčním silikagelem, při teplotě 24 °C a konstantní vlhkosti okolo 30 % (Obrázek 30).



Obrázek 29: Skenovací elektronový mikroskop HITACHI FlexSEM 1000 (zdroj vlastní)



Obrázek 30: Skříňový exsikátor (zdroj vlastní)

Elektronový mikroskop je přístroj velmi citlivý na vzdušnou kontaminaci a jakékoliv otřesy. V laboratoři tedy platila přísná pravidla pro minimalizaci vibrací a dodržování řady hygienických pravidel při manipulaci s komponenty.

Před pozorováním bylo zkontrolováno, zda je membránový filtr dostatečně suchý, aby nedošlo k narušení funkce mikroskopu nebo poškození samotného vzorku.

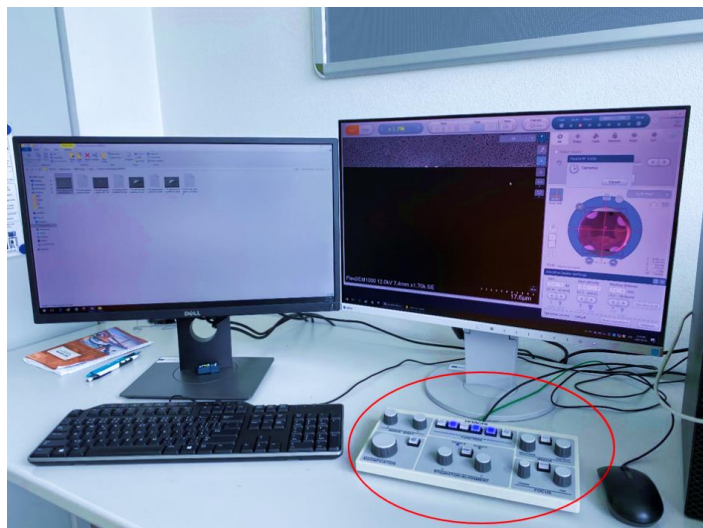
Suchý, naprášený filtr byl vcelku umístěn na držák vzorku a připevněn uhlíkovou páskou tak, aby nezasahovala do nepokovené části filtru (viz Obrázek 31).



Obrázek 31: Připevnění filtru na držák vzorku (zdroj vlastní)

Držák se vzorkem byl nasazen na speciální stolek elektronového mikroskopu a pomocí funkce „Capture“ byl zachycen snímek filtru, který umožnil snadnou orientaci v rámci pozorované oblasti vzorku. Poté byl stolek se vzorkem zasunut do komory elektronového mikroskopu, kde bylo po odčerpání atmosférického vzduchu vytvořeno vakuum a bylo zahájeno pozorování.

Pozorování bylo zprostředkováno pomocí speciálního počítačového softwaru pro SEM analýzu. Zobrazení jednotlivých částí a struktur vzorku bylo sledováno na monitoru propojeném s digitální kamerou, která snímá signál z detektoru mikroskopu. Zásluhou emitovaných signálů zpracovaných SE detektorem (viz 2.5.1.2) bylo možné sledovat trojrozměrnou strukturu částic ze všech úhlů a při různém zvětšení. Výsledná data jsou odesílána do počítače, kde jsou dále zpracována a vyhodnocena. Pomocí mechanického ovládacího panelu (Obrázek 32) nebo tlačítek myši byla v programu regulována vzdálenost, kontrast, jas i ostrost pozorovaného objektu.



Obrázek 32: Mechanický ovládací panel HITACHI (zdroj vlastní)

Každý vzorek byl důkladně prozkoumán na několika místech, v různých částech filtru a při odlišných zvětšeních. V případě zajímavého nálezu byl vytvořen snímek, který byl zálohován a použit jako hotový důkazní materiál (viz Výsledky), popřípadě s ním bylo dle potřeby a podmínek dále nakládáno v rámci analýzy.

3.9 Analýza částic

Zachycené částičky byly na filtru uspořádány nepravidelně, a proto byl zvolen systematický postup jejich hledání. Ze středu filtru byl detektor prostřednictvím počítače směřován ke stranám a následně po celém obvodu. Nalezené částice byly nejprve vyhodnoceny zejména dle morfologie, povrchu, velikosti nebo kontrastu. Výhodou bylo již existující povědomí o typech a vzhledu plastových mikročástic z předchozího výzkumu, čímž bylo určování objektů na filtru značně usnadněno. Pro ověření syntetického původu byly částice dále analyzovány prostřednictvím EDS detektoru. Zásadou EDS analýzy bylo možné potvrdit nebo vyvrátit hypotézy stanovené při pozorování. Součástí výzkumu byla také kvantitativní analýza, která byla uskutečněna u některých vybraných vzorků.

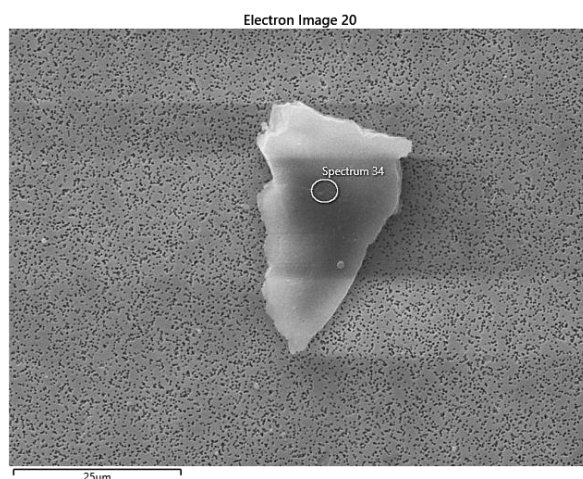
3.9.1 EDS analýza

Pravděpodobný původ částic byl specifikován pomocí EDS detektoru, který dokáže úspěšně vyhodnotit prvková spektra povrchu analyzované oblasti. Obraz získaný

během pozorování elektronovým mikroskopem byl naskenován do softwarové platformy AZtecOne, kde byly části snímku dále identifikovány. Nejprve byl založen a pojmenován nový projekt, kam byla ukládána všechna data z měření EDS detektorem. Před měřením bylo třeba v programu nastavit údaj o materiálu a tloušťce vodivé vrstvy, která byla naprášena na membránové filtry v rámci pokovení (viz 3.7 Naprášení vzorků). Tím bylo minimalizováno zkreslené vyhodnocení prvkových spekter částic, neboť prvek použitého kovu byl z analýzy automaticky vyřazen.

Na snímku byla vyznačena libovolná část pozorované částice (Obrázek 33), která určila oblast analýzy. Po vyznačení detektor automaticky zahájil měření prvkových spekter a byl identifikován typ a množství prvků v měřeném úseku. Dle výsledků EDS analýzy byl posouzen původ nalezených částic.

Výhodou EDS analýzy je rychlost měření (jednotky minut) a bezproblémová integrace do provozu SEM. Detektor je všestranný a snadno ovladatelný. Nevýhodou je nízké energetické rozlišení a nízká citlivost na stopové koncentrace prvků. Může tedy docházet k chybnému vyhodnocení prvkového spektra.



Obrázek 33: EDS analýza nalezených částic (zdroj vlastní: AZtecOne)

3.9.2 Kvantitativní analýza

Původním záměrem kvantitativní analýzy bylo přímo určit počet částic na objem 1,5 litru balené vody, a stanovit tak množství částic potenciálně vnikajících do organismu člověka po vypití jedné lahve. Příliš nízký objem vzorku však zvyšuje chybovost analýzy a snižuje pravděpodobnost detekce částic, a proto byly vybrané vzorky přefiltrovány v objemu 6 l, tedy čtyřnásobku původního množství.

Jeden vzorek zde odpovídal typu vody jedné konkrétní značky, nikoli jedné analyzované lahvi. Pro kvantitativní stanovení částic byly vybrány jemně perlivé vody balené v PET lahvi, a to od každé původně testované značky (Mattoni, Dobrá voda, Saguaro). K nim byly ve větším objemu doplněny i vody nově balené v rPETu, pro zhodnocení kvality vod skladovaných v recyklovaném materiálu, v porovnání s vodami balenými v panenském PET. Celkem bylo kvantifikaci podrobena 6 různých značek balených vod, z nichž polovina je nově stáčená do lahví vyrobených z recyklovaného plastu (viz Tabulka 4).

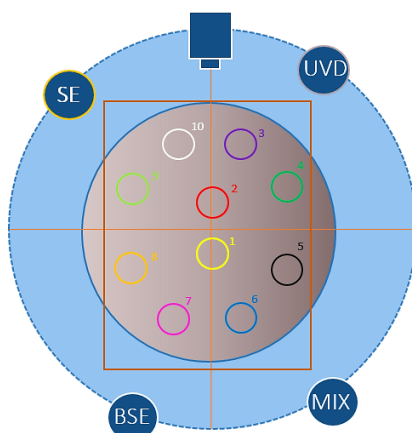
Tabulka 4: Přehled vzorků podrobených kvantitativní analýze

Vzorek č. [6 l]	ZNAČKA	TYP	MATERIÁL OBALU	DRUH
24a 24b	Mattoni	jemně perlivá	Plast - PET	minerální
25a 25b	Dobrá voda	jemně perlivá	Plast - PET	minerální
26a 26b	Saguaro	Jemně perlivá	Plast - PET	pramenitá
27a 27b	Kláštorná Kalcia	jemně perlivá	plast - rPET	minerální
28a 28b	Evian	neperlivá	Plast - rPET	minerální
29a 29b	Natura	jemně perlivá	plast - rPET	pramenitá

Metodický postup přípravy, zpracování a uchování vzorků byl shodný s postupem popsáním v přechozích kapitolách.

Kvantifikace byla provedena v rámci pozorování SEM. Nejprve bylo vybráno ideální konstantní zvětšení (500 krát), při kterém byl záběr pozorované části filtru dostatečně široký. Zároveň byly dobře viditelné i ty nejmenší částice a kvalita obrazu byla zachována. Pomocí softwaru byl vyměřen a propočítán obsah obdélníkové pozorované části, ve které byly částice identifikovány a analyzovány (více viz Výsledky).

Na základě předchozího pozorování bylo zjištěno, že jsou částice na filtru často rozptýleny náhodně, nejvíce objektů je však soustředěno zpravidla do středu filtru. Proto bylo u každého vzorku vybráno 10 náhodných míst v rámci celé plochy filtru: dvě ve středu a zbylých osm podle pravidelného vzorce po stranách filtru (Obrázek 34)



Obrázek 34: Vzorec míst na filtru vybraných pro kvantitativní analýzu (zdroj vlastní)

V každém místě byly spočítány částice morfologicky odpovídající mikroplastům a jejich původ byl ověřen prostřednictvím EDS analýzy. Finální počet syntetických částic byl zaznamenán a ze všech deseti míst byl stanoven průměr odpovídající počtu částic na ploše jednoho pozorovaného místa při zvětšení 500x. Celková plocha filtru byla vydělena plochou jedné pozorované oblasti, čímž bylo zjištěno, kolikrát je třeba vynásobit průměr nalezených částic, aby byl ve výsledku zohledněn kompletně celý obsah filtru.

U každé pozorované oblasti byl vytvořen snímek, který byl dále analyzován v programu *AZtecOne* v rámci EDS analýzy. U všech částic přítomných v dané oblasti byla změřena prvková spektra a počet částic odpovídajících mikroplastům byl zaznamenán do tabulky. Všechny snímky náležící kvantifikaci byly řádně pojmenovány a zálohovány pro pozdější vyhodnocení, stejně tak naměřená data prvkových spekter.

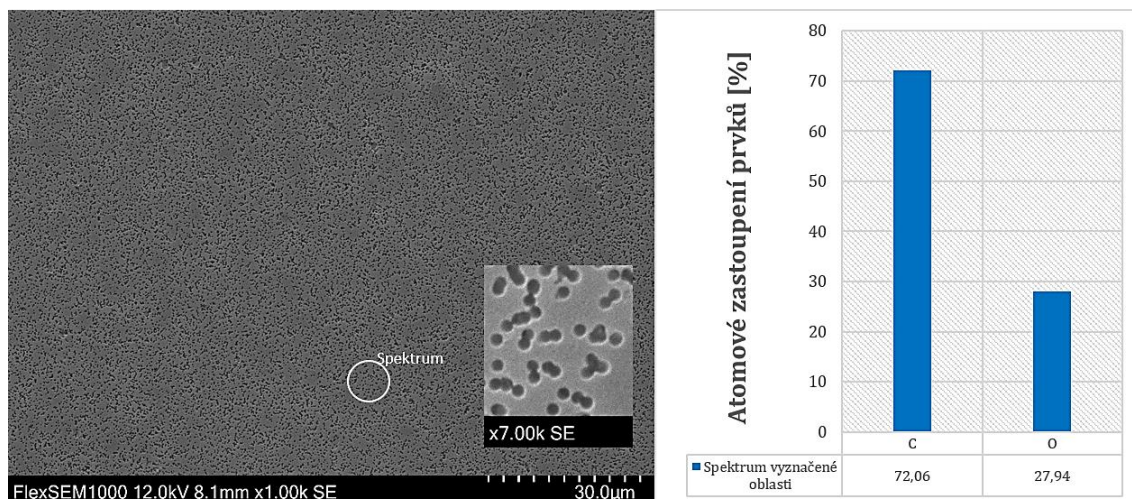
Počet nalezených částic byl přepočítán přímou úměrou na plochu celého filtru, což odpovídá 6 litrům balené vody. Výsledek byl tedy při finálním výpočtu vydělen čtyřmi pro získání množství částic vyskytujících se v jedné plastové lahvi.

4 Výsledky

V této kapitole jsou shrnuty výsledky získané kombinací analytických metod SEM-EDS. Zároveň obsahuje dílčí výpočty a zjištěná fakta týkající se mikroplastové kontaminace balených vod. Výsledky praktické části jsou doloženy snímky, tabulkami a prvkovými spektry v podobě grafů, které byly naměřeny v průběhu analýzy. První část kapitoly je věnována identifikaci a charakteristice částic nalezených v jedné lahvi testovaných vzorků. V druhém kroku byly částice u jednotlivých značek vod kvantifikovány.

4.1 Prázdný vzorek

Pro porovnání s ostatními vzorky byl nejprve pozorován čistý polyesterový membránový filtr s porozitou 0,2 μm (Obrázek 35 – zvětšení 1000x/7000x), který byl použit pro filtraci všech testovaných vod. Zároveň byla naměřena i prvková spektra materiálu, čímž byl kvantifikován poměr prvků obsažených v syntetických hmotách. Tento krok značně usnadnil nejen detekci zachycených částic, ale i ověřování původu „podezřelých“ objektů.

