

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Bc. Eliška Pospíchalová

Mikroplasty v pevných vzorcích životního prostředí

Microplastics in solid matrices of the environment

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, DSc.

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Předložená tištěná verze diplomové práce je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

V Praze, 2023

Bc. Eliška Pospíchalová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Cajthamlovi, DSc za odborné konzultace a trpělivost při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janě Boháčkové a Mgr. Kamile Šrédlové, Ph.D., které mi byly velkou oporou a pomocí jak při plánování experimentů, tak i prakticky v laboratoři. K tomu děkuji i středisku cytometrie za poskytnutí a zaškolení na fluorescenčním mikroskopu a Ing. Hynku Benešovi, Ph.D. za poskytnutí namletých mikroplastů. Velký dík patří i prof. RNDr. Ivanu Němcovi, Ph.D. za poskytnutí možnosti a pomoci při analýze vzorků na infračervené spektroskopii s Fourierovou transformací. Na závěr chci ještě poděkovat své rodině a blízkým, díky jejichž neustálé podpoře jsem svou práci dotáhla do zdárného konce.

Abstrakt

Mikroplasty, jakožto plastové částice o velikostech 5 mm–1 nm, se v současné době rozšířily napříč různými ekosystémy. Zvyšující se množství kontaminace mikroplasty vodního a terestrického prostředí vyžaduje vytvoření standardizovaných metod pro jejich separaci a analýzu. Jeden z hlavních vektorů vstupu mikroplastů do terestrických ekosystémů je skrze čistírenské kalů. Ty se recyklačně využívají ke hnojení a rekultivacím díky vysokému obsahu organické hmoty. Vědcům se podařilo v čistírenských kalů již kvantifikovat a identifikovat řadu mikroplastů o různých velikostech, typu polymerů, tvarů atd. Tato diplomová práce se zaměřuje na optimalizaci existujících metodik k extrakcím mikroplastů z pevných vzorků životního prostředí a jejich následné kvalitativní a kvantitativní analýze. Byly optimalizovány kroky potřebné k předúpravě vzorku před analýzou, a to redukce obsahu organických látek prostřednictvím Fentonovy reakce a separace mikroplastů flotací na základě hustoty v nasyceném roztoku NaI ($1,8 \text{ g/cm}^3$) pomocí centrifugace. K experimentům flotace a celkové výtěžnosti metodiky byly vyrobeny mikroplasty, které byly ve velikostních frakcích 20–40 μm a 150–300 μm vneseny do experimentů ke stanovení výtěžnosti. Pro kvantitativní analýzu byla zvolena fluorescenční mikroskopie a mikroplasty byly obarveny Nilskou červení. Poté byla optimalizovaná metodika použita k extrakci mikroplastů ze dvou čistírenských kalů z ČR. V čistírenských kalů byly mikroplasty detekovány nejprve pomocí fluorescenčního mikroskopu z hlediska kvantitativní analýzy a následně na infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací z hlediska kvalitativní analýzy. V kalů byly detekovány polymery typu polypropylen, polyethylen, polystyren, polyvinylchlorid, polyestery, polyuretany, polyamidy, polyepoxydy a kopolymery. Kvantitativní analýza odhalila množství mikroplastů řádově 10^3 – 10^4 částic na gram sušiny kalů. V kalů převažovaly tvarově fragmenty nad vlákny.

Klíčová slova: mikroplasty, čistírenský kal, fluorescenční mikroskopie, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Abstract

Microplastics, plastic particles of 5 mm–1 nm in size, are now widespread across different ecosystems. The increasing amount of microplastic contamination of aquatic and terrestrial environments requires the development of standardized methods for their separation and analysis. One of the main vectors of microplastic input to terrestrial ecosystems is through sewage sludge. The sludge is recycled for fertilization and reclamation due to its high organic matter content. Scientists have already been able to quantify and identify a range of microplastics in sewage sludge of different sizes, polymer types, shapes, etc. This thesis focuses on the optimization of existing methodologies to extract microplastics from solid environmental samples and their subsequent qualitative and quantitative analysis. The steps required for sample pre-treatment prior to analysis, namely reduction in organic matter content by the Fenton reaction process and density-based separation of microplastics by flotation in saturated NaI solution (1.8 g/cm³) using centrifugation, were optimized. Microplastics in size fractions of 20–40 µm and 150–300 µm were fabricated and introduced into flotation and total recovery experiments of the methodology to determine the recovery. Fluorescence microscopy was chosen for quantitative analysis and the microplastics were stained with Nile red. The optimized methodology was then used to extract microplastics from two sewage sludges from the Czech Republic. Microplastics were detected in the sewage sludge firstly by fluorescence microscopy for quantitative analysis and then by Fourier transform infrared spectroscopy for qualitative analysis. Polymers such as polypropylene, polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride, polyesters, polyurethanes, polyamides, polyepoxides and copolymers were detected in the sludge. Quantitative analysis revealed microplastic amounts in the order of 10³-10⁴ particles/ g dry weight of sludge. In terms of microplastic shape, fragments dominated over fibers in the sludge.

Key words: microplastics, sewage sludge, fluorescence microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy

Seznam zkratek

ATR	zeslabená totální reflektance
BPA	bisfenol A
ČOV	čistírna odpadních vod
ČSÚ	Český statistický úřad
dH ₂ O	destilovaná voda
EDS	elektronově disperzní spektrometrie
EO	ekvivalentní obyvatel
FPA	pole detektorů v ohniskové rovině
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HDPE	vysokohustotní polyethylen
LDIR	přímý laserový infračervený paprsek
LDPE	nízkohustotní polyethylen
NČ	nílská červeň
PA	polyamid
PC	polykarbonát
PE	polyethylen
PES	polyester
PET	polyethylentereftalát
PMMA	polymethylmethakrylát
PP	polypropylen
PS	polystyren
PTFE	polytetrafluorethylen
PU	polyuretan
PVC	polyvinylchlorid
PYR-GC-MS	pyrolýza s plynovou chromatografií a hmotnostní spektroskopií
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TED-GC-MS	termální desorpce ve spojení s plynovou chromatografií
TGA	termogravimetrická analýza
μ-FTIR	mikro infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
μ-Raman	mikro Ramanova spektroskopie

Obsah

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
SEZNAM ZKRATEK	6
1. ÚVOD	9
2. MIKROPLASTY	11
2.1 PRIMÁRNÍ MIKROPLASTY	11
2.2 SEKUNDÁRNÍ MIKROPLASTY	12
2.3 FYZIKÁLNÍ A CHEMICKÉ VLASTNOSTI MIKROPLASTŮ	13
2.4 TOXICKÉ VLASTNOSTI MIKROPLASTŮ	14
2.4.1 <i>Přímá toxicita</i>	15
2.4.2 <i>Nepřímá toxicita</i>	15
2.5 VSTUPY MIKROPLASTŮ DO ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ	16
2.6 MIKROPLASTY V ČISTÍRENSKÝCH KALECH	17
2.6.1 <i>Fyzikálně chemické vlastnosti mikroplastů v kalech</i>	17
2.6.2 <i>Počet mikroplastů v kalech</i>	18
3. DETEKCE MIKROPLASTŮ V KALECH	19
3.1 ÚPRAVA VZORKU K ANALÝZE	19
3.2 ANALÝZA MIKROPLASTŮ	20
3.2.1 <i>Kvantitativní fluorescenční analýza</i>	22
3.2.2 <i>Kvalitativní analýza infračervenou spektroskopií</i>	23
4. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	25
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
5.1 POUŽITÝ MATERIÁL, CHEMIKÁLIE A VYBAVENÍ	27
5.1.1 <i>Standardy</i>	27
5.1.2 <i>Chemikálie a materiály</i>	27
5.1.3 <i>Přístrojové vybavení</i>	28
5.1.4 <i>Software</i>	28
5.2 PŘÍPRAVA CHEMIKÁLIÍ, MATERIÁLU A PRACOVNÍ PODMÍNKY	28
5.2.1 <i>Filtrace vzorků</i>	29
5.3 OPTIMALIZACE DIGESCE	29
5.4 PŘÍPRAVA MIKROPLASTŮ	30
5.5 FLUORESCENČNÍ BARVENÍ MIKROPLASTŮ	32
5.5.1 <i>Protokol barvení Nilskou červení</i>	32
5.5.2 <i>Detekce na fluorescenčním mikroskopu</i>	32
5.6 OPTIMALIZACE FLOTACE	32
5.6.1 <i>Optimalizace flotace s částicemi PET</i>	32
5.6.2 <i>Optimalizace flotace s částicemi PET a ultrazvukem</i>	34
5.7 VÝTĚŽNOST CELÉ METODIKY	35
5.7.1 <i>Příprava slepých vzorků matrice</i>	36
5.7.2 <i>Celková výtěžnost metodiky</i>	37
5.8 OPTIMALIZACE DETEKCE MIKROPLASTŮ V KALECH	38
5.9 DETEKCE MIKROPLASTŮ V REÁLNÝCH VZORCÍCH ČISTÍRENSKÝCH KALŮ	42
6. VÝSLEDKY	45
6.1 VÝSLEDKY OPTIMALIZACE DIGESCE	45
6.2 VÝSLEDKY FLUORESCENČNÍHO BARVENÍ MIKROPLASTŮ	46
6.3 VÝSLEDKY OPTIMALIZACE FLOTACE	46
6.4 VÝSLEDKY VÝTĚŽNOSTI CELÉ METODIKY	49
6.5 VÝSLEDKY EXTRAKCE MIKROPLASTŮ Z ČISTÍRENSKÝCH KALŮ	51
6.5.1 <i>Kvalitativní analýza</i>	51