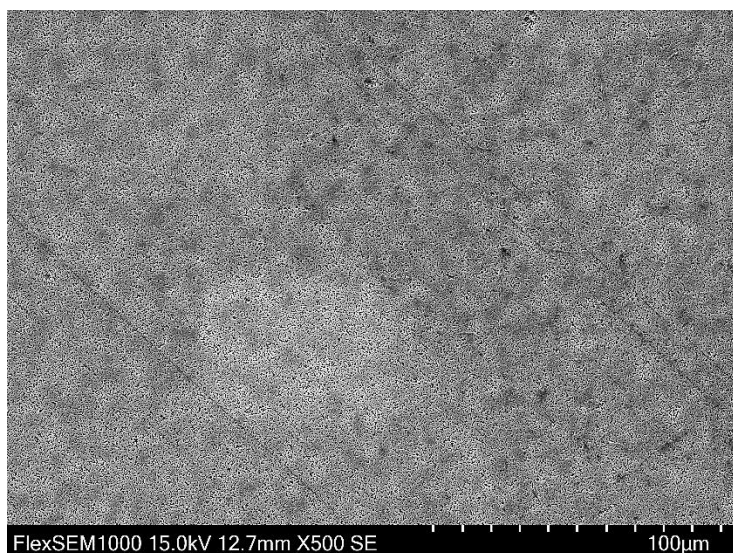


Obrázek 35: Struktura čistého PE membránového filtru + graf (zdroj vlastní)

Polyesterový filtr má hladkou strukturu s téměř pravidelnou porozitou. Atomové zastoupení prvků odpovídá syntetické hmotě. Více než $\frac{2}{3}$ složení zaujímá uhlík (C), zbytek náleží kyslíku (O_2). Atomy vodíku (H) jsou v rámci EDS analýzy zanedbávány.

4.2 Negativní kontrola

S cílem identifikace možné kontaminace vody nebo filtru během zpracování vzorků byla před započítím samotného výzkumu přefiltrována kontrola ve formě destilované vody H₂O o objemu 1,5 l. Na filtru nebyly nalezeny žádné částice, které by naznačovaly hrubé nedostatky v metodickém postupu (Obrázek 36).



Obrázek 36: *Kontrolní vzorek destilované vody (zdroj vlastní)*

S výjimkou několika vad filtru, které mohly vzniknout pravděpodobně i vakuovou filtrací, byl kontrolní vzorek vyhodnocený jako odpovídající předpokladům - prostý mikroplastového nebo i jiného znečištění. Na filtru nebyly nalezeny ani částice oxidu železitého přisuzované korozi potrubí či vodovodního kohoutu, jako tomu bylo v přechozím výzkumu. Vysvětlením může být použití jiné laboratoře v rámci budovy.

4.3 Kvalitativní analýza

U všech testovaných vzorků byl při pozorování a identifikaci částic kladen důraz na velikost ($0,2 \mu\text{m} \geq x \leq 5\text{mm}$), tvar (vlákna, fragmenty, kulovité mikroplasty), povrch (hladký, lehce vrstevnatý), strukturu (pravidelná - primární, nepravidelná - sekundární) a následně i mikrochemickou analýzu prvků (uhlík, kyslík, případně dusík, chlor nebo fluor).

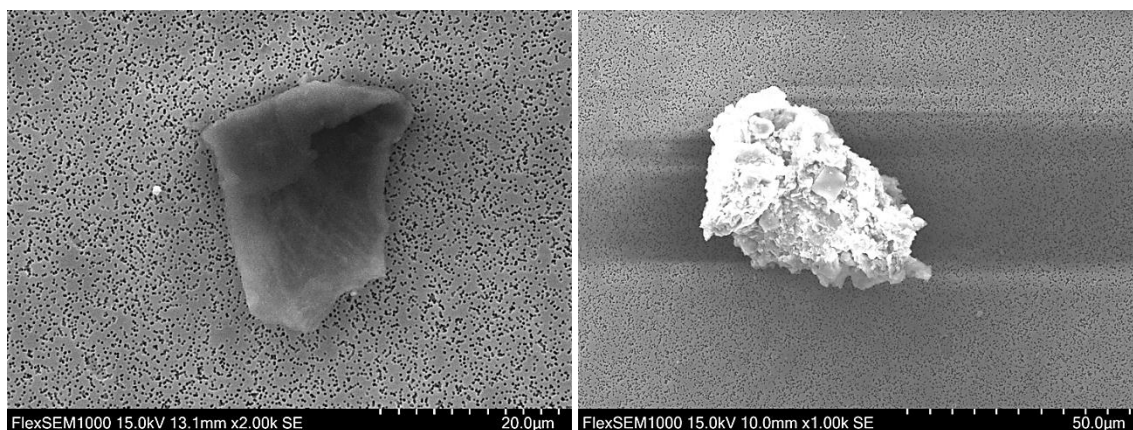
4.3.1 Výskyt mikroplastů

Mikroplasty byly, dle očekávání, prokázány ve všech testovaných vzorcích, včetně kojeneckých vod a vod balených ve skle (Tabulka 5).

Tabulka 5: Přehled nalezených mikroplastů v testovaných balených vodách

	ZNAČKA	TYP	MATERIÁL OBALU	DRUH	TVARY	VELIKOSTNÍ ROZMEZÍ	STRUKTURY
1	Mattoni	neperlivá	plast	minerální	fragmenty, vlákna, kulovité MP	1,5 µm - 240 µm	primární i sekundární
2	Mattoni	jemně perlivá	plast	minerální	fragmenty, kulovité MP	3,5 µm - 120 µm	primární i sekundární
3	Mattoni	perlivá	plast	minerální	fragmenty	9 µm - 30 µm	sekundární
4	Mattoni	ochucená	plast	nealko. nápoj	fragmenty, vlákna, kulovité MP	5 µm - 400 µm	primární i sekundární
5	Mattoni	jemně perlivá	sklo	minerální	fragmenty, vlákna	4 µm - 300 µm	sekundární i primární
6	Dobrá voda	neperlivá	plast	minerální	fragmenty, vlákna, kulovité MP	1 µm - 1,5 mm	primární i sekundární
7	Dobrá voda	jemně perlivá	plast	minerální	fragmenty, vlákna, kulovité MP	5 µm - 600 µm	primární i sekundární
8	Dobrá voda	perlivá	plast	minerální	fragmenty, vlákna, kulovité MP	4 µm - 150 µm	primární i sekundární
9	Dobrá voda	ochucená	plast	nealko. nápoj	fragmenty	8 µm - 40 µm	sekundární
10	Natura	neperlivá	plast	pramenitá	fragmenty, vlákna	10 µm - 1 mm	sekundární i primární
11	Natura	jemně perlivá	plast	pramenitá	fragmenty, vlákna	6 µm - 200 µm	Sekundární i primární
12	Natura	perlivá	plast	pramenitá	fragmenty, vlákna, kulovité MP	3 µm - 50 µm	primární i sekundární
13	Natura	ochucená	plast	nealko. nápoj	fragmenty, vlákna, kulovité MP	5 µm - 600 µm	primární i sekundární
14	Natura	jemně perlivá	sklo	pramenitá	fragmenty, vlákna	10 µm - 200 µm	Sekundární i primární
15	Natura	kojenecká	plast	kojenecká	fragmenty, vlákna, kulovité MP	3 µm - 1,2 mm	primární i sekundární
16	Saguaro	neperlivá	plast	pramenitá	fragmenty, vlákna	1,5 µm - 450 µm	sekundární i primární
17	Saguaro	jemně perlivá	plast	pramenitá	fragmenty, vlákna	3 µm - 220 µm	sekundární i primární
18	Saguaro	perlivá	plast	pramenitá	fragmenty, vlákna, kulovité MP	0,5 µm - 1,8 mm	primární i sekundární
19	Saguaro	ochucená	plast	nealko. nápoj	fragmenty	8 µm - 50 µm	sekundární
20	Saguaro	kojenecká	plast	kojenecká	fragmenty, vlákna, kulovité MP	9 µm - 1 mm	primární i sekundární
21	Kláštorná Kalcia	jemně perlivá	plast - rPET	minerální	fragmenty, vlákna	8 µm - 50 µm	sekundární i primární
22	Evian	neperlivá	Plast - rPET	minerální	fragmenty, vlákna	8 µm - 50 µm	sekundární i primární
23	Natura	jemně perlivá	plast - rPET	pramenitá	fragmenty, vlákna	5 µm - 100 µm	sekundární i primární

Aby částice mohly být označeny jako mikroplasty, byly podrobeny několika dílčím krokům identifikace popsaným výše. Ve vzorcích byly nalezeny mikroplasty rozmanitých tvarů i velikostí (viz dále). Struktura povrchu částic byla mnohdy hladká, v případě fragmentů i vláken byly často znatelné vrstevnaté až „střapaté“ okraje, zřejmě z důvodu odlučování z plastového celku. Pozorovány byly částice pravidelné, ale i naopak. Byl tedy prokázán výskyt primárních i sekundárních mikroplastů, a to téměř ve všech lahvích². Pouze u třech typů vod (různé značky) byly nalezeny výhradně nepravidelné fragmenty vzniklé sekundárně (Tabulka 5). Důležitým faktorem při prvotním rozpoznávání částic byl také kontrast. Ačkoliv ho nelze považovat za určující znak, plasty byly povětšinou tmavší, splývající s filtrem, kdežto vodivé částice obsahující prvky kovů na filtru zářily důsledkem proudících elektronů (Obrázek 37). To ale nebylo pravidlem, a proto záleželo na kombinaci více faktorů.

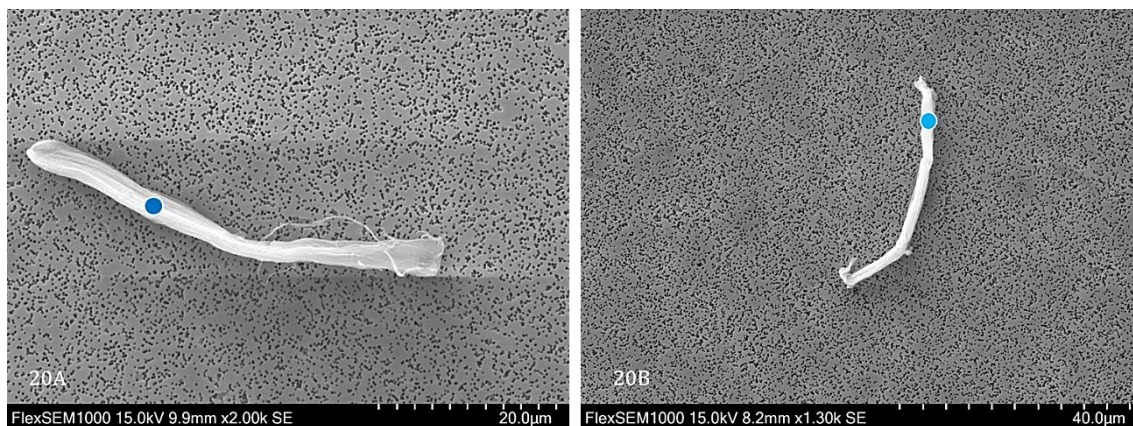


Obrázek 37: Porovnání mikroplastu (vlevo) a vodivé částice dle kontrastu (zdroj vlastní)

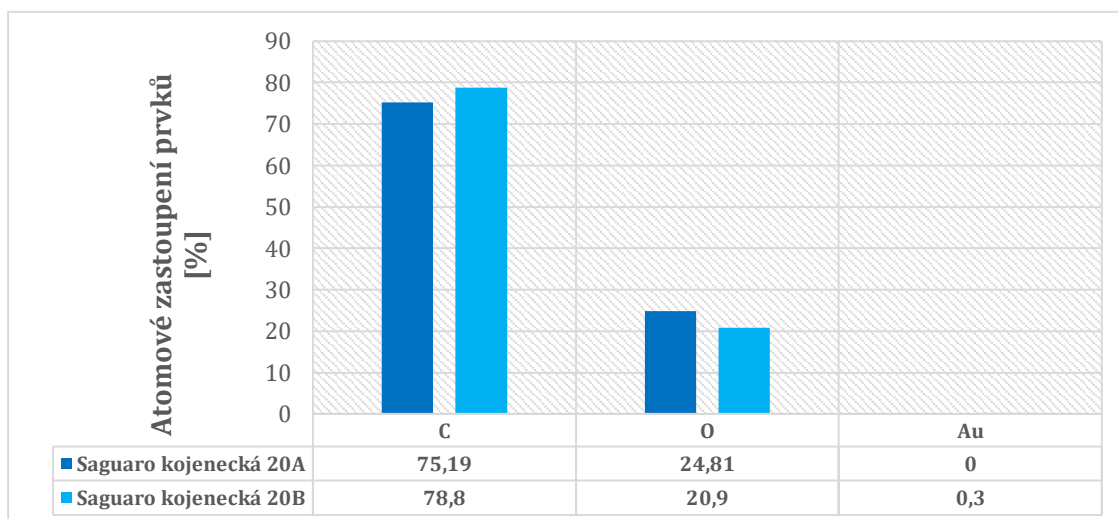
Celkový nález v jednotlivých lahvích byl sice velice individuální, a to i v případě vzorků lišících se pouze šarží, ale charakter nalezených částic byl u dvou shodných typů vod velmi podobný (Obrázek 38). Například v kojeneckých balených vodách značky Saguario, které se lišily pouze označením šarže (vzorek 20a; 20b), byla nalezena morfoloicky téměř shodná vlákna, která i podle EDS analýzy odpovídala

² Charakteristika primárních a sekundárních mikroplastů je více rozvedena v přechodí bakalářské práci (Horáková, 2020)

totožnému původu (viz Graf 3). S největší pravděpodobností se jedná o polyesterová vlákna, neboť atomové zastoupení prvků obou částic se shoduje s kvantitativní prvkovou analýzou polyesterového filtru. Stopové množství zlata (Au) ve vzorku 20b je přisuzováno předchozímu pokovení vzorku (viz Kap. 3.7).