6.5.2	<i>Kvantitativní analýza</i>	53
6.5.3	<i>Tvary detekovaných mikroplastů</i>	54
7.	DISKUZE	56
8.	ZÁVĚR	60
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:	62

1. Úvod

Od 50. let minulého století byl zaznamenán masivní rozvoj plastového průmyslu a nadužívání plastových výrobků během každodenního života lidí. Jejich všestrannost, lehkost, odolnost a nízká cena způsobily snadné začlenění plastových výrobků do základních položek našich životů a zvýšení kvality života lidí na celé planetě. Plastové produkty, od předmětů na jedno použití, až po produkty s dlouhou životností, se staly součástí spotřebního zboží, ale i obalových materiálů, zdravotnických potřeb, elektroniky, stavebních materiálů a dalších (Andrady a Neal 2009). Nadměrné používání a nesprávná likvidace plastového odpadu má ale negativní vliv na životní prostředí. Ukázalo se, že značná část plastů je stále likvidována nesprávným způsobem, a to skládkováním, nebo nedbalým odhozením plastových předmětů mimo místa jejich určení, což přispívá k hromadění plastového odpadu a jeho postupné samovolné degradaci ve městech, přírodě, vodách, oceánech atd. (Jambeck et al., 2015). Rozklad plastů na základní minerální složky je ovšem dlouhý proces, který může trvat desítky až stovky let (Andrady, 2011; Albertsson, 1980), a tak se dříve plastový odpad rozpadá působením vnějších vlivů na menší a menší částice, tzv. mikroplasty a z nich nanoplasty (Monira et al., 2023; Thompson et al., 2004).

V posledních dvou dekáдах se tyto nepatrné částice staly předmětem aktivního environmentálního výzkumu, který potvrdil jejich přítomnost v různých ekosystémech, od nejhlubších oceánských příkopů až po odlehlé horské oblasti (Peng et al., 2018; Napper et al., 2020). Částice mikroplastů byly detekovány jak ve volné přírodě, tak i v živých organismech včetně člověka (Andrady, 2011; Azeem et al., 2021; Huerta Lwanga et al., 2017; Leslie et al., 2022). Výsledky výzkumů jsou zvláště alarmující ve spojení se studii o jejich potenciální toxicitě, a to jak pro člověka, tak i pro ostatní organismy (Wang et al., 2021).

Mezi důležité vektory vstupu mikroplastů do životního prostředí lze zařadit čistírenské kaly (Zhang et al., 2019; van den Berg et al., 2020). V čistírenských kálech dochází k uložení velkého množství organických látek a živin, což umožňuje jejich využití v zemědělství pro přímou aplikaci a rekultivaci a ke kompostování (ČSÚ, 2021). Nevýhodou jejich aplikace je, že spolu s organickou hmotou v kálech dochází k jejich vnosu zpět do koloběhu v životním prostředí (Sun et al., 2023; Clarke a Porter 2010). Zkoumání množství mikroplastů v kálech může být zásadním toxikologickým ukazatelem pro jeho další použití a potenciálně důležitým indikátorem znečištění odpadních vod. Dodnes ovšem neexistuje jednotná metodika z hlediska přípravy vzorků k analýze mikroplastů z kalů a jejich analýzy (El Hayany et al., 2022).

Na základě toho je nezbytný vývoj univerzální a reprodukovatelné metodiky pro separaci mikroplastů z pevného vzorku životního prostředí a jejich následnou kvantitativní a kvalitativní analýzu.

Cílem mé diplomové práce proto bylo optimalizovat některé existující metodiky separací mikroplastů z čistírenských kalů za účelem validace metodik a kvantifikace a identifikace mikroplastů v těchto maticích.

2. Mikroplasty

Pojem „mikroplast“ byl poprvé použit v odborné literatuře pro popis mikroskopických plastových fragmentů a vláken nalezených ve vzorcích písku, mořské vody a sedimentu R. C. Thompsonem a kolektivem. V jejich výzkumu byly detekovány mikroplasty v písku, ústí řek, ale nejvíce okolo pobřeží (Thompson et al., 2004). Navíc byla potvrzena přítomnost mikroplastů ve vzorcích mořské vody, která statisticky významně rostla po dekadách měření od 60. let minulého století. Tato pozoruhodná práce odstartovala aktivní badatelský zájem o plasty, jejich fragmenty a vliv na životní prostředí. Časem začaly vznikat nové terminologie pro detailnější popis mikroplastů. Dodnes jsou nejčastěji používanou definicí mikroplastů všechny plastové částice o velikostním průměru od 1 nm až po 5 mm (Frias a Nash, 2019). Dále v souvislosti

s jejich původem se mikroplasty rozdělují na primární a sekundární.

2.1 Primární mikroplasty

Primární mikroplasty jsou částice plastů, které vstupují do životního prostředí již v mikroskopické měřítku (výše uvedeném). Zdroji těchto mikroplastů jsou zejména: cíleně vyrobené mikroplasty v produktech, mikroplasty vzniklé jako vedlejší produkt, nebo částice neúmyslně vypuštěné do životního prostředí (Sundt et al., 2014).

Mezi cíleně vyrobené primární mikroplasty lze zařadit produkty pro konzumní a industriální účely. V konzumních produktech se s nimi setkáváme u výrobků osobní péče pod pojmem mikročástice či mikroskopické exfolianty, které jsou příměsí v těchto produktech a působí v nich jako částice vhodné pro mechanické čištění obličeje a těla, či zkrášlení. Jsou to například peelingové gely a scruby, zubní pasty, holicí pěny, třpytky, make up atd. (Fendall & Sewell 2009). Mezi další konzumní produkty lze zařadit i protiskluzová prachová média, tonery do tiskáren atd. Ostatní cíleně vyrobené produkty obsahující mikroplasty pro industriální účely představují abrazivní média při šterkování, pískování a při dalších procesech využívaných v loděnicích a průmyslových výrobnách. Primární mikroplasty jsou přítomny i ve speciálních chemikáliích a v olejích pro ropný průmysl nebo v textilním potisku oděvů. Mohou se vyskytovat i ve zdravotnických potřebách a jejich aplikacích, jakožto v potřebách pro zubní ordinace a dalších (Sundt et al., 2014).

Primární mikroplasty jako vedlejší produkty vznikají při procesní výrobě zejména v městském, průmyslovém, dopravním, stavebním a zemědělském průmyslu, ale lze sem zařadit i mikroplasty vzniklé v domácnostech. Patří k nim zejména prachové částice

při malování budov, opravě aut, řezání, lakování a vytváření plastových materiálů a jejich voskování (např. lyží), částice uvolňující se z pneumatik během dopravy na silnicích, ale i netkaná polypropylenová textilie využívaná pro mulčování v zemědělství. V domácnostech se jedná o prachové částice z nábytku, podlah a plastových předmětů. Důležitým zdrojem mikroplastů z domácností jsou i vlákna ze syntetických textilních tkanin, jež se uvolňují při nošení a praní (Sundt et al., 2014). Podle odhadů je praní syntetických textilií jedním z nejdůležitějších zdrojů primárních mikroplastů, jelikož vlivem mechanické síly oděru a tepla při praní se uvolňuje obrovské množství vláken, která se pak dostávají do odpadních vod jako mikroplasty (Boucher & Friot 2017). Nedávná studie ukázala, že množství mikrovláken uvolněných během praní se pohybuje od 124 do 308 mg na kg vyprané tkaniny v závislosti na typu vypraného oděvu, což odpovídá počtu mikrovláken v rozmezí od 640 000 do 1 500 000 (De Falco et al., 2019).

V neposlední řadě dochází k uvolnění mikroplastů do životního prostředí neúmyslně, a to během mimořádných událostí (nehody, požáry), či během transportu (Sundt et al., 2014).

2.2 Sekundární mikroplasty

Sekundární mikroplasty vznikají rozkladem větších plastových výrobků na menší o daném velikostním rozsahu přirozenými procesy zvětrávání až po vstupu do životního prostředí (Boucher & Friot 2017; Sundt et al., 2014). Vzniku sekundárních mikroplastů předchází několikastupňový proces rozkladu většího plastového odpadu na menší fragmenty. Mezi hnacími silami tohoto procesu jsou fotooxidace, která oslabuje strukturální integritu materiálu; termodegradace, k níž dochází při zahřívání plastového odpadu slunečním zářením nebo při požárech; fyzikální síly, jako je působení vln a větru a mechanický otěr pískem a kameny. V neposlední řadě patří mezi příčiny vzniku sekundárních mikroplastů i biodegradace, ačkoli se může zdát zanedbatelná, tak v případě biologicky rozložitelných plastů bude hrát větší roli (Napper & Thompson, 2019; Zhang et al., 2021). Lokální zastoupení jednotlivých typů mikroplastů závisí do značné míry na tom, jak dobře je prováděna recyklace plastového odpadu v oblasti, kde mikroplasty vznikly. Podle hrubých odhadů v rozvinutých zemích Evropy nebo Spojených států amerických může být zastoupení jednotlivých typů mikroplastů (primární vs. sekundární) ekvivalentní, zatímco v rozvojových bude dominovat zejména zastoupení sekundárních mikroplastů (Boucher & Friot, 2017; Wang et al., 2019).