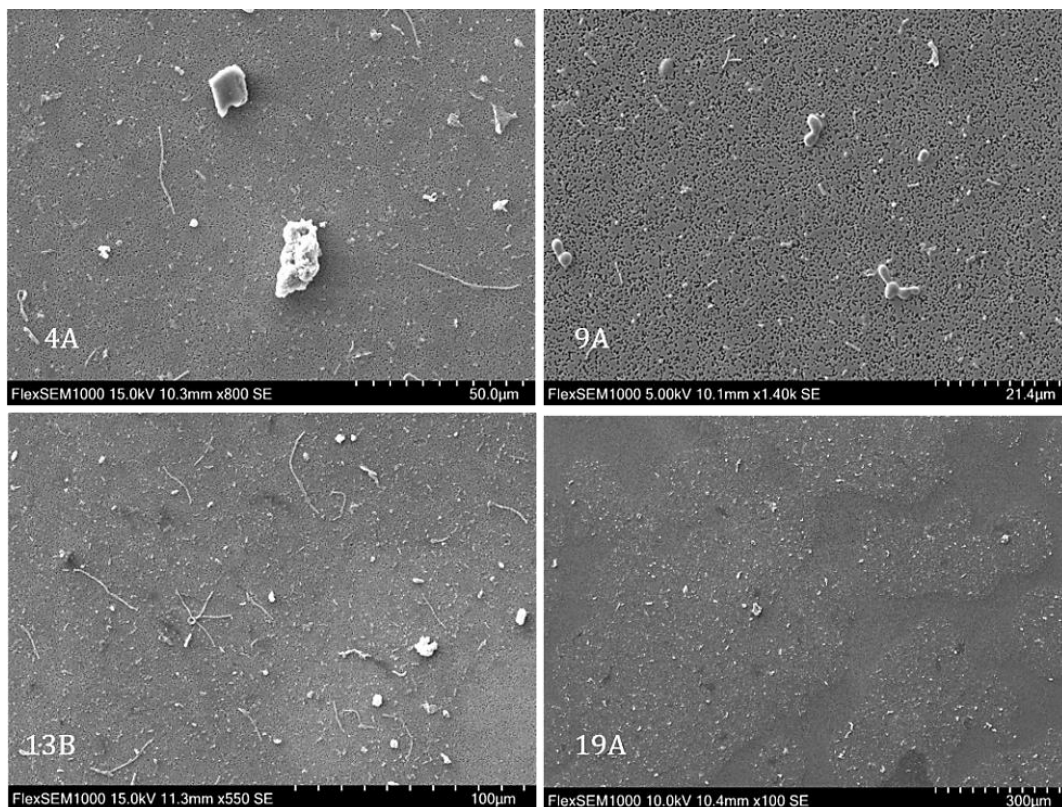


Obrázek 38: Vlákna nalezená v kojenecké vodě značky Saguario (zdroj vlastní)



Graf 3: EDS analýza vláken ve vzorku 20a a 20b (zdroj vlastní)

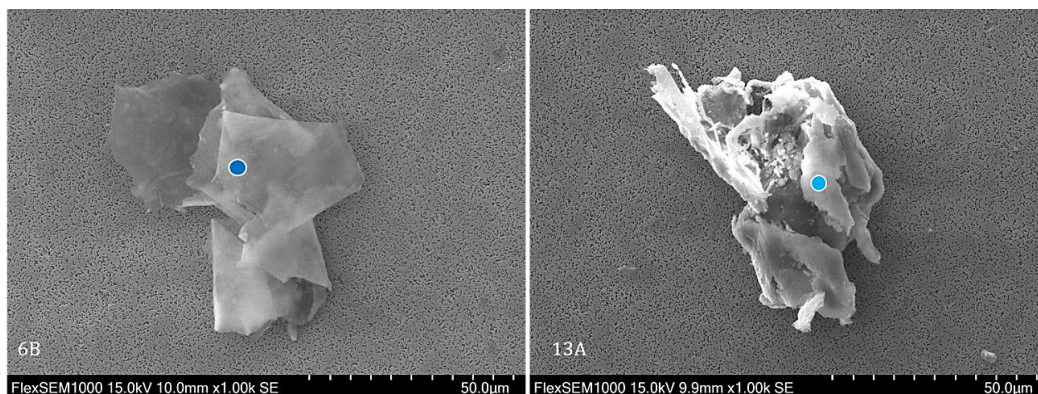
Určitá podobnost v nálezu byla zaznamenána také při vyhodnocení ochucených typů vod. Detekce částic zde byla značně znesnadněna spoustou struktur tvořících povlak na filtrační membráně (Obrázek 39). Nános tvořily zjevně cukry, aroma, kyseliny a minerály přidávané do slazených ochucených nápojů. Analýza částic v ochucených vzorcích byla tedy v porovnání s ostatními mírně upozaděna z důvodu případné chybovosti.



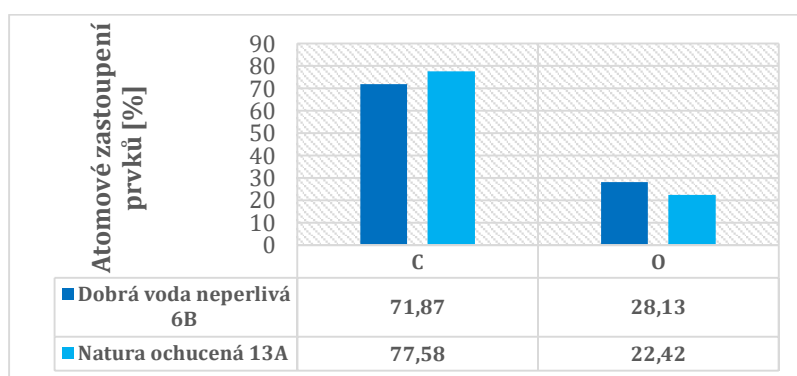
Obrázek 39: Vyhodnocení ochucených nápojů – 4a, 9a, 13b, 19a (zdroj vlastní)

4.3.2 Morfologie částic

Částice byly dle nalezených tvarů rozděleny do tří skupin: fragmenty, vlákna a kulovité plasty. Nejvíce zastoupenými tvary mikroplastů v balených vodách jsou fragmenty, které se vyskytovaly ve všech testovaných vzorcích. Téměř v 85 % lahví byla nalezena i vlákna různé délky, tloušťky, struktury i známek poškození. Pravidelné kuličky byly detekovány v 50 % vzorků, což je velký nárůst kontaminace ve srovnání s předchozím výzkumem, kdy byl nalezen pouze jeden kulovitý mikroplast napříč všemi testovanými vzorky. Zásadou možností SEM, jako je mimo jiné pozorování 3D struktury, byla sledována i případná tloušťka či uspořádání nalezené částice. Z obrazu bylo zřejmé, že v některých případech se jedná o tenkou fólii – vzorek Dobré vody neperlivé 6B (Obrázek 40 vlevo), a jindy byla patrná značná šíře mikroplastu – vzorek Nature ochucené 13A (Obrázek 40 vpravo). Prvková spektra těchto částic jsou znázorněna v grafu č. 4.



Obrázek 40: Porovnání 3D struktur mikroplastů ve vzorcích 6b a 13a (zdroj vlastní)

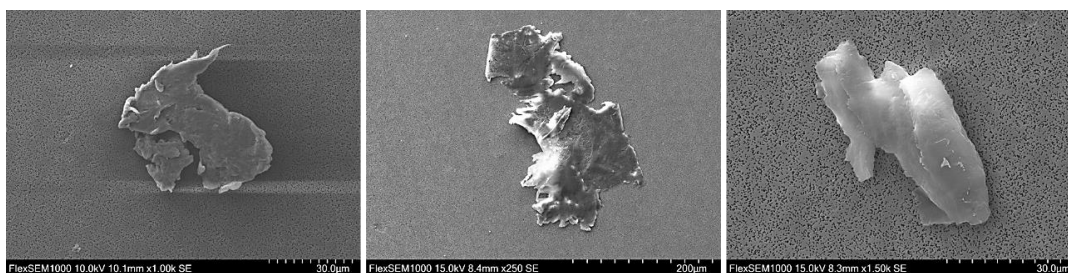


Graf 4: EDS analýza mikroplastů ve vzorcích 6b a 13a (zdroj vlastní)

Pro potvrzení syntetického původu byl důležitý zejména vysoký obsah uhlíku (C). Často se objevoval i kyslík (O), a přítomnost ostatních prvků většinou znamenala interferenci s okolními strukturami, nebo se nejednalo o mikroplast.

Fragmenty

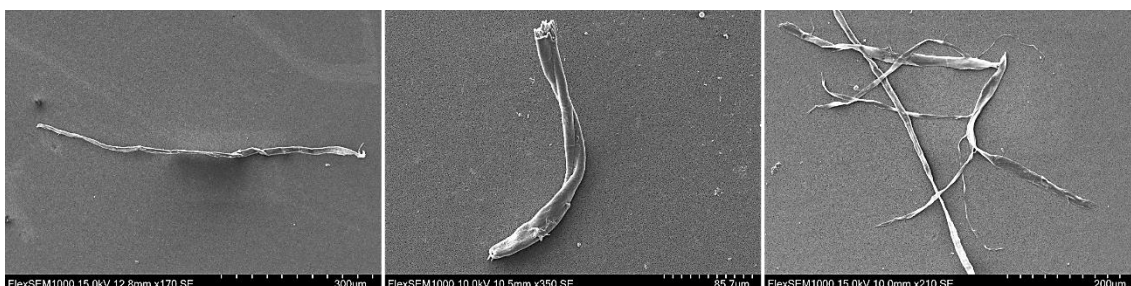
V balených vodách byly nalezeny fragmenty nejrůznějších tvarů i velikostí (Obrázek 41). Jejich tvar byl zpravidla nepravidelný, neboť vznikají odlučováním z plastového zdroje a patří tak mezi mikroplasty sekundární.



Obrázek 41: Příklady nalezených fragmentů (zdroj vlastní)

Vlákna

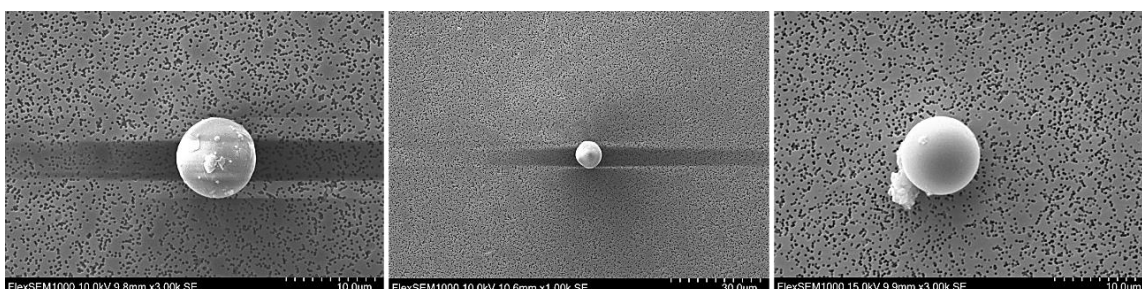
Vláknité mikroplasty se objevovaly taktéž velmi hojně a v různých formách (Obrázek 42). Ve vzorcích se vyskytovala vlákna dlouhá a hladká, ale i širší strukturovaná. Jejich zakřivení na filtru bylo taktéž rozmanité a vzhled případných známek poškození určoval primární nebo sekundární strukturu mikroplastu. Vlákna měla různou délku, ale nebylo nalezeno žádné, které by přesahovalo hodnotu 5 mm a nebylo by tím pádem zařazeno mezi mikroplasty.



Obrázek 42: Příklady nalezených vláken (zdroj vlastní)

Kulovité mikroplasty

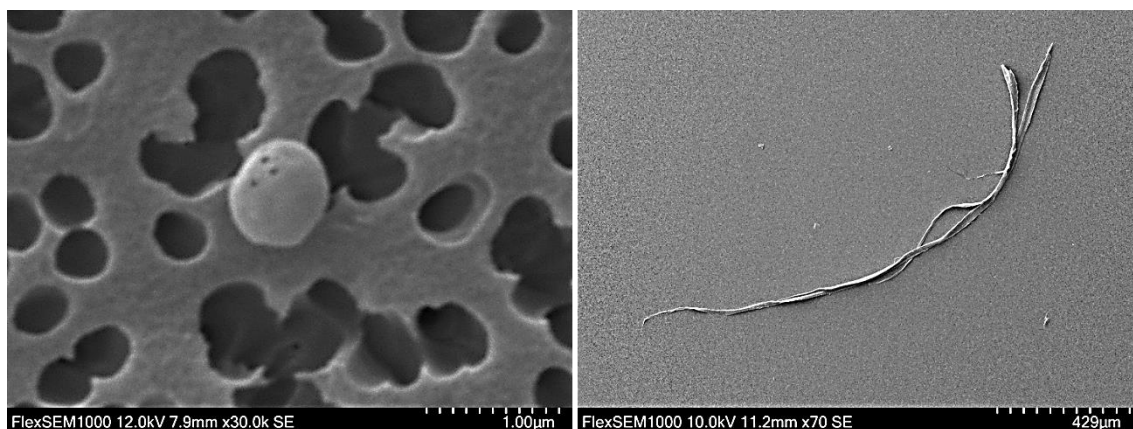
Oproti předchozí bakalářské práci bylo nalezeno i velké množství kulovitých mikroplastů (Obrázek 43). Jedná se o pravidelné částice zejména menších velikostí, které jsou svým tvarem dobře rozpoznatelné. Mohou být ale snadno zaměněny za zrnka oxidu křemičitého, a proto zde byla důležitým rozpoznávacím krokem následná EDS analýza.



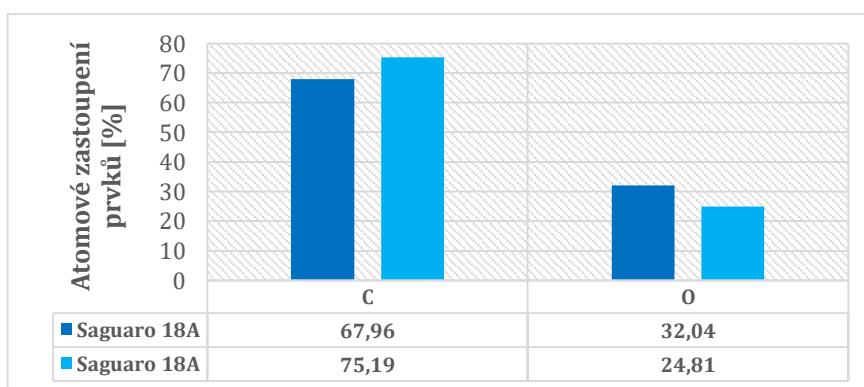
Obrázek 43: Příklady kulovitých mikroplastů (zdroj vlastní)

4.3.3 Velikost částic

Spodní velikostní hranice pro určení mikroplastů nebyla doposud přesně stanovena. Proto bylo cílem zachytit co nejvíce částic o různých velikostech. V závislosti na porositě použitého membránového filtru bylo možné zachytit částice větší než 0,2 μm . Nejmenší pozorovaný mikroplast v rámci všech testovaných vod byl kulovitěho pravidelného tvaru a velikosti 0,5 μm , nalezený v perlivé vodě Saguaro 18a (Obrázek 44 vlevo). U takto malých částic ale může docházet k chybám při vyhodnocení prvkového spektra, a proto musí být při analýze částice co nejvíce přiblížena (Graf 5). Ve stejném vzorku byl nalezen i největší, respektive nejdelší vláknitý mikroplast o délce téměř 1,8 mm (Obrázek 43 vpravo).



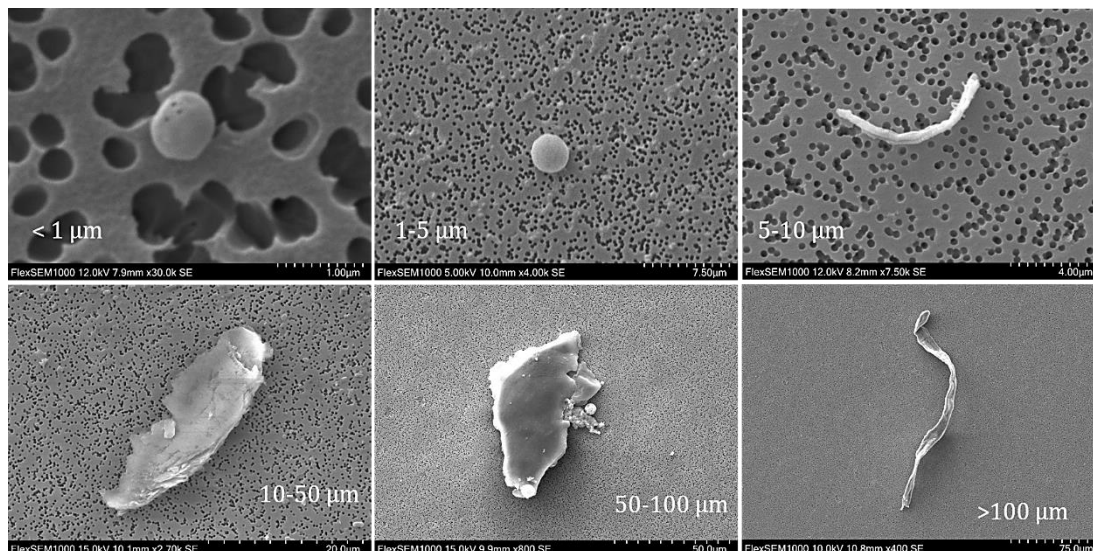
Obrázek 44: Srovnání nejmenšího a největšího nalezeného mikroplastu (zdroj vlastní)



Graf 5: EDS analýza mikroplastů ve vzorku 18a (zdroj vlastní)

Nalezené mikroplasty byly rozděleny do několika velikostních kategorií: < 1 μm , 1 - 5 μm , 5 - 10 μm , 10 - 50 μm , 50 - 100 μm a > 100 μm . Velikost byla stanovena dle měřítka, v případě pochybností určena pomocí softwaru.

Nejvíce částic spadalo do kategorií 10 - 50 μm . Mikroplast menší než 1 μm byl nalezen pouze jeden v rámci celého výzkumu (Obrázek 45). Do kategorie > 100 μm patří dlouhá vlákna či rozsáhlejší fragmenty. V rozsahu velikostí 1 - 5 μm se pohybovaly nejčastěji naopak kulovité mikroplasty.

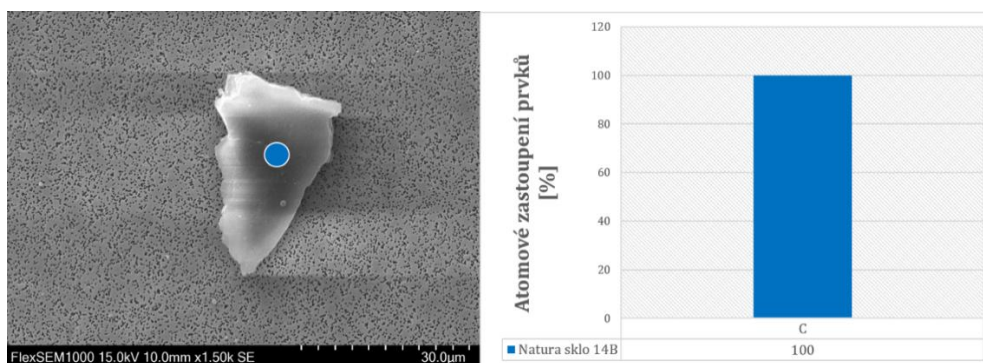


Obrázek 45: Velikostní kategorie mikroplastů (zdroj vlastní)

4.3.4 Původ částic

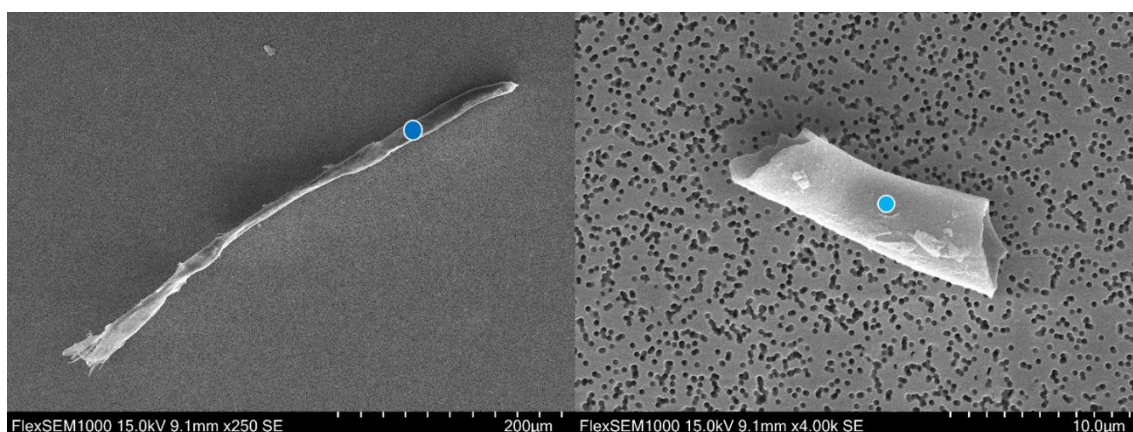
Plastový původ byl ověřován prostřednictvím EDS analýzy. Ačkoliv vyhodnocení nebylo stoprocentní, EDS detektor spolehlivě změřil zastoupení a množství prvků přítomných na povrchu testované oblasti.

U mikroplastů byl ve většině zastoupen uhlík. Částice vykazující pouze přítomnost uhlíku (Obrázek 46) mají pravděpodobně **polyetylenový (PE)** nebo **polypropylenový (PP)** původ.

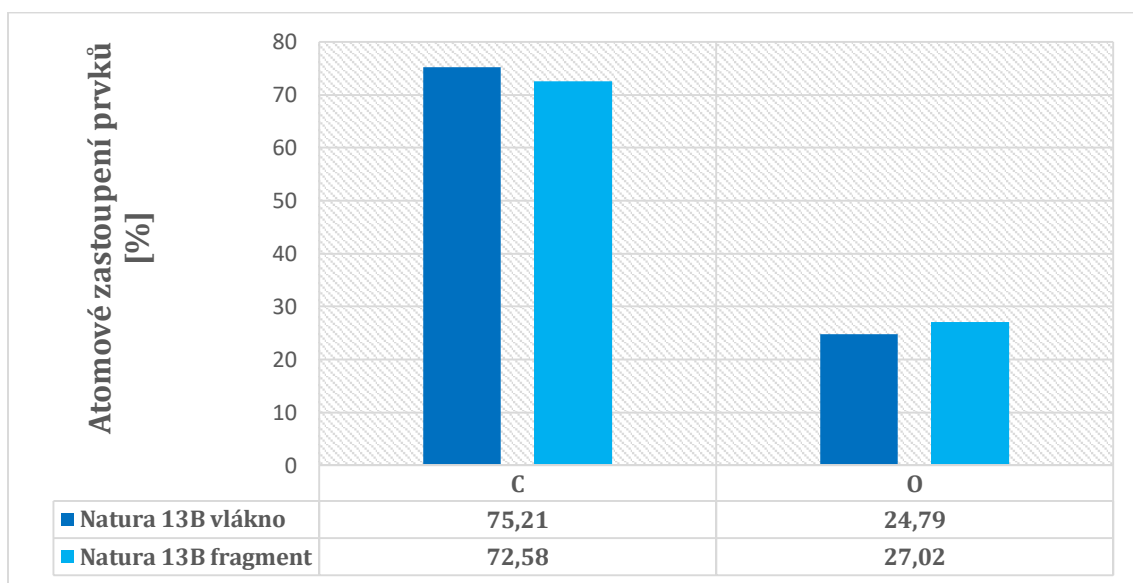


Obrázek 46: EDS analýza mikroplastu ve vzorku Natury balené ve skle 14b + graf (zdroj vlastní)

Naprostá většina částic identifikovaných jako mikroplasty obsahovala kromě uhlíku také kyslík, jehož atomové zastoupení odpovídalo zhruba $\frac{1}{3}$ z celku. V případě vláknitých mikroplastů se pravděpodobně jednalo o **polyesterová vlákna (PES)** využívaná nejčastěji v textilním průmyslu (Obrázek 45 vlevo). Měl-li mikroplast jiný tvar (Obrázek 47 vpravo), obsaženým polymerem byl nejznámější z polyesterových termoplastů – **polyethyltereftalát (PET)**. Atomové zastoupení konkrétních částic je naznačeno v grafu č. 6.

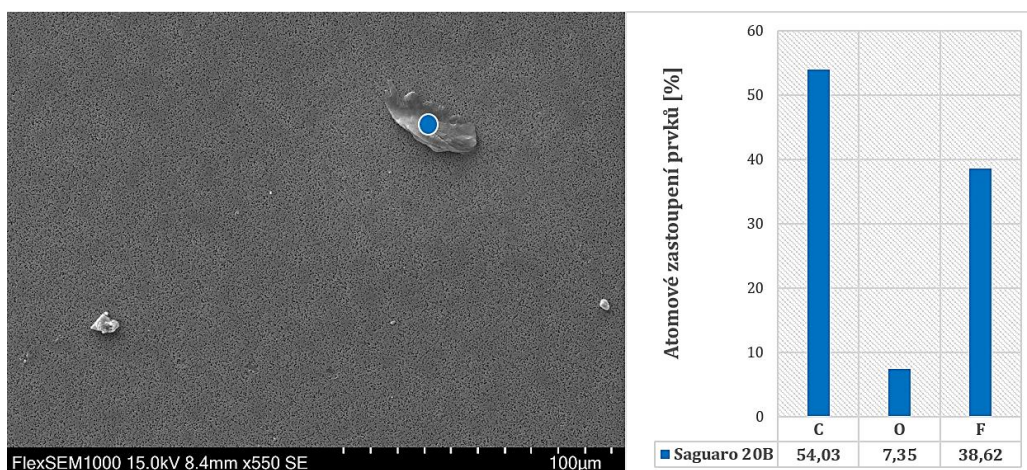


Obrázek 47: EDS analýza mikroplastů ve vzorku Nature ochucené 13b (zdroj vlastní)



Graf 6: EDS analýza mikroplastů ve vzorku Nature ochucené 13b (zdroj vlastní)

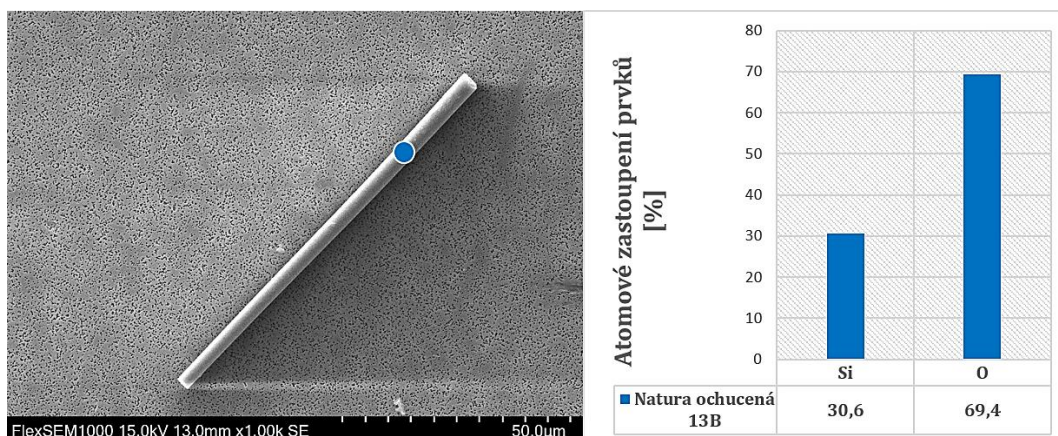
Ve vzorku kojenecké vody značky Saguaro 20b byla nalezena částice obsahující kromě uhlíku a kyslíku také fluor (Obrázek 48). Morfologicky i rozměrově odpovídala plastům, a byla tedy vyhodnocena jako **polytetrafluoretylen (PTFE)**, veřejně známý také pod obchodním názvem teflon. Není ale vyloučeno, že se tento fragment mohl uvolnit z teflonového držáku filtrační aparatury.



Obrázek 48: EDS analýza mikroplastu ve vzorku Saguara 20b + graf (zdroj vlastní)

Ve vzorcích se vyskytovaly i rušivé elementy ve formě minerálů nebo jiných struktur, které byly mikroplastům morfologicky blízké, ale EDS analýza vyloučila jejich syntetický původ. Mezi takové struktury patřily například částice uhličitanu vápenatého běžně přítomného v tvrdé vodě, nerosty (formy živce), sklo a další.

Na obrázku č. 49 jsou vyobrazeny výsledky EDS analýzy skleněného vlákna velmi podobného polyesterovým textiliím.



Obrázek 49: EDS analýza skleněného vlákna ve vzorku Naturny 13b + graf (zdroj vlastní)

4.4 Kvantitativní stanovení

Cílem kvantitativní analýzy bylo stanovit koncentraci mikroplastů na objem 1,5 l balené vody, který vniká do těla konzumací jedné lahve, a porovnat výsledky testovaných vzorků mezi sebou. Zároveň byla prostřednictvím kvantifikace zhodnocena kvalita vody balené v PET v porovnání s recyklovaným PET.

4.4.1 Stanovení potřebných veličin

Obsah filtru byl vypočten pomocí standardního vzorce pro výpočet obsahu kruhu.

$$S = \pi r^2$$

$$\dots \text{kde } r = \text{poloměr kružnice}$$
$$\pi = 3,141592653589$$

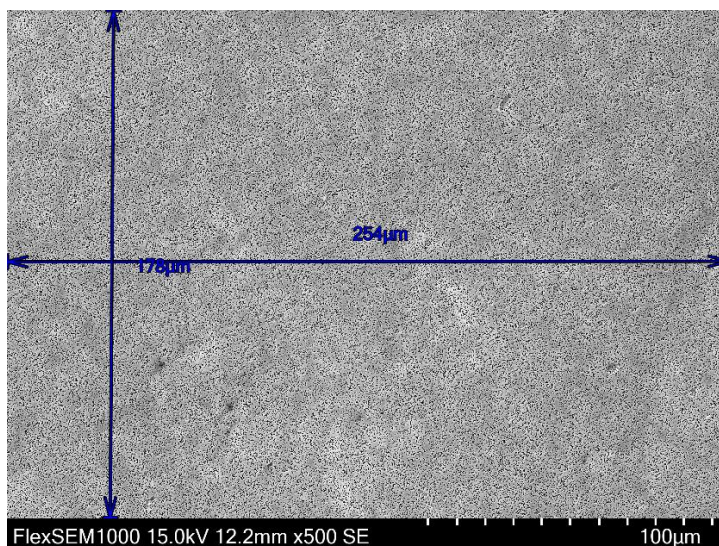
Průměr membránového filtru je 47 mm, poloměr byl tedy stanoven na 23,5 mm.

$$S1 = \pi * (23,5)^2 \text{ mm}^2$$

$$S1 = 1734,944543 \text{ mm}^2$$

$$\underline{S1 = 1\,734\,944\,543 \mu\text{m}^2}$$

Obsah zorného pole (zvětšení 500x) byl vyměřen pomocí softwaru neprodleně po aplikaci zvětšení a zaostření obrazu (Obrázek 50).