2.3 Fyzikální a chemické vlastnosti mikroplastů

Podle normy ČSN EN ISO 472 je plast materiál obsahující významný podíl vysokomolekulárního polymeru, který lze v určitém stadiu zpracování na konečný výrobek v tekutém stavu tvarovat. Ne vždy ale výrobky z plastu obsahují čistý polymerní materiál. Ve složení běžných plastových materiálů se nachází základní polymer s různými "aditivami", což jsou chemické sloučeniny přidávané za účelem zajištění/zlepšení vlastností, funkčnosti a trvanlivosti polymeru u konečného produktu. Přidávají se během tvarování polymeru, a to vstříkáním, vytlačováním, vyfukováním, vakuovým lisováním atd. Nejčastěji používanými aditivami v různých typech polymerních obalových materiálů jsou: změkčovadla, zpomalovače hoření, antioxidanty, světelné a tepelné stabilizátory, maziva, pigmenty, antistatické látky, kluzné látky a tepelné stabilizátory. Například deaktivátory katalyzátorů neutralizují veškeré zbytky katalyzátorů, nukleátory zvyšují průhlednost pryskyřice a zkracují dobu zpracování a pigmenty dodávají různé barvy. Antistatické látky umožňují odvádět statickou elektřinu z fólie nebo dílu a přídavek zpomalovačů hoření umožňuje použití polypropylenu v elektronice, stavebnictví a dopravě. Ve fóliích se běžně používají protiskluzová a protierozní činidla, která zabraňují jejich slepení nebo přilnutí ke kovovým povrchům (Hansen et al., 2013; Hahladakis et al., 2018).

Tvar mikroplastů je další důležitou vlastností mikroplastů, která ovlivňuje jejich osud v životním prostředí. Mezi nejčastější tvary mikroplastů patří úlomky, pěny, vlákna, pelety, kuličky, vločky a fólie. Tvar mikroplastů těsně souvisí s jejich původem, úlomky často vznikají rozpadem větších plastových předmětů, vlákna se obvykle uvolňují z textilií a kuličky se běžně používají v produktech osobní péče a v průmyslových procesech (Hartmann et al., 2019). S tvarem souvisí i schopnost mikroplastů přenosu na větší vzdálenosti a schopnost sedimentace. Mikroplastová vlákna mohou díky svému podlouhlému tvaru a vyššímu koeficientu odporu být déle vznášena ve vodním sloupci nebo ve vzduchu a jsou přenášena na delší vzdálenosti ve srovnání s kulovitými mikroplasty o stejné velikosti (Xiao et al., 2023).

Rozdílná hustota mikroplastů v závislosti na jejich typu polymeru může odlišit jejich osud v životním prostředí. To kromě všeho určuje i biologickou dostupnost mikroplastů ve vodním sloupci, a proto se může typ pozřeného plastu u jednotlivých organismů lišit. Různé polymery mají různou hustotu a některé i větší hustotu, než mořská voda ($\rho > 1,02 \text{ g cm}^{-3}$), k nim patří například polyvinylchlorid (PVC) se specifickou hustotou 1,38–1,41 g cm^{-3} , nebo polyethylentereftalát (PET) se specifickou hustotou 1,34–1,39 g cm^{-3} , což způsobí jejich pokles ve vodním sloupci a akumulaci v bentickém prostředí a dnech moří a oceánů (Wright et al.,

2013; Weber et al., 2018; Surendran et al., 2023). Tyto mikroplasty jsou pak biodostupné pro bentická společenstva. Naopak planktivorní organismy, kteří obývají vrchní část vodního sloupce, pravděpodobněji pozřou ostatní plovoucími plasty, jejichž hustota je nižší než hustota vodního prostředí, ve které se nachází (Wright et al., 2013). Mezi ně patří nejčastěji polyethylen (PE) se specifickou hustotou v rozmezí 0,91–0,93 g cm⁻³, polypropylen (PP) o hustotě 0,85–0,94 g cm⁻³ či polystyren (PS) o hustotě 0,96–1,05 g cm⁻³ (Erni-Cassola et al., 2019; Li et al., 2016; Surendran et al., 2023). Ve vědecké studii autorů Lobelle & Cunliffe (2011), bylo experimentálně prokázáno, že i samotná hustota polymeru nemusí být finálně určující pro vznos a osud mikroplastů v akvatickém prostředí a že pokud se zachytí do biofilmů, tak i ty nejlehčí polymery (PP, PE či PS) mohou klesat ke dnu (Erni-Cassola et al., 2019). Vědci testovali, jak se bude chovat polyethylenový sáček na potraviny v přírodních podmínkách po expozici ve 2 m hloubce mořské vody v přístavu. Za tři týdny se vytvořil na sáčku tak silný nános biofilmu, že díky němu celý sáček začal klesat na dno navzdory původní hustotě polymeru (Lobelle & Cunliffe, 2011).

Mezi další fyzikálně-chemické charakteristiky mikroplastů patří jejich barva. Plastové polymery mají převážně bílou nebo průhlednou barvu, ale při výrobě plastových výrobků se do těchto polymerů mohou přidávat i barviva, která upravují jejich estetické nebo praktické vlastnosti (Pastorelli et al., 2014). Pigmenty v plastech mohou působit i jako ochrana proti slunečnímu záření tím, že absorbují světlo, čímž zabráňují fotodegradaci a prodlužují životnost výrobků. Zároveň i různé barvy mohou být náchylnější k fotodegradaci více než jiné. Například modré pigmenty mají tendenci rychleji fotodegradovat než červené či žluté. Proces degradace plastů může být dále ovlivněn sytostí barvy materiálu. Tmavší pigmenty mají silnější absorpci světla a nižší propustnost UV záření, čímž poskytují lepší ochranu před fotodegradací a zpomalují proces stárnutí (Zhao et al., 2022; Martí et al., 2020). Kromě toho se barva plastů může měnit po vystavení slunečnímu záření v čase, což se nejprve projeví jejich odbarvením nebo vybělením a následně zežloutnutím nebo zhnědnutím (Micheluz et al., 2021).

2.4 Toxické vlastnosti mikroplastů

V současné době množství vědeckých studií zabývajících se toxicitou mikroplastů významně roste. Toxicita mikroplastů je zkoumána u organismů původem z různých biotopů, ať už mořských, sladkovodních, u terestrických obratlovců či bezobratlých (de Sá et al., 2018; Li et al., 2016). Díky rozmanitosti mikroplastů z hlediska jejich velikostí, tvarů a typů polymerů jsou výsledky jejich toxicity velmi různorodé (Ziajahromi et al., 2018; Foley et al., 2018). Dokonce některé studie uvádějí, že toxicita mikroplastů nebyla pozorována u některých druhů

bezobratlých navzdory řadě jiných vědeckých publikací zaměřených na stejné sladkovodní druhy (Weber et al., 2018).

V literatuře se objevují dva termíny týkající se toxicity způsobené mikroplasty u organismů. Zprvce se jedná o přímou toxicitu mikroplastů, která je způsobena díky jejich mikroskopické velikosti a nepravidelnému tvaru. Zadruhé je to nepřímá toxicita, spojená ať už s látkami cíleně přidanými do plastů během jejich výroby (aditiva), či schopností plastů sorbovat organické polutanty a těžké kovy na svůj povrch (Ding et al., 2021a).

2.4.1 Přímá toxicita

Klíčovým faktorem, který přispívá k biologické dostupnosti mikroplastů, je jejich malá velikost. Troficky nižší organismy, např. filtrátoři ve vodě, mají omezenou potravní selektivitu, a tak zachycují vše v oné mikroskopické velikosti. U vyšších trofických organismů – např. planktivorních či jiných predátorů, dochází ať už k pozření kořisti s mikroplasty v těle, či rovnou k záměně mikroplastu za přirozenou kořist (Moore 2008; Jeong a Choi 2019). Po pozření může docházet v těle organismů k fyzikálním, fyziologickým a ekotoxickým účinkům. K důsledkům fyzikálního působení mikroplastů na vodní organismy lze zařadit poškození buněk a buněčných stěn a membrán, porušení trávicího systému, poruchu příjmu potravy, omezení v pohybu, potlačení růstu, behaviorální změny (snížení reprodukce a potlačení fitness či instinktu k přežití) a mortalitu (Lei et al., 2018; Ding et al., 2021b; de Sá et al., 2018). Fyziologické účinky souvisí se změnou či narušením nějakých orgánů, např. mechanické poškození žaber, jater, očí a mozku (van Pomeran et al., 2017; Ding et al., 2018). Vedlejšími ekotoxickými účinky tohoto působení jsou pak oxidativní stres, neurotoxicita, změny enzymatického systému, zánětlivé procesy atd. (Ding et al., 2021b). Ačkoliv se mikroplasty dostávají do těl organismů skrze celý potravní řetězec, díky mechanismu bioakumulace jejich koncentrace stoupá s vyšší trofickou úrovní. Lidé tak mohou být vystaveni důsledkům tohoto mechanismu skrze potravní řetězec a potenciálně přijímat nejvyšší koncentrace (Bhutto et al., 2023).

2.4.2 Nepřímá toxicita

Mikroplasty mohou obsahovat řadu látek, aditiv, které se do nich přidávají během výroby. Příkladem přidané toxické sloučeniny do plastu je bisfenol A (BPA), který je prokázaným endokrinním disruptorem s estrogenními a antiandrogenními účinky. Používá se jako monomer pro výrobu polykarbonátu a epoxidových pryskyřic (Hoekstra a Simoneau 2013) a již byla

zdokumentována jeho schopnost migrovat do okolního prostředí ať už z větších plastových materiálů, tak i mikroplastů (Liu et al., 2019; Ehlert et al., 2008). Mezi další riziková aditiva lze uvést plnidla, změkčovadla, antioxidanty, stabilizátory a zpomalovače hoření, přičemž mnohé z nich vzbuzují obavy kvůli své údajné toxicitě (Hermabessiere et al., 2017). U řady bromovaných zpomalovačů hoření, využívaných ke snížení hořlavosti plastových výrobků, byla potvrzena karcinogenita, endokrinní disruptivita a neurotoxicita a pouze část z nich je uvedena na seznamu Stockholmské úmluvy o perzistentních organických polutantech (Feiteiro et al., 2021; Linares et al., 2015).

Dalším významným mechanismem, kterým mikroplasty vykazují nepřímou toxicitu, je jejich schopnost sorbovat znečišťující látky. Adsorpční povrch mikroplastů, díky jeho hydrofobní povaze, umožňuje sorpci širokého spektra polutantů. Jedná se například o sorpci polychlorovaných bifenyly, polycyklických aromatických uhlovodíků a per- a polyfluoroalkylovaných látek (Mato et al., 2001; Llorca et al., 2018; Wang et al., 2018; Černá et al., 2021). Studie Černé a kol. zkoumala akumulaci polycyklických aromatických uhlovodíků polyuretanovými mikroplasty v kontaminované půdě. Po 28denní expozici bylo zjištěno, že koncentrace znečišťujících látek na povrchu mikroplastů je až 70krát vyšší než koncentrace polutantů přítomných v kontaminované půdě (Černá et al., 2021). Kromě znečišťujících látek mohou mikroplasty na svůj povrch sorbovat biofilm, který je vektorem dalších patogenů a mikrobů pro jejich přenos (Zettler et al., 2013).

2.5 Vstupy mikroplastů do životního prostředí

Vstupy mikroplastů do životního prostředí jsou různé. Buď pochází z pevniny – terestrické nebo z moří a oceánů. Ke zdrojům z mořského prostředí by se dal zařadit odpad z lodí – přepravních, obchodních, rybářských – sítě atd., či výletních, pak i ropné plošiny na mořích znečišťují oceány a v neposlední řadě je do moře vhazován odpad – z anglického termínu „ocean dumping“, vojenský, obecný, domácí a další (Hammer et al., 2012). Hlavními terestrickými vstupy jsou díky antropogenním činnostem domovní aktivity, průmyslové či zemědělské aktivity. Mikroplasty jsou roznášeny při sběru komunálních odpadů, transportu, odpadními vodami z domácností a průmyslu, povrchovými či podpovrchovými odtoky z krajiny či výluhy ze skládek nebo zavlážením či obděláním půdy v zemědělství a při aplikaci čistírenského kalu. V neposlední řadě jsou mikroplasty i roznášeny větrem (Surendran et al., 2023; Hammer et al., 2012). Proto se dá usuzovat, že se rozšířily již do všech složek životního prostředí – vody, půdy, vzduchu i sedimentů.

2.6 Mikroplasty v čistírenských kalech

Čistírenský kal je pevný materiál, který vzniká při zpracování a čištění odpadních vod a je jejich důležitým vedlejším produktem (Demirbas et al., 2017). Po jeho úpravě v kalovém hospodářství (stabilizace aerobní či anaerobní, odvodnění atd.) jej lze díky vysokému obsahu živin použít jako hnojivo nebo půdní modifikátor v zemědělství a lesnictví (Hatinoğlu a Sanin, 2021). Současně v České republice se čistírenský kal využívá zejména k přímé aplikaci a rekultivaci krajiny a ke hnojení (ČSÚ, 2021). Dle vyhlášky č. 437/2016 Sb. (Zákony pro lidi 2016) musí tento výstupní kal splňovat určitá kritéria, aby mohl být dále využíván. Mezi tyto kritéria spadá řada technických podmínek, mezních koncentrací vybraných rizikových látek v půdě, kde má být kal aplikován, a i mezních koncentrací v samotném kalu. Jedná se zejména o mikroorganismy (*Salmonella spp.*, termotolerantní koliformní bakterie, enterokoky) těžké kovy, halogenové organické sloučeniny, polychlorované bifenyly (suma 7 indikátorových kongenerů) a polycyklické aromatické uhlovodíky. Bohužel tato vyhláška nestanovuje žádné mezní koncentrace a limity pro mikroplasty. Mikroplasty přítomné v kalu, který je pak aplikován v životním prostředí, se nakonec dostanou opět do životního prostředí a skrze povrchový či podzemní odtok se mohou takto přesouvat z pevniny do vodních ekosystémů (Hammer et al., 2012; Alavian Petroody et al., 2021).

2.6.1 Fyzikálně chemické vlastnosti mikroplastů v kalech

Z hlediska fyzikálně-chemických vlastností mikroplastů, vstupujících do čistíren odpadních vod, se mikroplasty odlišují od sebe velikostmi, tvarem, barvou a typem polymeru.

Velikosti detekovaných mikroplastů v kalech jsou různé. Ačkoliv jsou často prezentovány i velké mikroplasty přítomné v kalech (>500 μm), tak představují obvykle jen malou část všech mikroplastů v těchto matricích (Gao et al., 2023a). Většina mikroplastů v kalech jsou částice o velikostech <500 μm (Lusher et al., 2017; Mintenig et al., 2017). Raju et al. (2020) také zjistili, že menší částice (1,5–125 μm) se vyskytují hojněji než velké částice (>250 μm) v kalu z čistíren odpadních vod. Podíl vláken v kalu může mít vliv i na velikostní distribuci mikroplastů, protože vlákna bývají delší než mikroplasty jiných tvarů (Gao et al., 2023b).

Z hlediska tvaru byly detekovány nejčastěji fragmenty, vlákna, filmy, mikrokuličky, pěny, granule, pelety a další nepravidelné tvary. Ovšem dle vědeckých studií jsou vlákna a fragmenty detekovány nejhojněji, a to nejen v kalech (Liu et al., 2022b; Hatinoğlu a Sanin, 2021; Reddy a Nair 2022; Yaseen et al., 2022). Hatinoğlu a Sanin dále shrnuli výskyt

nejčastějších barev a typů polymerů v čistírenských kalech. Porovnáním desítek studií přišli na to, že nejčastěji jsou detekovány mikroplasty s barvou bílou (80 %), černou a průhlednou (70 %), červenou a modrou (40%), žlutou a zelenou (30%), mnohobarevné (20 %) a barvami šedé, růžové, oranžové, tyrkysové a hnědé z 10 %. Dále shrnuli i nejčastěji detekované polymerní typy mikroplastů. Jednalo se o PE z 95 % a PP z 80 %, polyamidy (PA) ze 70 %, polyestery (PES) z 55 %, PET z 45 %, PS z 40 %, polyuretany (PU) z 25 %, polymethylmethakrylát (PMMA) z 20 %, akryl z 20 %, PVC z 20 %, polykarbonát (PC) z 10 %, silikon z 10 %, směsi PP/PE z 10 %, směs etylen-propylen-dienového kaučuku z 10 %, akrylonitrilbutadienstyren z 10 %, styrene-isopren-styren (SIS) z 10 % a ostatní z 5 % (Hatinoğlu a Sanin, 2021).

2.6.2 Počet mikroplastů v kalech

Výsledky vědeckých studií se od sebe odlišují i množstvím detekovaných částic v kalech. Počet mikroplastů u výstupu odpadních vod z čistíren je jiný v závislosti na různých podmínkách, jako jsou zdroj odpadních vod, úroveň provozu čistíren (primární, sekundární a terciární linky), kapacita čistírny, umístění, region, roční období, srážky atd. (Conley et al., 2019; Schnaak et al., 1997). Ačkoliv účinnost čištění odpadních vod z hlediska kontaminace mikroplasty je vysoká a pohybuje se v číslech nad 90 % (Yaseen et al., 2022), mikroplasty pak zůstávají ve využívaném odpadním kalu. Například Sun a kolektiv shrnuli množství mikroplastů detekovaných v kalech v devíti vědeckých pracích. Jednalo se o kaly ať už stabilizované v kalovém hospodářství, tak i surové z čistíren odpadních vod ze zemí Evropy, Spojených států amerických i Číny. Čísla se pohybovala od 50 do 170 000 částic/kg kalu (Sun et al., 2019). Dle jiné studie, zaměřené na mikroplasty v kalech z čistíren odpadních vod po celém světě, bylo shrnuto množství mikroplastů detekovaných v kalech od 0,23 do 10 380 částic/g kalu (Gao et al., 2023a). Do třetice report Lushera a kolektivu porovnal množství mikroplastů v odvodněném kalu z osmi čistíren odpadních vod v Norsku a počet částic se pohyboval od 1701 do 19 837 částic/ kg sušiny kalu (Lusher et al., 2017).