Obrázek 50: Výměra zorného pole (zdroj vlastní)

$$a = 178 \mu\text{m}$$

$$b = 254 \mu\text{m}$$

$$\underline{S2 = 45\,212 \mu\text{m}^2}$$

Z důvodu obtížné detekce částic v malých objemech balené vody byl jejich počet stanoven nejprve v 6 litrech kapaliny.

U každého vzorku byl vypočten průměrný počet částic (\emptyset), odpovídající jednomu zornému poli (Obrázek 49), který byl stanoven ze všech nalezených částic v deseti náhodných místech na filtru (viz Kapitola 3.9.2). Číselnou hodnotou průměru každého vzorku byl vynásoben podíl obou stanovených obsahů, čímž došlo k přepočtu množství na celý filtr, tedy 6 l vody daného typu.

$$x = \frac{S1}{S2} * \emptyset \text{ počet částic}$$
$$x = 38\,373,54 * \emptyset \text{ počet částic}$$

Mezivýpočet nám říká, kolikrát se jedno pozorované místo (zorné pole) vejde do kruhu o průměru 47 mm.

Pro finální určení množství částic kontaminujících jednu lahev byl výsledek vydělen čtyřmi.

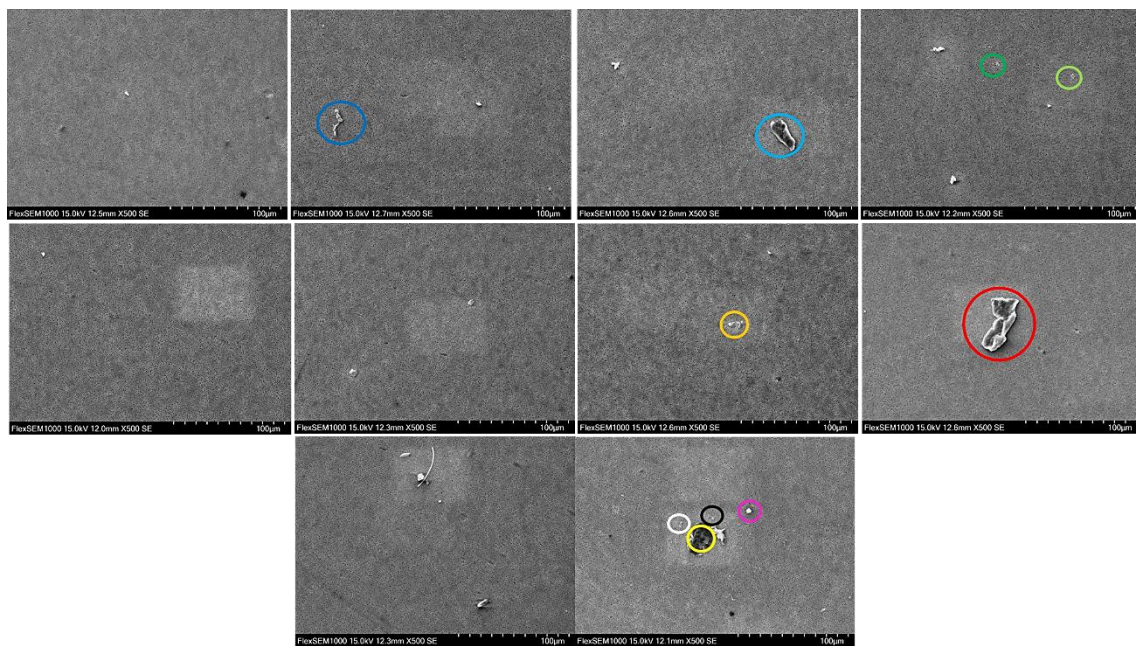
$$x = \frac{38\,373,54 * \emptyset \text{ počet částic}}{4}$$

Pro porovnání s ostatními studii byla stanovena koncentrace částic na litr balené vody a výsledek byl tedy vydělen šesti.

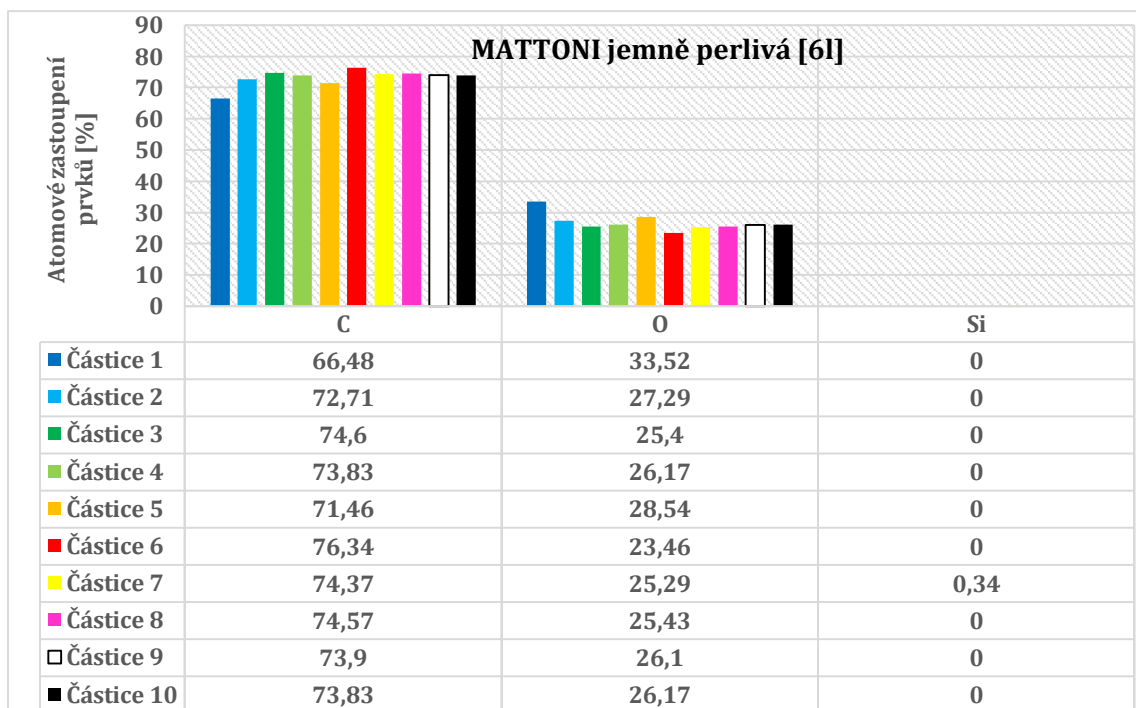
$$x = \frac{38\,373,54 * \emptyset \text{ počet částic}}{6}$$

4.4.2 Vyhodnocení

Všechny částice vyskytující se v zorném poli SEM byly nejprve vyhodnoceny dle morfologie a změřeny pomocí EDS detektoru (Obrázek 51). Počet částic odpovídající mikroplastům byl zaznamenán do tabulky (Tabulka 6).



Obrázek 51: Mikroplasty nalezené v rámci 10 náhodných míst - Mattoni jemně perlivá (zdroj vlastní)



Graf 7: EDS analýza nalezených částic - kvantitativní analýza (zdroj vlastní)

Prvková spektra detekovaných mikroplastů jsou znázorněna v grafu č. 7.

V tabulce č. 6 jsou zaznamenány všechny dílčí výpočty kvantitativní analýzy včetně konečných výsledků. Balené vody vybrané pro kvantifikaci byly jemně sycené, s výjimkou Evian, která není v perlivých formách v PET lahvích na českém trhu dostupná. Vody distribuované v rPET obalu jsou označeny bílou barvou.

Tabulka 6: Výsledky kvantitativní analýzy (zdroj vlastní)

↓ zorné pole č. / [6l]	KLÁŠTORNÁ KALCIA	EVIAN	MATTONI	SAGUARO	NATURA	DOBŘÁ VODA
1	1	4	0	3	1	2
2	0	2	1	3	0	3
3	2	1	1	3	2	1
4	1	2	2	2	0	0
5	0	0	0	3	2	2
6	0	0	0	4	1	0
7	2	2	1	1	1	1
8	0	0	1	3	1	3
9	1	1	0	1	0	2
10	2	1	4	4	0	1
SOUČET ČÁSTIC	9	13	10	27	8	15
PRŮMĚRNÝ POČET na zorné pole	0,9	1,3	1	2,7	0,8	1,5
celkový počet	<i>34536,186</i>	<i>49885,602</i>	<i>38373,54</i>	<i>103608,558</i>	<i>30698,832</i>	<i>57560,31</i>
celkový počet /1,5l	8634	12471	9593	25902	7675	14390
koncentrace /litr	5756	8314	6396	17268	5116	9593

Mikroplasty byly nalezeny ve všech analyzovaných vzorcích, avšak ne v každém testovaném zorném poli. I přesto byly počty částic, v porovnání se zanedbatelnou částí plochy oproti celku, poměrně vysoké. V zorném poli o délce hrany jen několik stovek mikrometrů se vyskytovaly až 4 mikroplasty současně.

Největší množství drobných fragmentů bylo nalezeno v balené vodě značky Saguaro, což odpovídá i výsledkům bakalářské práce. Koncentrace částic v Saguaru byla oproti ostatním vodám (s výjimkou Dobré vody) více než dvojnásobná. Vysoký podíl mikroplastů byl zjištěn také v Dobré vodě. Nejlepší výsledky ve smyslu nejnižší mikroplastové kontaminace prokázala pramenitá balená voda Natura z adršpašsko-teplického zdroje, čímž byly opět potvrzeny závěry předchozího výzkumu. Dle zjištěných výsledků zaznamenaných v tabulce se kvalita vod balených v recyklovaném plastu nijak zásadně neliší od klasických PET lahví.

Koncentrace částic na litr vody se pohybovala mezi hodnotami 5756 a 17 268 mikroplastů. Průměrná hodnota získaná napříč všemi testovanými vzorky odpovídá hodnotě **8741 částic na litr** balené vody.

Dle několika dalších autorů (Schymanski et al., 2018, Pivokonsky, 2018, Su et al., 2016) je při identifikaci prostřednictvím SEM třeba od konečného výsledku odečíst 8 – 83 % částic (více viz Diskuze) pro přesnější výsledky. Opravdová hodnota průměrné koncentrace by se tedy po osvojení této metodiky mohla pohybovat mezi 1486 až 8042 ± 699 částicemi na litr. Při zohlednění každého testovaného vzorku zvláště by byla nejnižší vyhodnocená koncentrace částic na litr **870** mikroplastů (Natura jemně perlivá) a nejvyšší stanovené množství by dosahovalo hodnoty **2936 částic/litr** (Saguaro jemně perlivá).

5 Diskuse

Mikroplastové znečištění bylo potvrzeno u všech vzorků zakomponovaných do analýzy. Nález byl celkově velmi variabilní a individuální. V průběhu magisterského studia došlo k postupnému zdokonalování metodiky a redukci nedostatků shledaných v předchozím výzkumu (Horáková, 2020). Metodický postup a zjištěné výsledky jsou v této kapitole okomentovány, porovnány s ostatními studii a zhodnoceny jako celek. V závěru je shrnut přínos výzkumu.

5.1 Použitá metodika

Stěžejním krokem pro úspěšnou detekci mikroplastů ve vodách bylo zajištění kvalitní filtrace. V průběhu zpracování vzorků byla dodržována doporučená hygienická opatření, která ve své publikaci uvádí i Schymanski a kolektiv (2021). V porovnání s předchozí studií byla zdokonalena příprava vzorků, např. oplachování vod i rukou destilovanou vodou nebo minimalizace používání jednorázových rukavic a kosmetiky při práci se vzorky. Koelmans a kolektiv (2019) taktéž poukazují na to, že prevence kontaminace je jedním z klíčových faktorů pro zlepšení kvality studie.

Filtry

V předchozím výzkumu byly pro zpracování vzorků použity filtrační papíry ze skelných mikrovláken (Horáková, 2020). Z důvodu obtížné detekce a identifikace částic v průběhu SEM analýzy byly tentokrát zvoleny polyesterové membrány s hladkou strukturou. Dle ostatních publikací (Pivokonsky et al., 2018; Schymanski et al., 2018) byly jako nejvhodnější označeny polytetrafluoretylenové (PTFE) membránové filtry. Po několika neúspěšných pokusech s teflonovými filtry bylo od jejich použití upuštěno a byly nahrazeny podobnými polyesterovými filtry, které umožnily rychlou a bezproblémovou analýzu. Jedinou nevýhodou byla potenciální kontaminace vzorku či zkreslení prvkových spekter v rámci EDS analýzy. Během zpracování však nebyla zaznamenána nikterak výrazná poškození filtru, která by značila znehodnocení vzorku. Jedním z odstraněných nedostatků předešlého výzkumu byla také aplikace dvojnásobné filtrace.

Iontové naprašování

Metodika byla zdokonalena také naprašováním vzorků vodivou vrstvou kovu. Před pozorováním byl každý vzorek naprašen vrstvou platiny nebo zlata, stejně jako uvádí Pivokonsky et al. (2018). Zásadou vodivé vrstvy byla v porovnání s bakalářskou prací značně vylepšena kvalita obrazu a vzhled pořízených snímků.