3. Detekce mikroplastů v kalech

Pro pochopení rozsahu znečištění pevných vzorků životního prostředí mikroplasty hraje velkou roli výběr správné metody k odběru vzorku, jeho předúpravě, extrakci mikroplastů z matrice a jejich následující účinné identifikaci a kvantifikaci. Navzdory rostoucím obavám ze znečištění neexistuje žádná standardní metoda, která by byla celosvětově uznávána a používána pro jejich detekci (Hatinoğlu a Sanin, 2021). Pro analýzu mikroplastů v kalech bylo popsáno několik různých metod s různou úrovní zajištění kvality, ale jejich nejednotnost ztěžuje jejich porovnatelnost (Okoffo et al., 2019). Navzdory této skutečnosti jsou kroky těchto metodik podobné a společně zahrnují nejčastěji redukci rušivé organické hmoty z hlediska pozorovatelnosti mikroplastů, separaci mikroplastů od zbytku matrice například jejím hustotním rozdělením a detekci chemickou či fyzikální metodou.

3.1 Úprava vzorku k analýze

Nejčastěji používanými metodami k odstranění nebo redukci organických látek ve vzorcích kalů jsou metody rozkladu peroxidem vodíku (H_2O_2) a Fentonova oxidace (Hatinoğlu a Sanin, 2021). Kromě těchto dvou metod běžně používaných k rozkladu organické hmoty se využívají i další. Lusher et al. (2017) zjistili, že ze čtyř nejběžnějších technik, tedy Fentonovy oxidace, oxidace H_2O_2 , a rozkladu pomocí NaOH nebo KOH, je Fentonova oxidace nákladově i časově nejefektivnější metodou redukce organických látek ve vzorcích čistírenských kalů. Podobně Hurley et al. (2018) uvedli, že Fentonova oxidace zajistila účinné odstranění organických látek bez pozorovaného poškození testovaných polymerů, kterými byly částice polypropylenu (PP), nízko hustotního polyethylenu (LDPE), vysoko hustotního polyethylenu (HDPE), PS, polyethylentereftalátu (PET), polyamidu (PA), polykarbonátu (PC) a PMMA.

Po odstranění organické hmoty je dalším krokem separace a izolace mikroplastů od zbylé části vzorku. Nejpoužívanější technikou je využití hustotního rozdělení částic vzorku v nasyceném roztoku. Těmito roztoky jsou nejčastěji NaCl ($1,2 \text{ g/cm}^3$) $ZnCl_2$ ($1,5 - 1,7 \text{ g/cm}^3$), $ZnBr_2$ ($1,7 \text{ g/cm}^3$), $CaCl_2$ ($1,4 \text{ g/cm}^3$) a NaI ($1,8 \text{ g/cm}^3$) (Li et al., 2019; Grause et al., 2022; Quinn et al., 2017). Autoři studie Grause et al. (2022) testovali a optimalizovali flotaci mikroplastů urychlenou centrifugací s 10 g půdy a 100 mg přidaných mikroplastů o různých polymerních typech. Jejich výsledky potvrdily aplikovatelnost této metody pro flotační experimenty zejména pro pevné vzorky životního prostředí. Li et al. (2019) uvedli, že existuje přímá úměra mezi hustotou solného roztoku a počtem extrahovaných částic mikroplastů. Podle jejich výsledků bylo množství vysokohustotních polymerů v roztoku NaI vyšší než v roztoku

NaCl. Při separaci mikroplastů ze vzorků životního prostředí ovšem není jasné, jak husté polymery se budou v kalesch nacházet, a tak autoři jiné studie navrhuji upřesnit výtěžnost flotačního kroku metodou sekvenční extrakce v NaI a $ZnCl_2$, a to i přes jejich vysokou pořizovací cenu a toxické vlastnosti (Silva et al., 2018; Okoffo et al., 2019). Po flotaci mikroplastů jsou částice v supernatantu odděleny od zbytku matrice a filtrací přeneseny na filtr pro následující kroky identifikace a kvantifikace (Bretas Alvim et al., 2020).

3.2 Analýza mikroplastů

Po předúpravě vzorku a extrakci mikroplastů z pevné matrice jsou částice identifikovány a kvantifikovány fyzikálními či chemickými metodami.

Mezi fyzikální metody analýzy mikroplastů patří pozorování objektů pod optickým mikroskopem, pomocí fluorescenční mikroskopie či skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a její doplňkové modifikace: elektronově disperzní spektrometrie (EDS) (Gao et al., 2023a; Hatinoğlu & Sanin, 2021). Podle studie Gies et al. (2018) bylo až 32,4 % podezřelých mikroplastů pod světelným mikroskopem později potvrzeno jako polymerní částice pomocí infračervené spektroskopie. Proto většina studií kombinuje obojí techniky, jak vizuální k předvýběru pravděpodobných mikroplastových částic z reprezentativní části vzorku, tak poté i spektroskopickou metodu analýzy (Hatinoğlu & Sanin, 2021). Navíc je možné pro odstranění míry subjektivity při vizuální charakterizaci použít k předvýběru částic i test horkou jehlou, který určuje po přiblížení se k částici, zda li je to plast vlivem zkroucení plastové materiálu v reakci na teplo (z anglického překladu „hot needle test“), nebo fluorescenčním barvením mikroplastů (Beckingham et al., 2023; Maes et al., 2017; Maxwell et al., 2020).

K chemickým metodám detekce lze zařadit spektroskopické a termo-analytické metody. Spektroskopické metody patří k obvykle preferovanějším metodám z hlediska možnosti určení tvarů, barvy, velikosti či počtu částic ve vzorku oproti termo-analytickým destruktivním metodám. Spektroskopické metody zahrnují infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací (FTIR) a všechny její modifikace: FPA (zkratka z anglického názvu focal plane array - pole detektorů v ohniskové rovině), ATR (zkratka z anglického názvu attenuated total reflectance – zeslabená totální reflektance) a mikro-FTIR (μ -FTIR), Ramanovu spektroskopii a její mikro-Raman (μ -Raman) modifikaci a v neposlední řadě i spektroskopii laser direct infrared (LDIR). K termo-analytickým metodám se zařazuje pyrolýza s plynovou chromatografií a hmotnostní spektroskopii (PYR-GC-MS), termální desorpce ve spojení s plynovou chromatografií (TED-GC-MS) a termogravimetrická analýza (TGA) (Hatinoğlu a Sanin, 2021).

Správnou volba detekční metody záleží i na požadovaném výstupu a cíli experimentu.

Shrnuté klady a zápory jednotlivých detekčních metodik jsou k dispozici viz Tabulka č. 1.

Tabulka č. 1 Metody používané pro detekci mikroplastů, převzato od Gao et al. (2023a) doplněno dalšími literárními zdroji (Huppertsberg & Knepper, 2018; Mai et al., 2018; Wang & Wang, 2018).

Detekční metoda	Výstupy	Výhody	Nevýhody
Optická mikroskopie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ počet částic ▪ tvar ▪ barva ▪ velikost 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ laciné, dostupné ▪ nedestruktivní metoda ▪ rychlá analýza ▪ možnost předvýběru částic k jejich ověření spektroskopickou analýzou 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ bez automatizace ▪ nelze určit typ polymeru ▪ náchylné pro pochybení při určování syntetických materiálů vs. přírodních
Fluorescenční mikroskopie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ počet částic ▪ tvar ▪ velikost 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ laciné, dostupné ▪ nedestruktivní metoda ▪ rychlá analýza ▪ možnost automatizace snímání filtru 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ nelze určit typ polymeru ▪ náchylné pro pochybení kvůli nespecifickému barvení materiálu a částic hydrofobního charakteru ▪ nelze kombinovat s Ramanovou spektroskopií
ATR-FTIR	<ul style="list-style-type: none"> ▪ typ polymeru 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ vhodné pro identifikaci větších částic (>500 μm) ▪ možnost analýzy bez předchozí úpravy vzorku 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ časově náročná analýza z důvodu nutnosti pre-selekce částic ▪ nelze aplikovat na mikroplasty <500 μm ▪ nutné chladit přístroj tekutým dusíkem
μ-FTIR	<ul style="list-style-type: none"> ▪ počet částic ▪ tvar ▪ barva ▪ velikost ▪ typ polymeru 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ nedestruktivní metoda ▪ analýza částic až do minimální velikosti 10 μm ▪ možnost automatického měření 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ jednobodová analýza ▪ pracná a časově náročná analýza kvůli generování velkého počtu redundantních spekter ▪ relativně nízká výkonnost identifikace, pokud jsou mikroplasty zakryty jinými materiály ▪ nutné chladit přístroj tekutým dusíkem
FPA-FTIR	<ul style="list-style-type: none"> ▪ počet částic ▪ tvar ▪ barva ▪ velikost ▪ typ polymeru 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ nedestruktivní metoda ▪ výkonná analýza veškerých plastových částic o rozměrech > 20 μm ▪ rychlejší detekce než jiné typy FTIR 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ nákladná instrumentace ▪ nutné chladit přístroj tekutým dusíkem
μ-Raman	<ul style="list-style-type: none"> ▪ počet částic ▪ tvar ▪ barva ▪ velikost ▪ typ polymeru 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ nedestruktivní metoda ▪ vhodné pro analýzu částic až do minimální velikosti 1 μm s vysokým rozlišením ▪ větší citlivost na nepolární funkční skupiny 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ nutné chladit přístroj tekutým dusíkem ▪ měřená vibrační spektra mikroplastů interferují s biologickými materiály, barvivy a pigmenty ▪ nedostatečná automatizace ▪ časová náročnost
LDIR	<ul style="list-style-type: none"> ▪ počet částic ▪ tvar ▪ barva ▪ velikost ▪ typ polymeru 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ vysoce automatizované měření ▪ schopnost kvantifikace a identifikace částic v relevantních místech a bodech ▪ schopnost zobrazení větší plochy filtrů 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ nákladná instrumentace ▪ knihovny spekter ještě nejsou dostatečně rozvinuté

		<ul style="list-style-type: none"> ▪ bez nutnosti chlazení tekutým dusíkem 	
SEM-EDS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ morfologie ▪ prvková analýza 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ vhodné pro analýzu částic až do rozměrů nanometrů ▪ obrazy vzorku s vysokým rozlišením ▪ vhodné pro zkoumání degradace mikroplastů 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ neposkytuje informace o samotných mikroplastech (druh, velikosti, barva) ▪ neumožňuje kvantifikaci částic ve vzorku ▪ časová náročnost pro předúpravu vzorku k analýze
Pyr-GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ typ polymeru ▪ celková hmotnost 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ vhodné pro analýzu částic o jakékoliv velikosti, ideální zejména pro malé mikroplasty ▪ neznámé polymery mikroplastů lze identifikovat porovnáním hmotnostních spekter se standardy ▪ minimální potřeba předúpravy vzorku 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ destruktivní metoda ▪ analýza pouze malého množství vzorku (0,1–0,5 mg) ▪ výsledky měření nezohledňují počet, velikosti, tvary a barvu mikroplastů
TED-GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ typ polymeru ▪ celková hmotnost 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ minimální potřeba předúpravy vzorku ▪ vhodné pro měření větší sady vzorků ▪ při použití TGA pece lze zpracovat větší množství vzorků, až 100 mg 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ destruktivní metoda ▪ analýza pouze malého množství vzorků (0,1–0,5 mg) ▪ výsledky měření nezohledňují počet, velikosti, tvary a barvu mikroplastů
TGA, DSC		<ul style="list-style-type: none"> ▪ rychlá analýza ▪ analýza většího množství (1–20 mg) vzorku oproti PYR-GC-MS 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ destruktivní metoda ▪ výsledky měření nezohledňují počet, velikosti, tvary a barvu mikroplastů ▪ vhodná pouze pro analýzu PP a PE polymerů

3.2.1 Kvantitativní fluorescenční analýza

Fluorescenční barvení je jednou z novějších metod, které se využívají pro kvantitativní analýzu a zobrazení morfologie mikroplastů. Mezi studiemi panuje velká neshoda z hlediska jednotného protokolu, nicméně pro fluorescenční barvení mikroplastů se nejvíce využívá barvivo nilská červeň (NČ) (Shruti et al., 2022). Toto lipofilní fluorescenční barvivo barví mikroplasty díky jejich hydrofobním vlastnostem způsobeným vícenásobnými vazbami C–H v jejich polymerních řetězcích. Molekuly NČ vniknou dovnitř polymeru a adsorbují se na povrch částic pomocí Van der Waalsových sil (Maes et al., 2017).

Pro přípravu NČ k barvení mikroplastů je barvivo potřebné nejprve rozpustit v organickém rozpouštědle, nejčastěji acetonu a methanolu. Dále se používají i hexan, chloroform, ethanol a isopropyl alkohol. Ačkoliv většina studií používá jedno rozpouštědlo k přípravě a výslednému barvení mikroplastů, tak některé z nich kombinují různá rozpouštědla

během přípravy roztoku a jeho finálního použití (Yaranal et al., 2021). Aby se zamezilo kontaminacím, roztok NČ by měl být nově připravený k plánovaným experimentům a při jeho výrobě přefiltrován přes sterilní filtr (Shruti et al., 2022). Výsledná koncentrace NČ se pohybovala v literatuře mezi 1–1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a doba barvení zhruba od pár minut až po desítky hodin. Nicméně Maese et al., 2017 použili koncentraci 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NČ a čas barvení mikroplastů od 30 do 60 minut, který byl optimální z hlediska rychlosti nabarvení a poměrem účinnosti barvení mikroplastů vs. rostoucímu signálu z pozadí filtrů. Někteří autoři uvádějí, že pomocí promíchávání vzorků a zvýšené teploty od 30 do 60 °C se zlepšila účinnost obarvení a stabilizace fluorescenčního signálu na dobu delší než 2 měsíce (Shruti et al., 2022; Lv et al., 2019; Liu et al., 2022a). Nejpoužívanějšími filtry pro fluorescenční barvení mikroplastů jsou černé filtry z PC nebo polytetrafluorethylen (PTFE) filtry (Shim et al., 2016; Lv et al., 2019).

Detekce mikroplastů na fluorescenčním mikroskopu probíhá nejčastěji v rozmezí excitačních vlnových délek 450–490 nm (zelená/žlutá fluorescence) a emisních vlnových délek od 515 do 565 nm (Shruti et al., 2022). Po nafocení filtru na fluorescenčním mikroskopu jsou částice analyzovány a kvantifikovány buďto manuálně či automatickou analýzou pomocí příslušného softwaru. Nejčastěji využívaným neplaceným softwarem pro kvantifikaci fluoreskujících mikroplastů je Image J, který umí zprostředkovat i automatickou analýzu obrazu ze snímků (El Hayany et al., 2022).

3.2.2 Kvalitativní analýza infračervenou spektroskopií

Studie Xu et al., 2019 uvádí, že v řadě publikací byly nejpoužívanější techniky pro kvalitativní analýzu FTIR spektroskopie ATR a její transmisní režim. Pro analýzu mikroplastů se také používá zobrazování na bázi FPA, kde je mnoho detektorů umístěno v mřížkovém poli. Po změření spekter neznámé částice je spektrum identifikováno porovnáním s údaji v referenční knihovně polymerů, např. spektrální knihovně Omnic, knihovně polymerů Nicodrom, knihovně Sadtler a knihovně materiálů Shimadzu, nebo s knihovnou spekter siMPle (Jia et al., 2022). Nesoulad mezi různými použitými knihovnami vede opět k neporovnatelným výsledkům studií. Navíc někteří autoři neuvádí vždy podrobnosti o tom, jak bylo vypočteno skóre pro shodu nebo podobnost porovnávání spekter (Xu et al., 2019). Druhou nejpoužívanější metodou identifikace částice je porovnání spekter s literaturou. V rámci toho někteří autoři neuvádějí algoritmy použité pro srovnání spekter, zatímco jiní prokázali, že částice byly identifikovány alespoň na základě charakteristických píků funkčních skupin polymerů. Tyto oblasti pásů představují běžné vibrace pro skupiny CH (2980–2780), CO (1760–1670) a CH (1480–1400), které se ovšem vyskytují téměř ve všech organických látkách (Xu et al., 2019). Vizualní porovnání

má navíc nevýhodu v tom, že je pracné. V ostatních studiích byla vytvořena vlastní knihovna spekter se známými polymery a následnou korelací (Xu et al., 2019). Je zřejmé, že tento přístup může vést k podhodnocení výsledků, pokud je knihovna tvořena s omezeným množstvím použitých referenčních syntetických polymerů, tak i přírodních látek.

Zobrazování FTIR na bázi FPA umožňuje rychlé pořízení snímků, avšak doba analýzy je dlouhá, studie (Löder et al., 2015) uvádí, že změřit filtr o průměru 11 mm trvalo 10,75 h, a tak ji nedoporučují pro rutinní analýzu. Jedno z řešení je založeno na bodovém mapování, kdy se analyzuje celý řez filtru sběrem spekter v různých bodech podél mřížky pomocí motorizovaného stolku s pohybem po malých krocích (Käppler et al., 2016). Pro podporu automatizované analýzy je ovšem důležité získat informace o tom, kde se jednotlivé částice nacházejí. Proto studie Xu et al. (2019) doporučuje dva možné přístupy k určení souřadnic částic. Zaprvé, vytvořit si obrazovou mozaiku v bílém světle získaném z kamery mikroskopu nad mapovací oblastí, či zadruhé provést rychlé předběžné skenování s krátkou integrační dobou a nízkým spektrálním rozlišením.

Citlivost při měření spekter částic pomocí FTIR analýzy na přirozenou či indukovanou fluorescenci, pigmenty a barviva je nízká oproti Ramanově spektroskopii (Gao et al., 2023b; Lv et al., 2019), a tak se nabízí i možnost kombinace předvýběru částic pomocí fluorescenčního barvení a následné kvalitativní ověření částic spektroskopicky obdobně, jako to testovali ve studii Grause et al. (2022) s půdní matricí.

4. Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodický protokol extrakce mikroplastů z čistírenských kalů. Tento protokol vznikl testováním a zlepšováním jednotlivých kroků opakujících se v metodikách vědeckých publikací za účelem racionalizace použitých parametrů, přístrojů, činidel atd. Čistírenský kal byl vybrán z hlediska komplexity matrice v obsahu organických látek a zároveň díky vysokému potenciálu výskytu mikroplastů.