Kvantitativní analýza

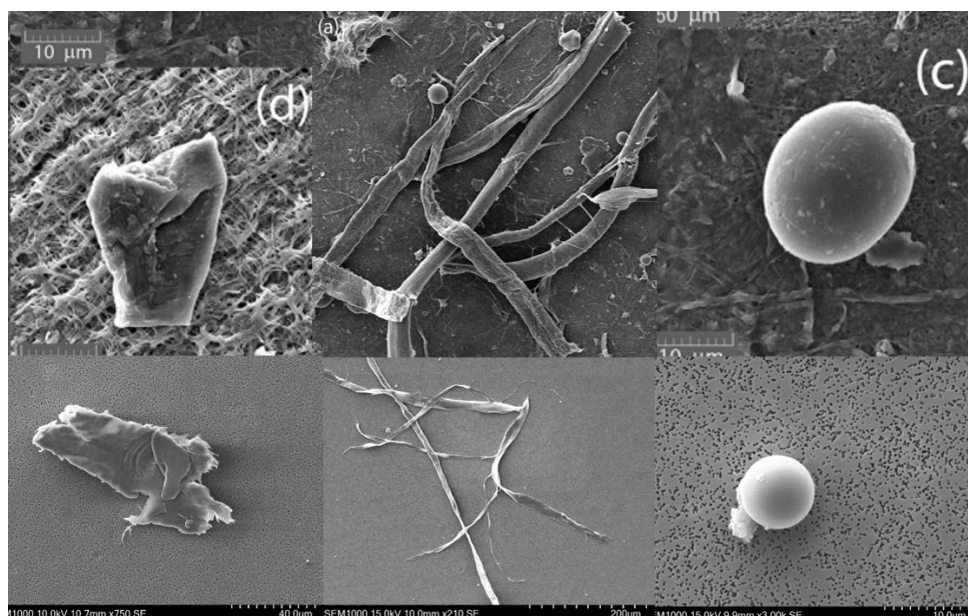
Jedním z hlavních záměrů diplomové práce bylo rozšířit výzkum o kvantifikaci mikroplastů ve vzorcích. Důležitým faktorem pro zajištění kvality studie je dle Koelmans et al., (2019) správně zvolený objem vzorku. Ačkoliv vždy závisí na charakteru konkrétní studie a typu detekovaných mikroplastů, příliš malý objem obecně snižuje pravděpodobnost detekce a zvyšuje chybovost v interpretaci výsledků. Proto byl původní testovaný objem čtyřikrát navýšen na finální kvantifikační objem 6 l. Pozorování a analýza byly zprostředkovány pomocí SEM v kombinaci s EDS analýzou, stejně jako ve výzkumu Pivokonského a kol. (2018).

Určování počtu částic může být provedeno několika způsoby. Výřezem filtru (dílcí vzorkování), výpočtem dle pravidelného vzorce nebo náhodnou identifikací. Schymanski et al. (2020) hodnotí náhodné vzorkování jako ideální způsob zpracování. Uvádí, že každé dílcí vzorkování způsobuje chyby ve výsledcích. Nejspolehlivější metodou je tedy analýza celého filtru, dovolují-li to podmínky. Analýza částic byla provedena kombinací náhodné identifikace a vzorové kvantifikace. Tím byla zachována oboustranná kvalita analýzy.

5.2 Hodnocení výsledků

Prvním krokem k získání efektivních výsledků bylo systematické rozvržení jednotlivých vzorků. Testování náhodných lahví bylo nahrazeno analýzou předem stanovených sad vzorků o shodných počtech, s cílem objektivního porovnání a vyhodnocení kvality vybraných značek. Záměrem byl také plánovaný výběr vod, u kterých již mikroplastová kontaminace byla potvrzena. V rámci současné studie tak byly ověřeny již publikované výsledky.

Mikroplasty byly tentokrát nalezeny ve všech testovaných vzorcích, stejně jako v jiných studiích (Praveena et al., 2022; Oßmann et al., 2018). Byly detekovány mikroplasty nejrůznějších tvarů a velikostí: fragmenty, vlákna i pravidelné kuličky, jak uvádí i Pivokonský et al., (2018) – Obrázek č. 52.



Obrázek 52: Nález morfologicky shodných mikroplastů (upraveno dle Pivokonsky et al., 2018 - vrchní)

Zásadou úzkých pórů byly detekovány i ty nejmenší částice, které jsou pro lidský organismus zpravidla největší hrozbou (viz 2.3.3) Ve vzorcích se vyskytovaly zejména nepravidelné – sekundární mikroplasty, ale oproti předchozímu výzkumu byly hojně zastoupeny i mikroplasty primární – souměrné. Tím byla potvrzena kontaminace balených vod i z jiných zdrojů, než je materiál obalu. Stejně postřehy uvádí i Oßmann et al., (2018), který popisuje všestrannou kontaminaci nejčastěji materiály, jako je PET nebo PE. U rPET balených vod nebylo v rámci výzkumu shledáno prokazatelně vyšší množství uvolněných fragmentů ani jiných syntetických částic. Nálezy byly velmi individuální, pestré a nemělo na ně prokazatelný vliv syčení ani kategorie balených vod. Všechny druhy vod byly zasaženy kontaminací v poměrně hojném počtu, což svědčí o závažnosti mikroplastové problematiky. Výjimkou nebyla ani kojenecká balená voda či voda plněná do skla. Individualita byla znát i v porovnání dvou odlišných šarží. Mikroplasty se tedy do vody mohou uvolňovat pravděpodobně při úpravě, ale i vlivem špatného skladování. Nejmenší množství mikroplastů bylo nalezeno

paradoxně ve vzorcích ochucených vod, což bylo ale způsobeno obtížnou identifikací částic na hladkém filtru, kde sladidla a aroma tvořila výrazný povlak znemožňující analýzu. Proto byla kvantifikace částic v tomto typu vod z výzkumu úplně vyřazena.

Co se týče množství syntetických částic, po vyhodnocení byla stanovena průměrná hodnota 8741 částic na litr vody. Dle Pivokonského a kolektivu (2018) nejsou výsledky získané prostřednictvím SEM dostatečné pro objektivní zhodnocení kvality vod, neboť až 83% částic (v závislosti na vzorku) je nesprávně identifikováno jako mikroplast. Není-li ve výzkumu přítomná další z analytických metod, jako je například Ramanova spektroskopie nebo FTIR, mělo by být od výsledků získaných výhradně SEM analýzou odečteno určité procento částic. Koncentrace částic mezi 1486 a 8741 odpovídá výsledkům uvedeným v publikaci Oßmann et al., (2018), kde se množství částic na litr balené vody pohybovalo mezi 2649 a 10521. Ostatní studie publikovaly výsledky mnohem nižších hodnot, například Mason a kolektiv (2018) uvádí 315 částic/l. Člověk ročně požije několik desítek tisíc plastů a balená voda je pravděpodobně hlavním zdrojem příjmu, uvádí Cox et al., (2020). Nejtoxičtější z hlediska vlivu na lidský organismus se zdá být balená voda značky Saguaro. Nejen, že obsahovala největší množství syntetických částic ze všech testovaných vzorků, ale jednalo se také o mikroplasty těch nejmenších rozměrů, které jsou dle Yin et al., (2021) obecně toxičtější pro biotu.

5.3 Limitace metod

Ačkoliv bylo spoustu nedostatků z předchozích analýz odstraněno, vyskytlo se několik limitujících faktorů, které způsobily komplikace výzkumu. Některé z naplánovaných metod nemohly být využity z důvodu omezené funkce a od mnohých kroků bylo upuštěno kvůli značné časové náročnosti.

5.3.1 Technické limitace

Komplikace způsobené limitací stěžejních pomůcek zásadně ovlivnily celkový průběh a vyhodnocení analýzy.

Filtry

Jedním z původních záměrů byla filtrace skrze filtry z oxidu hlinitého, který je Pivokonským a kolektivem (2018) označován jako vhodný pro následnou kvantitativní analýzu. Výhodou by měla být nulová interference při analýze částic a zároveň nulové riziko kontaminace mikroplasty. Filtry ale bohužel nebyly dlouhodobě dostupné, a tak bylo přistoupeno k alternativnímu řešení.

Ramanova spektroskopie

Co nejefektivnější vyhodnocení původu částic může zprostředkovat Ramanova spektroskopie. Jedná se o analytickou metodu používanou k přesné a spolehlivé identifikaci látek a struktur. Podle vědeckých článků (Schymanski et al., 2021) není analýza částic metodami SEM-EDS dostačující k interpretaci kvalitních výsledků. EDS detektor je schopen vyhodnotit prvková spektra, ale informaci o přesném složení je nutné stanovit dalšími analytickými metodami. Ačkoliv měla být tato metoda do výzkumu zařazena, nebylo možné na Ramanově spektroskopu pracovat. Původ částic byl vyhodnocen pouze na základě prvkového spektra a mohlo tedy dojít ke značné chybovosti.

EDS analýza

Na krátkou dobu během výzkumu byl EDS detektor vyřazen z funkce. Identifikace mikroplastů tedy v tomto období probíhala pouze na základě morfologie částic. Některé struktury tak mohly být falešně vyhodnoceny jako syntetické.

5.3.2 Metodické limitace

Aby byly v rámci kvantifikace získány co nejpřesnější výsledky, je doporučeno analyzovat celou plochu filtru, nebo její větší část, minimálně však 25 % celku (Schymanski et al., 2021). Pokud je testovanou jednotkou balené vody značka, nikoliv lahev, je pro reprezentativní výsledek vhodné přefiltrovat vzorek o objemu větším než 10 l (Koelmans et al., 2019). Z důvodu značné časové náročnosti nemohla být tato kritéria splněna, a proto ve výsledcích mohlo dojít k určité chybovosti.

6 Závěr

Ačkoliv je problematika mikroplastového znečištění poměrně novým tématem, zejména v posledních letech stoupá počet studií, které přináší nespočet nových poznatků. Vlivem nadužívání plastů v kombinaci s nesprávným nakládáním s odpady dochází v životním prostředí k neustávající kumulaci syntetických hmot různých tvarů a velikostí, které svým dlouhým poločasem rozpadu zatěžují nejen samotné ekosystémy, ale současně především potravní řetězce.

Výskyt mikroplastů v těle člověka již není žádnou novinkou. Nejnovější výzkumy odhalily přítomnost syntetik v krvi, stolici, hluboko v plicích, a dokonce i v mateřském mléce. Je téměř jisté, že ve vyšších koncentracích způsobují mikroplasty v těle řadu negativních účinků, od zánětů až po souvislost s rakovinným bujením. Toxicita mikroplastů je dokonale prozkoumána u jiných živočichů, avšak přímé účinky na člověka jsou stále značně omezené. Jisté ale je, že je člověk mikroplastům vystaven denně prostřednictvím potravin, vody i vzduchu. Cesty vstupu mikroplastů do organismu jsou umožněny dietární, inhalační i dermální cestou, čímž je organismus vystaven až desítkám tisíc částic ročně. Spousta částic je z těla vyloučena nebo v organismu inhibována tak, aby byl toxický účinek potlačen. Největší obavy vzbuzují částice v nanoměřítku, které dokáží prostupovat tkáněmi a kumulovat se v jednotlivých orgánech. Zde vyvolávají oxidační stres buněk a zahajují kaskádu negativních účinků. Kromě mechanického poškození tkání jsou zvláště nebezpečné chemické látky přidávané do plastů, které se v těle člověka uvolňují. Mohou se chovat jako endokrinní disruptory a ovlivňovat funkce hormonů včetně s nimi souvisejících fyziologických procesů, nebo narušovat přirozenou skladbu mikrobioty.

Cílem diplomové práce bylo analyzovat jeden z hlavních zdrojů příjmů mikroplastů pro člověka, a sice vody balené v PET materiálech. Byla zprostředkována kvantifikace částic ve vybraných typech vod, tedy množství plastů potenciálně vnikající do lidského organismu. Je třeba podotknout, že koncentrace částic ve vodě nevyovídá o expozici člověka stejnému počtu. V balených vodách byly hojně zastoupeny různé typy mikroplastů o několika velikostech. Mikroplastovou

kontaminací byly zasaženy všechny vzorky, avšak největší nález byl potvrzen u balené vody značky Saguaro, čímž byly potvrzeny výsledky předchozí bakalářské práce. Nejvyšší kvalita vody z hlediska koncentrace mikroplastů byla shledána u balené vody Natura, kde byly v rámci testovaných míst nalezeny dohromady pouze 4 částice. Průměrná koncentrace částic na litr balené vody se pravděpodobně pohybuje mezi hodnotami 879 a 8741, avšak výzkum byl limitován několika faktory, a pro stanovení objektivních výsledků s minimalizací chybovosti by bylo za potřebí použití přesnějších analytických metod a mnohonásobně delší čas strávený nad analýzou jednoho vzorku.

Mikroplasty však prokazatelně vnikají do živých soustav a mohou znamenat reálnou hrozbu pro lidské zdraví, a je tedy třeba výzkum v této oblasti stále posouvat dál.

Dalším cílem autora je prokázat přítomnost mikroplastů v lidské moči, stanovit jejich množství a popsat negativní účinky související s touto expozicí.

Seznam použité literatury

ABBASI, S., SOLTANI, N., KESHAVARZI, B. et al., 2018: Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary. Persian Gulf. *Chemosphere*. 205:80-87. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.04.076.

ANBYMANI, S. et KAKKAR, P., 2018: Ecotoxicological effects of microplastics in biota: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (15), 14373–14396. DOI: 10.1007/s11356-018-1999-x.

ANDRADY, A. L. et NEAL, M. A., 2009: Applications and societal benefits of plastics. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 1977– 1984. DOI 10.1098/rstb.2008.0304.

AŠMONAITĖ, G., LARSSON, K., UNDELAND, I. et al., 2018: Size matters: Ingestion of relatively large microplastics contaminated with environmental pollutants posed little risk for fish health and fillet quality. *Environ. Sci. Technol.* 52:14381–14391. DOI: 10.1021/acs.est.8b04849.

AŠMONAITĖ, G., SUNDH, H., ASKER, N. et al., 2018: Rainbow Trout Maintain Intestinal Transport and Barrier Functions Following Exposure to Polystyrene Microplastics. *Environ Sci Technol.* 52(24):14392-14401. DOI: 10.1021/acs.est.8b04848.

AVES, A. R., REVELL, L. E., GAW, S. et al., 2022: First evidence of microplastics in Antarctic snow. *The Cryosphere*. 16, 2127–2145, DOI: 10.5194/tc-16-2127-2022.

BAKIR, A., O'CONNOR, I. A., ROWLAND, S. et al., 2016: Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life. *Environ. Pollut.* 219, 56–65. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.09.046.

BARBOZA, L. G. A., VIEIRA, L. R., BRANCO, V. et al., 2018: Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Aquat. Toxicol.* 195, 49–57. DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.12.008.

BARNES, D. K. A. 2002: Invasion by marine life on plastic debris. *Nature*. 416:808-809. DOI 10.10638/416808a.

BECK, C. H., 2022: Omezení plastových výrobků. *Právní zpravodaj* [online]. [cit. 2022-02-03]. Dostupné z: <https://www.beck-online.cz/bo/chapterview-document.seam?documentId=nrptembsgjpaxa6s7geza>.

BEDARD, K. et KRAUSE K. H., 2007: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87:245–313. DOI: 10.1152/physrev.00044.2005.

BOOTS, B., RUSSELL, C. W., GREEN, D. S., 2019: Effects of Microplastics in Soil Ecosystems: Above and Below Ground. *Environ Sci Technol.* 53(19):11496-11506. DOI: 10.1021/acs.est.9b03304.