Proces digesce byl koncipován tak, aby zodpověděl, jak efektivně je v průběhu času odstraňována organická hmota z kalů prostřednictvím Fentonovy reakce. Další kroky byly validovány pomocí testů s uměle vytvořenými mikroplasty, které z hlediska svých heterogenních tvarů přidávaly vyšší relevanci z pohledu simulace reálných mikroplastů přítomných v životním prostředí. V ostatních publikacích jsou metodiky validovány zpravidla pomocí nákladných a tvarově homogenních kulovitých mikroplastů, ačkoliv již bylo prokázáno, že tvar může mít vliv na celkovou výtěžnost metodiky při jejím testování. Vzhledem k časové náročnosti experimentů byl k pokusům výtěžnosti flotace a celkové metodiky extrakce vybrán pouze jeden typ polymeru. Ke flotaci to byl polymer PET a k celkové výtěžnosti polymer HDPE, ale vždy ve dvou velikostních frakcích 20–40 μm a 150–300 μm , které jsou běžně detekovány v kalech. Ke flotačním experimentům v nasyceném roztoku NaI (1,8 g/cm^3) byl vybrán polymer PET, jelikož je to jeden z nejhustších polymerů vyskytujících se v kalech, a tak výsledek výtěžnosti může potvrdit účinnost flotace nejen pro polymery s vysokou hustotou, ale dle teoretické úvahy i pro polymery s nižší hustotou než testovanou. K celkové výtěžnosti metodiky byl vybrán polymer HDPE z hlediska jeho dominantního výskytu v kalech a na základě dobré odlišitelnosti od pozadí matrice a fluorescenční odezvy. Ten byl uměle přidán ve známém množství do slepých vzorků kalů. Slepý vzorek kalu, který byl předem zbaven organické hmoty a flotujících částic, měl připodobnit proces reálné extrakce mikroplastů z tohoto typu matrice.

Dalším cílem této práce bylo provést kvalitativní a kvantitativní analýzu extrahovaných mikroplastů z reálného vzorku čistírenských kalů z České republiky optimalizovanou metodikou. Kromě toho byly popsány tvary detekovaných polymerů v kalech.

Hypotézy:

- 1) Digesce Fentonovým činidlem odstraní většinu organické hmoty v kalech do 24 hodin reakce navzdory vysokému obsahu organických látek.

- 2) Částice polymeru PET o heterogenních tvarech a rozměru 20–40 μm nebudou flotovat v nasyceném roztoku NaI, ať už vlivem jejich malé velikosti, či povahou vysoké hustoty polymeru.
- 3) Výtěžnost optimalizované metodiky extrakce částic HDPE z uměle kontaminovaného kalu bude dostatečná navzdory vlivu přítomné matrice.
- 4) Nejvíce se v analyzovaných čistírenských kalech budou vyskytovat polymery PE a PP, které jsou v kalech dle dostupné literatury detekovány nejčastěji.
- 5) Z hlediska tvarů mikroplastů budou v analyzovaných čistírenských kalech převažovat vlákna, nikoliv fragmenty, kvůli vysokým koncentracím vláken v odpadních vodách především z praní syntetických materiálů.

5. Experimentální část

5.1 Použitý materiál, chemikálie a vybavení

5.1.1 Standardy

Vysokohustotní polyethylenový granulát	GoodFellow, VB
Nízkohustotní polyethylenový granulát	GoodFellow, VB
Polypropylenový granulát	GoodFellow, VB
Suchá směs PVC K57 obsahující stabilizační systém Ca-Zn (bez změkčovadel)	Spolana, ČR
Polyethylentereftalátový granulát	GoodFellow, VB
Polystyrenový granulát	GoodFellow, VB

5.1.2 Chemikálie a materiály

Plastová síta pluriStainer s velikostí ok 1; 5; 10; 20; 40; 60; 100; 150; 300 μm	PluriSelect, Německo
Nerezová síta s víky spolu se záchytnými miskami o velikosti ok 1 mm a 63 μm	Retsch, Německo
Kovové držáky na filtry se vzorky	MBÚ AV ČR v.v.i., ČR
Síťoviny z nerezové oceli (316); typ vazby Nizozemská, velikost ok 1 a 10 μm	Shanghai Yinhong International Trade Co.,Ltd, Čína
Nitrát celulozové filtry 0,2 μm	Whatman, VB
Jodid sodný, rectapur GPR	VWR, Francie
Peroxid vodíku, p.a. nestabilizovaný (30%)	Lach-Ner, ČR
Síran železnatý heptahydrát, p.a.	Lach-Ner, ČR
Ethanol absolute	VWR, Francie
Aceton pro HPLC	VWR, Francie
Denaturovaný líh (99%)	Lach-Ner, ČR
Kyselina sírová, p.a. (96%)	Penta, ČR
Síran železnatý heptahydrát, p.a.	Lach-Ner, ČR
Nilská červeň, N 3013	Sigma Aldrich, USA

5.1.3 Přístrojové vybavení

Vodní lázeň	Memmert, Německo
Vortex mixer ZX Classic VELP	Scientifica, Itálie
Fluorescenční mikroskop OV 100	Olympus, Japonsko
FlashSmart CHNS/O Elemental analysis	Thermo Fisher Scientific, USA
Pec	Memmert, Německo
Vakuové filtrační zařízení LABOPORT® N 86 KT.18	KNF, Francie
Kulový mlýn 6775 Freezer/Mill®	SPEX Sample Prep, VB
MX5 mikrováha	Mettler Toledo, Švýcarsko
Ultrazvuková elektronická čisticí lázeň U- 7STH	Esoson, Slovensko
Magnetické míchadlo	Velp Scientifica, Itálie
Lyofilizátor	Labio, ČR
Infračervený spektrometr s Fourierovou transformací	Thermo Fisher Scientific, USA
Nicolet iN10	
Centrifugační mlýn Retsch ZM 200	Retsch, Německo
Analytické váhy Extend	Sartorius, Německo
Centrifuga Medifriger BL osazená	JP Selecta, Itálie
výkyvným rotorem 7009079 nebo úhlovým rotorem 7001083	
Čistička vzduchu Dyson Pure Cool TP00	Dyson Ltd., VB

5.1.4 Software

ImageJ2, verze 2. 9. 0. v rozšířeném balíčku pro zpracování obrazu FIJI	National Institutes of Health; Laboratory for Optical Computational Instrumentation, USA
Software siMPle, verze 1. 1. β	Aalborg University (Dánsko) ve spolupráci s Alfred Wegener Institute (Německo)
Referenční databáze siMPle, single spectra IR, verze 1.02	Aalborg University (Dánsko) ve spolupráci s Alfred Wegener Institute (Německo)
Program pro statistické vyhodnocení dat R, verze i386 4.3.2	R Core Team, USA

5.2 Příprava chemikálií, materiálu a pracovní podmínky

Vhodným materiálem k filtracím a k detekci mikroplastů byla zvolena nerezová ocel (typ 316), proto byla pořízena nerezová síťovina (Shanghai Yinhong International Trade Co.,Ltd, Čína),

ze které byly nastříhány jednorázové filtry. Ty byly čištěny v ultrazvuku v pořadí s: detergentem ve vodě; vodou a ethanolem vždy po 15 minutách, po ultrazvuku byly opláchnuty acetonem. Byl připraven zásobní roztok iontů Fe^{2+} navážením 15 g heptahydrátu síranu železnatého ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) do 1000 ml destilované vody (dH_2O) s přidavkem 6 ml 96% kyseliny sírové. Byly připraveny zásobní nasycené roztoky jodidu sodného (NaI) o hustotě $1,8 \text{ g/cm}^3$ odvážením 184 g do 100 ml dH_2O za stálého míchání a teploty nad $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Používané roztoky (dH_2O , NaI a 20% ethanol v dH_2O) byly před použitím filtrovány podtlakem jednou přes nitrocelulózový filtr (Whatman) o porozitě $0,2 \mu\text{m}$ a dvakrát přes nerezový filtr o porozitě $1 \mu\text{m}$. Byl připraven zásobní roztok Nilské červeně (NČ) v acetonu o koncentraci $1000 \mu\text{g/ml}$, který byl třikrát filtrován přes stříkačkové filtry z polytetrafluorethylenu (PTFE) o porozitě $0,2 \mu\text{m}$. Zásobní roztok byl uchováván při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ve tmě.

Pokusy probíhaly v souladu s doporučenými podmínkami pro minimalizaci kontaminace mikroplasty z okolního prostředí (oddělená místnost s filtrací vzduchu – Dyson Pure Cool TP00, používání převážně kovových a skleněných nástrojů, práce v bavlněném oblečení). Nádobí bylo umyto neplastovými pomůckami s detergentem na nádobí a opláchnuto ethanolem a acetonem. Skleněné vialky používané na fluorescenční barvení vzorků byly po umytí vypalovány na $400 \text{ }^\circ\text{C}$ v peci po dobu 4 hodin.

5.2.1 Filtrace vzorků

Veškeré filtrace vzorků během experimentů následujících po optimalizaci digesce (filtrace od digesčního činidla; NaI či barvicího média) probíhaly podtlakem přes skleněnou filtrační aparaturu se skleněnou fritou a nerezovým filtrem (připraveným dle kapitoly výše 5.2). Oplachy vzorků a použitých nádob se vzorky během všech filtrací byly stanoveny jednotně na: převedení vzorku do filtrační aparatury, 5x oplach nádoby dH_2O ($\frac{3}{4}$ objemu nádoby), 5x oplach nádoby cca 3 ml ethanolu, 5x oplach stěn nálevky cca 1,5 ml ethanolu. V případě oplachu od barvicího média byl přidáván ethanol dle potřeby do odstranění reziduálního NČ.