BREDECK, G., HALAMODA-KENZAOU, I. B., BOGNI, A. et al., 2022: Tiered testing of micro- and nanoplastics using intestinal in vitro models to support hazard assessments. *Environ Int.* 158:106921. DOI: 10.1016/j.envint.2021.106921.

CAIS, J., 2015: Elektronová mikroskopie. Metalografie. *Praha: Centrum pro studium vysokého školství*. 1. vyd. str. 28. ISBN 978-80-86302-67-6.

CAMPANALE, C., MASSARELLI, C., SAVINO, I. et al., 2020. A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *International journal of environmental research and public health*, 17(4), 1212. DOI: 10.3390/ijerph17041212

CANESI, L., CIACCI, C., BERGAMI, E. et al., 2015: Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of marine bivalve *Mytilus*. *Mar. Environ. Res.* 11, 34–40. DOI: 10.1016/j.marenvres.2015.06.008

CATARINO, A. I., MACCHIA, V., SANDERSON, W. G. et al., 2018: Low levels of microplastics (MP) in wild mussels indicate that MP ingestion by humans is minimal compared to exposure via household fibers fallout during a meal. *Environ. Pollut.* 237, 675–684. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.02.069.

COLE, M., LINDEQUE, P., HALSBAND, C. et al., 2011: Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588–2597. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2011.09.025.

COX, K. D., COVERNTON, G. A., DAVIES, H. L. et al., 2019: Human Consumption of Microplastics. *Environ Sci Technol.* 53(12):7068-7074. DOI: 10.1021/acs.est.9b01517.

CRAWFORD, C. B. et QUINN, B., 2017: The interactions of microplastics and chemical pollutants. In: Crawford, C. B., Quinn, B. (Eds.), *Microplastic Pollutants*. Elsevier. 131–157. DOI: 10.1016/B978-0-12-809406-8.00006-2.

CRAWFORD, C. B. et QUINN, B., 2017: The interactions of microplastics and chemical pollutants. *Microplastic Pollutants*. Elsevier, pp. 131–157. DOI: 10.1016/B978-0-12-809406-8.00006-2.

ČTK, 2021: Infografika: plastový odpad a jeho recyklace v EU. *České noviny* [online]. [cit. 2022-02-04]. Dostupné z: <https://www.ceskenoviny.cz/zpravy/infografika-plastovy-odpad-a-jeho-recyklace-v-eu/2062816>.

DE LORENZO, G., FERRARI, S., CERVONE F. et al., 2018: Extracellular DAMPs in plants and mammals: Immunity, tissue damage and repair. *Trends Immunol.* 39:937–950. DOI: 10.1016/j.it.2018.09.006.

DENG, Y., ZHANG, Y., LEMOS, B. et al., 2017: Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Sci. Rep.* 7, 46687. DOI: 10.1038/srep46687.

DING, J., ZHANG, S., RAZANAJATOVO, R. M. et al., 2018. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Environ. Pollut.* 238:1–9. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.03.001.

DONALDSON, K., STONE, V., GILMOUR, P. S., BROWN, D. M., MACNESS, W., 2000: Ultrafine particles: mechanisms of lung injury. *Phys. Trans. R. Soc.* 358, 2741– 2749. DOI: 10.1098/rsta.2000.0681

DUAN, Z. H., DUAN, X. Y., ZHAO, S. et al., 2020: Barrier function of zebrafish embryonic chorions against microplastics and nanoplastics and its impact on embryo development. *Journal of hazardous materials* 395, 7. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122621.

DUIS, K. et COORS, A., 2016: Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental Sciences Europe.* 28(1). DOI 10.1186/s12302-015-0069-y.

EFSA [European Food Safety Authority], 2016: Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *efsa.europa.eu* [online]. [cit. 2022-08-06]. Dostupné z: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4501>.

ENSIGN, L. M., CONE, R., HANES, J., 2012: Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (6), 557–570. DOI: 10.1016/j.addr.2011.12.009.

FARRELL P. et NELSON K., 2013: Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environ. Pollut.* 177:1–3. DOI 10.1016/j.envpol.2013.01.046.

FDA [Food & Drug Administration], 2015: The Microbead-Free Waters Act: FAQs. *fda.gov* [online]. [cit. 2022-08-01]. Dostupné z: The Microbead-Free Waters Act: FAQs | FDA.

FITL, P., VLČEK, J., MAREŠOVÁ, E. et al., ©2022: Naprašování. Laboratoř přípravy nano a mikromateriálů. *fchi.vscht.cz* [online]. [cit. 2022-12-15]. Dostupné z: <https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/0040~84sPC1FITcksAQA.pdf?redirected>

FZU [Fyzikální ústav], 2017: Elektronovým mikroskopem do nitra materiálů aneb jak vypadá jejich struktura. *FZU.cz* [online]. [cit. 2022-12-12]. Dostupné z: <https://www.fzu.cz/aktuality/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialuaneb-jak-vypada-jejich-struktur>

GASPERI, J., WRIGHT, S. L., DRIS, R. et al., 2018: Microplastics in air: Are we breathing it in? *Curr Opin in Envi Sci & Health*. 1-5. DOI: 10.1016/j.coesh.2017.10.002.

GREVEN, C., MERK, T., KARAGÖZ, F. et al., 2016: Polycarbonate and polystyrene nanoplastic particles act as stressors to the innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas*) *Environ. Toxicol. Chem.* 35:3093–3100. DOI: 10.1002/etc.3501.

HARVEY, F., 2016: Microplastics killing fish before they reach reproductive age study finds. *The Guardian*. [online]. [cit. 2020-07-12]. Dostupné z: <https://www.theguardian.com/environment/2016/jun/02/microplastics-killingfish-before-they-reach-reproductive-age-study-finds>.

HORÁKOVÁ, P., 2020: Analýza mikroplastových částic v balených vodách. *Theses.cz*. 66 p. [online]. [cit. 2022-12-18]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/9z88xb/STAG94049.pdf>

HUANG, Y., DING, J., ZHANG, G. et al., 2021: Interactive effects of microplastics and selected pharmaceuticals on red tilapia: Role of microplastic aging. *The Science of the total environment* 752, 142256. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142256.

CHEN, J. C., CHEN, M. Y., FANG et al., 2020a: Microplastics negatively impact embryogenesis and modulate the immune response of the marine medaka *Oryzias melastigma*. *Marine Pollution Bulletin* 158, 11. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2020.111349.

JACOB, H., GILSON, A., LANCTÔT, C. et al., 2019: No effect of polystyrene microplastics on foraging activity and survival in a post-larvae coral-reef fish, *Acanthurus triostegus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* ;102:457–461. DOI: 10.1007/s00128-019-02587-0.

JENNER, L. C., ROTCHELL, J. M., BENNETT, R. T. et al., 2022: Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy. *Sci Total Environ.* 831:154907. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.154907.

JIN, M., WANG, X., REN, T. et al., 2021: Microplastics contamination in food and beverages: Direct exposure to humans. *Journal of Food Science.* 86(7):2816-2837. DOI: 10.1111/1750-3841.

KANG, H., BYEON, E., JEONG, H. et al., 2020: Different effects of nano- and microplastics on oxidative status and gut microbiota in the marine medaka *Oryzias melastigma*. *J. Hazard. Mater.* 124207. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124207.

KIRSTEIN, I. V., KIRMIZI, S., WICHELS, A., 2016: Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. *Mar. Environ. Res.* 120, 1–8. DOI: 10.1016/j.marenvres.2016.07.004.

KIRSTEIN, I. V., KIRMIZI, S., WICHELS, A., et al., 2016: Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic *Vibrio* spp. on microplastic particles. *Mar. Environ. Res.* 120, 1–8. DOI: 10.1016/j.marenvres.2016.07.004.

KOELMANS, A. A., MOHAMED NOR, N. H., HERMSEN, E., et al., 2019: Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water Res.* 155:410-422. DOI: 10.1016/j.watres.2019.02.054.

KUNZ, A., ©2022: What is microplastic?.Microplastic research in Taiwan. *microplasticresearch.wordpress.com*. [online]. [cit. 2022-03-09]. Dostupné z: <https://microplasticresearch.wordpress.com/what-is-microplastic/>

LARUE, C., SARRET, G., CASTILLO-MICHEL, H. et al., 2021: A Critical Review on the Impacts of Nanoplastics and Microplastics on Aquatic and Terrestrial Photosynthetic Organisms. *Small*. 17(20): 2005834. DOI: 10.1002/sml.202005834.

LEE, W. S., CHO, H. J., KIM, E. et al., 2019: Bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effect on the toxicity of Au ions in zebrafish embryos. *Nanoscale* 11 (7), 3173–3185. DOI: 10.1039/c8nr09321k.

LESLIE, H. A., VAN VELZEN, M. J. M., BRANDSMA, S. H. et al., 2022: Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environ Int*. 163:107199. DOI: 10.1016/j.envint.2022.107199.

LETT, Z., HALL, A., SKIDMORE, S. et al., 2021: Environmental microplastic and nanoplastic: Exposure routes and effects on coagulation and the cardiovascular system. *Environ Pollut*. 291:118190. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.118190.

LI, B., DING, Y., CHENG, X. et al., 2019: Polyethylene microplastics affect the distribution of gut microbiota and inflammation development in mice. *Chemosphere*. 244:125492. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125492.

LIU, A., RICHARDS, L., BLADEN, C. L. et al., 2015: The biological response to nanometer-sized polymer particles. *Acta Biomater*. 23, 38–51. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.05.016.

LUO, T., WANG, C., PAN Z. et al., 2019: Maternal polystyrene microplastic exposure during gestation and lactation altered metabolic homeostasis in the dams and their F1 and F2 offspring. *Environ. Sci. Technol*. 53:10978–10992. DOI: 10.1021/acs.est.9b03191.

MASON, S. A., WELCH, V. G. et NERATKO, J., 2018: Synthetic Polymer Contamination in Bottled Water. *Front Chem.*6:407. DOI: 10.3389/fchem.2018.00407.

MATCA, ©2022: Skenovací elektronový mikroskop (SEM). *Matca.cz* [online]. [cit. 2020-12-12]. Dostupné z: <https://matca.cz/technologie/analyticke-metody/sem/>

MOHR, K., SOMMER, M., BAIER, G. et al., 2014: Aggregation behavior of polystyrene-nanoparticles in human blood serum and its impact on the in vivo distribution in mice. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 5 (2): 193. DOI: 10.4172/2157-7439.1000193.

MONTI, D. M., GUARNIERI, D., NAPOLITANO, G. et al., 2015: Biocompatibility, uptake and endocytosis pathways of polystyrene nanoparticles in primary human renal epithelial cells. *J. Biotechnol.* 193, 3– 10. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.11.004

NANOSCIENCE, ©2022: Components in SEM. Scanning electron microscopy. *nanoscience.com* [online]. [cit. 2022-12-12]. Dostupné z: <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/components/>

OSMANN, B. E, SARAU, G, HOLTMANNSPÖTTER, H. et al., 2018: Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water. *Water Res.* 141:307-316. DOI: 10.1016/j.watres.2018.05.027.

PAN, D., VARGAS-MORALES, O., ZERN, B. et al., 2016: The effect of polymeric nanoparticles on biocompatibility of carrier red blood cells. *PLoS ONE.* 11. DOI: 10.1371/journal.pone.0152074.

PITT, J. A., KOZAL, J. S., JAYASUNDARA, N. et al., 2018: Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*) *Aquat. Toxicol.* 194:185–194. DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.11.017.

PIVOKONSKY, M., CERMAKOVA, L., NOVOTNA, K. et al. 2018: Occurrence of microplastics in raw and treated drinking water. *Sci Total Environ.* 643:1644-1651. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.102.

PIVOKONSKY, M., PIVOKONSKA, L., NOVOTNA, K. et al., 2020: Occurrence and fate of microplastics at two different drinking water treatment plants within a river catchment. *Sci Total Environ.* 741:140236. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140236.

PLAB, ©2022: PORAFIL® PE | MACHEREY-NAGEL [online]. [cit. 2022-12-01]. Dostupné z: <https://www.p-lab.cz/porafilsupsup-pe>

PRATA, J. C., 2018: Airborne microplastics: consequences to human health? *Environ. Pollut.* 234, 115–126. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.11.043.

PRATA, J. C., DA COSTA, J. P., LOPES, I. et al., 2020: Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Sci Total Environ.* 702:134455. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134455.

PRAVEENA, S M., SHAMSUL ARIFFIN, N. I., et NAFISYAH A. L., 2022: Microplastics in Malaysian bottled water brands: Occurrence and potential human exposure. *Environ Pollut.* DOI: 10.1016/j.envpol.2022.120494.

PRINZ, N. et KOREZ, Š., 2020: Understanding How Microplastics Affect Marine Biota on the Cellular Level Is Important for Assessing Ecosystem Function: A Review. *YOUMARES 9 - The Oceans: Our Research, Our Future.* 101-120. DOI 10.1007/978-3-030-20389-4_6.

RAGUSA, A., NOTARSTEFANO, V., SVELATO, A. et al., 2022: Raman Microspectroscopy Detection and Characterisation of Microplastics in Human Breastmilk. *Polymers (Basel).* 14(13):2700. DOI: 10.3390/polym14132700

REVEL, M., CHÂTEL, A., MOUNEYRAC, C., 2018: Micro(nano)plastics: a threat to human health? *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 1. 17–23. DOI: 10.1016/j.coesh.2017.10.003.

RIERA ROMO, M., PÉREZ-MARTÍNEZ, D. et CASTILLO FERRER, C., 2016: Innate immunity in vertebrates: An overview. *Immunology*. 148:125–139. DOI: 10.1111/imm.12597.

RIST, S., ALMROTH, B. C., HARTMANN, N. B. et al., 2018: A critical perspective on early communications concerning human health aspects of microplastics. *Sci. Total Environ.* 626, 720–726. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.092.

RIST, S., BAUN, A. et HARTMANN, N. B., 2017: Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* - quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environ. Pollut.* 228, 398–407. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.05.048.

SANA, S. S., DOGIPARTHI, L. K., GANGADHAR L. et al., 2020: Effects of microplastics and nanoplastics on marine environment and human health. *Environ Sci Pollut Res Int.* 27(36):44743-44756. DOI: 10.1007/s11356-020-10573-x.

SCHWABL, P., KÖPPEL, S., KÖNIGSHOFER, P. et al., 2019. Detection of Various Microplastics in Human Stool: A Prospective Case Series. *Ann Intern Med.* 171(7):453-457. DOI: 10.7326/M19-0618.

SCHYMANSKI, D., GOLDBECK, C., HUMPF, H. U., et al., 2018: Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water. *Water Res.* 129:154-162. DOI: 10.1016/j.watres.2017.11.011.

SCHYMANSKI, D., OßMANN, B. E., BENISMAIL, N., et al., 2021: Analysis of microplastics in drinking water and other clean water samples with micro-Raman and micro-infrared spectroscopy: minimum requirements and best practice guidelines. *Anal Bioanal Chem.* 5969-5994. DOI: 10.1007/s00216-021-03498-y.

SMITH, M., LOVE, D. C., ROCHMAN, C. M. et al., 2018: Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. *Curr Environ Health Rep.* 5(3):375-386. DOI: 10.1007/s40572-018-0206-z. PMID: 30116998; PMCID: PMC6132564.

SRINIVASAN, R., 2022: How Okra Could Clean Up Our Drinking Water. *Texas monthly*. [online]. [cit. 2022-12-01]. Dostupné z: <https://www.texasmonthly.com/news-politics/okra-water-microplastics/>.

SU, L., XUE, Y., LI, L. et al., 2016: Microplastics in Taihu Lake, China. *Environ. Pollut.* 216, 711–719. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.06.036.

ŠAFÁŘOVÁ, K., ©2022: Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie. *Nanosystemy.upol.cz* [online]. [cit. 2022-12-12]. Dostupné z: http://nanosystemy.upol.cz/download/2009/12-ws/safarova_sem.pdf

TALLEC, K., HUVET, A., DI POI, C. et al., 2018: Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. *Environmental Pollution* 242, 1226–1235. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.08.020.

TAO, D., ZHANG, K., XU, S. et al., 2022: Microfibers Released into the Air from a Household Tumble Dryer. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 120–126. DOI: 10.1021/acs.estlett.1c00911.

THOMPSON, R. C., MOORE, C. J., VOM SAAL F. S. et al., 2009: Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364: 2153–2166. DOI 10.1098/rstb.2009.0053.

THOMSON, A. 2018: Microplastic Invasion May Be Taking a Toll. *Scientific American* [online]. [cit. 2020-06-19]. Dostupné z: <https://www.scientificamerican.com/article/from-fish-to-humans-a-microplastic-invasion-may-be-taking-a-toll/>

UL-HAMID, A., 2018: A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy. *Springer Nature Switzerland*. 1st edition. 402p. ISBN 978-3-319-98481-0.

UPOL, ©2022: Elektronová mikroskopie transmisní a rastrovací. *jointlab.upol.cz*. [online]. [cit. 2022-12-12]. Dostupné z: https://jointlab.upol.cz/soubusta/OSYS/El_mikr/El_mikr.html

VYHLÁŠKA č. 275/2004 Sb., ©2022: o požadavcích na jakost a zdravotní nezávadnost balených vod a o způsobu jejich úpravy. [online]. [cit. 2022-07-24]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-275>.

VYHLÁŠKA č. 306/2012 Sb., ©2022: o podmínkách předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a o hygienických požadavcích na provoz zdravotnických zařízení a ústavů sociální péče [online]. [cit. 2022-02-21]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2012-306>

WAGNER, M. et OEHLMANN, J., 2009: Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 278–286. DOI: 10.1007/s11356-009-0107-7.

WAGNER, M., SCHERER, C., ALVAREZ-MUÑOZ, D. et al., 2014: Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe.* 26(1). DOI 10.1186/s12302-014-0012-7.

WANG, J., LI, Y., LU, L. et al., 2019: Polystyrene microplastics cause tissue damages, sex-specific reproductive disruption and transgenerational effects in marine medaka (*Oryzias melastigma*) *Environ. Pollut.* 254:113024. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.113024.

WATTS, A. J. R., URBINA, M. A., CORR, S. et al., 2015: Ingestion of plastic microfibers by the crab *Carcinus maenas* and its effect on food consumption and energy balance. *Environ. Sci. Technol.* 49 (24), 14597–14604. DOI: 10.1021/acs.est.5b04026.

WEST-EBERHARD, M. J., 2019: Nutrition, the visceral immune system, and the evolutionary origins of pathogenic obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116 (3), 723–731. DOI: 10.1073/pnas.1809046116.

XU, X. Y., LEE, W. T., CHAN, A. K. Y. et al., 2017: Microplastics ingestion reduces energy intake in the clam *Atactodea striata*. *Mar. Pollut. Bull.* 124 (2), 798–802. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2016.12.027.

YANG, Y. F., CHEN, C. Y., LU, T. H. et al., 2019: Toxicity-based toxicokinetic/toxicodynamic assessment for bioaccumulation of polystyrene microplastics in mice. *J. Hazard. Mater.* 366:703–713. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.12.048.

YAO, C., LIU, X., WANG, H. et al., 2021: Occurrence of Microplastics in Fish and Shrimp Feeds. *Bull Environ Contam Toxicol.* 107(4):684-692. DOI: 10.1007/s00128-021-03328-y.

YIN, K., WANG, Y., ZHAO, H., et al., 2021: A comparative review of microplastics and nanoplastics: Toxicity hazards on digestive, reproductive and nervous system. *Science of The Total Environment.* 774:145758. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145758.

YONG, C., VALIYAVEETIL, S., et TANG, B. L., 2020: Toxicity of Microplastics and Nanoplastics in Mammalian Systems. *International journal of environmental research and public health*, 17(5), 1509. DOI: 10.3390/ijerph17051509.

ZÁKON č. 243/2022 Sb., ©2022: *o omezení dopadu vybraných plastových výrobků na životní prostředí* [online]. [cit. 2022-12-01]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2022-243>.

ZÁKON č. 541/2020 Sb., ©2022: *o odpadech* [online]. [cit. 2022-12-01]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2020-541>.

ZHU, D., CHEN, Q. L., AN, X. L., et al., 2018: Exposure of soil collembolans to microplastics perturbs their gut microbiota and alters their isotopic composition. *Soil Biol. Biochem.* 116, 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.027>.

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1: Klasifikace plastových fragmentů dle velikosti (Kunz, ©2022)</i>	14
<i>Obrázek 2: Vstup mikroplastů do potravního řetězce (upraveno dle Abbasi et al., 2018)</i>	16
<i>Obrázek 3: Plastové úlomky nalezené v těle kranase duhového - Autor: Gyres Institut© (Thomson, 2018)</i>	17
<i>Obrázek 4: Schéma událostí po vstupu MP do buňky (upraveno dle Prinz et Korez, 2020)</i>	20
<i>Obrázek 5: Mechanismus toxického účinku MP na lidské buňky (upraveno dle Yong et al., 2020)</i>	21
<i>Obrázek 6: Vstup mikroplastů do organismu v závislosti na stavu střevního epitelu (upraveno dle Bredeck et al., 2022)</i>	25
<i>Obrázek 7: Cesty expozice člověka mikroplastům a související rizika (upraveno dle: Sana et al., 2020)</i>	28
<i>Obrázek 8: Přehled toxických účinků v závislosti na velikosti částic (upraveno dle Yin et al., 2021)</i>	33
<i>Obrázek 9: Kontaminace ovzduší prostřednictvím sušičky na prádlo (upraveno dle: Tao et al., 2022)</i>	35
<i>Obrázek 10: Extrakt z okry jako flokulant v pitné vodě (Srinivasan, 2022; ilustrace Israel G. Vargas©)</i>	37
<i>Obrázek 11: Spektrum rozlišitelných velikostí jednotlivými mikroskopy (upraveno dle: UPOL, ©2022)</i>	39
<i>Obrázek 12: Wolframový filment „V“ jako zdroj elektronů v SEM (Převzato z: NANOSCIENCE, ©2022)</i>	40
<i>Obrázek 13: Schéma konstrukce SEM (upraveno dle: Ul-Hamid, 2018)</i>	41
<i>Obrázek 14: Přehled signálů vznikajících interakcí primárního elektronového svazku a vzorku (upraveno dle: MATCA,©2022)</i>	42
<i>Obrázek 15: Prvkové spektrum - EDS analýza (zdroj vlastní)</i>	43
<i>Obrázek 16: Schéma iontového naprašování vzorků (Upraveno dle: Fitl et al., ©2022)</i>	44

<i>Obrázek 17: Balené vody použité ve výzkumu; různé šarže balených vod (zdroj vlastní)</i>	46
<i>Obrázek 18: Polyesterový membránový filtr (zdroj vlastní)</i>	48
<i>Obrázek 19: Přehled ostatních testovaných filtrů (zdroj vlastní)</i>	49
<i>Obrázek 20: Hadicová vývěva a její nastavení při filtraci (zdroj vlastní)</i>	50
<i>Obrázek 21: Filtrační aparatura Duran® (zdroj vlastní)</i>	51
<i>Obrázek 22: Zpracované vzorky uložené v nadepsaných Petriho miskách (zdroj vlastní)</i>	53
<i>Obrázek 23: Skleněný exsikátor se vzorky (zdroj vlastní)</i>	53
<i>Obrázek 24: Testované vody balené v 100% rPETu – Evian, Klášterná Kalcia, Natura (zdroj vlastní)</i>	54
<i>Obrázek 25: Naprašovačka kovů a argonová tlaková lahev (zdroj vlastní)</i>	55
<i>Obrázek 26: Naprašovací komora s pokoveným vzorkem (zdroj vlastní)</i>	56
<i>Obrázek 27: Nastavení naprašovačky (zdroj vlastní)</i>	56
<i>Obrázek 28: Rozdíl mezi pokovenými /vlevo/ a nepokovenými filtry (zdroj vlastní)</i> .	57
<i>Obrázek 29: Skenovací elektronový mikroskop HITACHI FlexSEM 1000 (zdroj vlastní)</i>	58
<i>Obrázek 30: Skříňový exsikátor(zdroj vlastní)</i>	58
<i>Obrázek 31: Připevnění filtru na držák vzorku (zdroj vlastní)</i>	59
<i>Obrázek 32: Mechanický ovládací panel HITACHI (zdroj vlastní)</i>	60
<i>Obrázek 33: EDS analýza nalezených částic (zdroj vlastní: AZtecOne)</i>	61
<i>Obrázek 34: Vzorec míst na filtru vybraných pro kvantitativní analýzu (zdroj vlastní)</i>	63
<i>Obrázek 35: Struktura čistého PE membránového filtru + graf (zdroj vlastní)</i>	64
<i>Obrázek 36: Kontrolní vzorek destilované vody (zdroj vlastní)</i>	65
<i>Obrázek 37: Porovnání mikroplastu (vlevo) a vodivé částice dle kontrastu (zdroj vlastní)</i>	67
<i>Obrázek 38: Vlákna nalezená v kojenecké vodě značky Saguaro (zdroj vlastní)</i>	68
<i>Obrázek 39: Vyhodnocení ochucených nápojů – 4a, 9a, 13b, 19a (zdroj vlastní)</i>	69
<i>Obrázek 40: Porovnání 3D struktur mikroplastů ve vzorcích 6b a 13a (zdroj vlastní)</i> 70	
<i>Obrázek 41: Příklady nalezených fragmentů (zdroj vlastní)</i>	70
<i>Obrázek 42: Příklady nalezených vláken (zdroj vlastní)</i>	71

<i>Obrázek 43: Příklady kulovitých mikroplastů (zdroj vlastní)</i>	71
<i>Obrázek 44: Srovnání nejmenšího a největšího nalezeného mikroplastu (zdroj vlastní)</i>	72
<i>Obrázek 45: Velikostní kategorie mikroplastů (zdroj vlastní)</i>	73
<i>Obrázek 46: EDS analýza mikroplastu ve vzorku Nature balené ve skle 14b + graf (zdroj vlastní)</i>	73
<i>Obrázek 47: EDS analýza mikroplastů ve vzorku Nature ochucené 13b (zdroj vlastní)</i>	74
<i>Obrázek 48 EDS analýza mikroplastu ve vzorku Saguara 20b + graf (zdroj vlastní)</i> .75	
<i>Obrázek 49: EDS analýza skleněného vlákna ve vzorku Nature 13b + graf (zdroj vlastní)</i>	75
<i>Obrázek 50: Výměra zorného pole (zdroj vlastní)</i>	76
<i>Obrázek 51: Mikroplasty nalezené v rámci 10 náhodných míst – Mattoni jemně perlivá (zdroj vlastní)</i>	78
<i>Obrázek 52: Nález morfologický shodných mikroplastů (upraveno dle Pivokonsky et al., 2018 - vrchní)</i>	83

Seznam tabulek

<i>Tabulka 1: Přehled testovaných balených vod (zdroj vlastní)</i>	45
<i>Tabulka 2: Přehled testovaných vzorků</i>	47
<i>Tabulka 3: Přehled vzorků doplněných ke zpracování</i>	54
<i>Tabulka 4: Přehled vzorků podrobených kvantitativní analýze</i>	62
<i>Tabulka 5: Přehled nalezených mikroplastů v testovaných balených vodách</i>	66
<i>Tabulka 6: Výsledky kvantitativní analýzy</i>	79

Seznam grafů

<i>Graf 1: Rapidní vzrůst produkce plastových hmot mezi stoletími (upraveno dle ČTK, 2021)</i>	12
<i>Graf 2: Podíl redukce plastového odpadu v EU (vypracováno dle ČTK, 2021)</i>	13
<i>Graf 3: EDS analýza vláken ve vzorku 20a a 20b (zdroj vlastní).....</i>	68
<i>Graf 4: EDS analýza mikroplastů ve vzorcích 6b a 13a (zdroj vlastní).....</i>	70
<i>Graf 5: EDS analýza mikroplastů ve vzorku 18a (zdroj vlastní).....</i>	72
<i>Graf 6: EDS analýza mikroplastů ve vzorku Nature ochucené 13b (zdroj vlastní).....</i>	74
<i>Graf 7: EDS analýza nalezených částic – kvantitativní analýza (zdroj vlastní).....</i>	78

Seznam zkratek

3D	trojrozměrný (z <i>angl.</i> Three-dimensional space)
AchE	acetylcholin esteráza
Au	zlato
BPA	bisfenol A
C	uhlík
DAMPs	alarminy (z <i>angl.</i> Damage-associated Molecular Patterns)
EDS	energievě disperzní spektroskop
ETC	elektronový transportní řetězec
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GIT	gastrointestinální trakt
H	vodík
LH	luteinizační hormon
LSH	lutein stimulující hormon
MP	mikroplast
MZ	Ministerstvo zdravotnictví
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NOX	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidáza
O	kyslík

PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCBs	polychlorované bifenyly
PE	polyetylen
PES	polyester
PET	polyethyltereftalát
POPs	perzistentní organické látky (<i>z angl.</i> Persistent Organic Pollutants)
PP	polypropylen
PS	polystyren
PTFE	polytetrafluoretylen
PVC	polyvinylchlorid
ROS	reaktivní forma kyslíku
rPET	recyklovaný polyethyltereftalát
SEM	skenovací elektronový mikroskop
SEM	skenovací elektronový mikroskop
TEM	transmisní elektronový mikroskop
TLR	toll-like receptory