5.3 Optimalizace digesce

Tento experiment měl za cíl zjistit optimální čas pro dosažení nejvyšší účinnosti redukce organického materiálu v matrici kalů. Podle literatury (Masura et al., 2015) byla zvolena digesce za přítomnosti Fentonova činidla při $60 \text{ }^\circ\text{C}$ (vyšší teplota by mohla vést k možné deformaci plastů). Jako ukazatele úbytku organické hmoty byly vybrány úbytek celkové hmotnosti kalu a úbytek celkového dusíku. Pro experiment byly zvoleny tři různé čistírenské

kaly z ČR s označením 1; 2 a 3, experiment byl proveden ve třech paralelách v časech digesce 1; 2; 4; 6 a 24 hodin. Jako kontrola sloužily neoxidované původní kaly.

Kaly byly nejprve lyofilizovány. Po jejich vysušení a temperaci na laboratorní teplotu byly homogenizovány ve třecí misce do formy sypkého prášku. Na analytických vahách bylo odváženo přibližně přesně 0,1000 g kalů do skleněných zkumavek. Reakce byla započata přidáním 0,8 ml zásobního roztoku iontů Fe^{2+} a 0,8 ml 30% H_2O_2 . Peroxid byl dále přidáván postupně (3x 0,8 ml po 15 minutách), aby se zamezilo náhlým bouřlivým reakcím a vývoji plynu, a tím ke ztrátám vzorku vypěněním. Pro zvýšení účinnosti reakce byly vzorky mezi přidávky peroxidu umístovány do pece o teplotě 60 °C. Po uplynutí zvolené doby od počátku byla reakce zpomalena ponořením vzorků do ledové vodní lázně. Bezprostředně poté byly vzorky přefiltrovány na předem zvážené nitrocelulóзовé filtry s velikostí pórů 0,45 μm a opláchnuty od činidel dH_2O . Vzorky po filtraci byly uschovány ve skleněných Petriho miskách v exsikátoru, dokud nevyschly do konstantní hmotnosti. Poté byly zváženy i s filtry s přesností na 0,0001 g ke zjištění úbytku celkové hmotnosti. Pro zjištění úbytku celkového dusíku bylo ze vzorků odváženo množství 3 mg na mikrovahách MX5 (Mettler Toledo) s přesností na devět desetinných míst do nerezových úzkých kalíšků. Kalíšky byly vloženy do přístroje FlashSmart CHNS/O Elemental analysis (Thermo Fisher Scientific) a v něm bylo sekvenčně změřeno množství celkového dusíku v dané navážce.

5.4 Příprava mikroplastů

Pro účel výroby vlastních mikroplastů k validacím dalších kroků metodiky byly vybrány celosvětově nejrozšířenější polymery na bázi fosilních paliv (PlasticsEurope 2023). Hlavním cílem výroby vlastních mikroplastů bylo dosáhnout podobnosti s reálnými mikroplasty z hlediska jejich tvarové a velikostní heterogenity, na rozdíl od symetrických a velikostně homogenních částic, které jsou běžně dostupné na trhu.

Granuláty HDPE, LDPE, PP, PS a PET byly zakoupeny spolu se směsí suchého PVC K57 obsahující stabilizační systém Ca-Zn bez přítomnosti změkčovadel. Výroba plastové desky probíhala na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR. Kolegové suchou směs nejprve roztavili v laboratorním hnětiči Brabender Plasticorder W50 EH (Brabender, Německo) při 180 °C a rychlosti míchání 30 ot/min a následně hydraulicky slisovali (Fontijne Grotnes, Nizozemsko) při 180 °C střídavě pod tlakem 1,5 a 3,0 MPa. Z pořízených granulátů PP, PS, LDPE, PET a vyrobené PVC desky byly namlety heterogenní směsi mikroplastů za použití centrifugačního mlýnu (Retsch, Německo) při 13 000 ot/min. Chlazení plastů tekutým dusíkem před jejich mletím zvýšilo křehkost, snížilo lepivost a umožnilo vytvoření zejména

menších velikostních frakcí. Pro polymer HDPE nebyl tento postup dostatečný, takže byly namleté částice získány na kulovém mlýnu 6775 Freezer/Mill®, který byl poskytnut panem doktorem Ing. Hynkem Benešem, Ph.D. z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR. HDPE byl namletý během dvouhodinového programu s pěti mlecími cykly a funkcemi předchlazení přístroje tekutým dusíkem a chlazení plastů během mletí.

Namleté heterogenní směsi mikroplastů byly odděleny mokrým síťováním na jednotlivé velikostní frakce: <1; 1–5; 5–10; 10–20; 20–40; 40–60; 60–100; 100–150; 150–300; >300 μm pomocí soustavy filtračních sít na buňky (PluriSelect, Německo) a nosného média ethanolu. Ten je chemicky inertní vůči všem testovaným polymerům a díky jeho schopnosti smáčet plasty zabraňoval shluku částic během síťování.

Do 40ml skleněných vial byly odsypány heterogenní směsi daného polymeru a smíchány v objemovém poměru 1:9 s ethanolem. Tyto suspenze byly promíchávány a následně přesáty přes soustavu filtračních sít podtlakem. Vrstvy částic na sítích byly průběžně promývány ethanolem, dokud nebyly prosety na nižší úrovně soustavy. Vzniklé frakce byly kontrolovány kalibrovaným optickým mikroskopem a v případě dále přečišťovány, dokud nevymizely částice o nežádoucích velikostech. Z výsledných frakcí byl přebytečný ethanol odpařen při pokojové teplotě v digestoři.

Pro využití částic do dalších experimentů byly ze suchých frakcí mikroplastů menších než 100 μm připraveny zásobní suspenze o koncentraci 1 mg/ml v ethanolu a uchovány při 4 °C.

Za účelem vytvoření referenčních spekter byly využity i stárnuté mikroplasty: LDPE, PVC, PET a PUR. Polymery LDPE, PVC a PET mleté na centrifugačním mlýnu z pořízených granulátů o velikostech < 300 μm , byly různě stárnuté na Ústavu makromolekulární chemie pod vedením Ing. Hynka Beneše, Ph.D. Příprava prvního typu stárnutých mikroplastů trvala 120 dní a zahrnovala termooxidační stárnutí při 60 °C, který simuloval bohužel neznámý čas v přírodních podmínkách. Druhý typ stárnutí probíhal 28 dnů v meteorologické komoře Atlas Ci 3000+ Weather-Ometer (Atlas, USA), která simulovala degradaci mikroplastů přibližně 5 měsíců v přírodních podmínkách. V komoře byly mikroplasty urychleně degradovány během střídavých fází suchých světelných (102 minut, záření xenonové výbojky o vlnové délce 295–800 nm s intenzitou 0,5 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ při 340 nm) a temných vlhkých podmínek (fáze se skrácením 18 minut s 60% vlhkostí). Posledním stárnutým a nestárnutým polymerem byly částice PUR a Bio PUR, který mi byly poskytnuty kolegy z Mikrobiologického ústavu Akademie věd ČR. Tyto polymery byly vytvořeny ve spolupráci s panem doktorem Ing.

Hynkem Benešem, Ph.D. z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR a stárnuté verze polymeru simulovali zhruba 6 měsíců v přírodních podmínkách.

5.5 Fluorescenční barvení mikroplastů

5.5.1 Protokol barvení Nilskou červení

Všechny testované mikroplasty a reálné vzorky kalu byly barveny dle stejného protokolu, a to ve skleněných vialkách s 15 ml barvicího média obsahujícího fluorescenční barvivo NČ (10 µg/ml), 20% ethanol, 1% aceton a dH₂O. Vzorky byly nejprve přehřátý při 60 °C po dobu 30 minut, poté byly vzorky barveny dalších 30 minut stále při 60 °C v peci, následně byly ponechány ve tmě temperovat na pokojovou teplotu. Po temperaci byly filtrovány (5.2.1) přes filtry z nerezové oceli (porozita 1 µm).

5.5.2 Detekce na fluorescenčním mikroskopu

K analýze fluorescence mikroplastů po nabarvení NČ byl využit fluorescenční mikroskop OV 100 (Olympus). Fluorescence částic byla pozorována u několika vybraných velikostních frakcí (5–60; 60–300 µm) polymerů HDPE, LDPE, PET, PVC, PP a PS. Mikroplasty byly foceny s přiblížením 4x. Poté proběhla optimalizace detekce fluorescence tak, aby všechny testované polymery viditelně fluoreskovaly za stejně nastavených podmínek. Excitační světlo bylo výsledně nastaveno na 460–490 nm podle nejintenzivnější svítivosti mikroplastů, emisní světlo bylo detekováno v zelené oblasti viditelného spektra. Doba expozice byla 50 ms, případně nižší (dle intenzity fluorescence). Další parametry byly nastaveny tak, aby byla zachována svítivost částic mikroplastů a zároveň byla minimalizována svítivost nečistot a pozadí.

5.6 Optimalizace flotace

Pro optimalizaci flotačního kroku byl vybrán nasycený roztok NaI (1,8 g/cm³), který byl ideálním flotačním činidlem i pro nejhustší druhy polymerů. Flotace proběhla urychleně centrifugací v centrifuze Medifriger BL (JP Selecta). Zvoleným polymerem pro flotační experimenty byl polymer PET kvůli své vysoké hustotě (1,38 g/cm³).

5.6.1 Optimalizace flotace s částicemi PET

V tomto experimentu byly pro zjištění výtěžnosti kroku flotace testovány dvě velikostní frakce PET částic (Tabulka č.2). K nim byly provedeny kontroly se známým množstvím částic (100 % částic), které byly zpracovány separátně bez flotačního kroku – byly rovnou nabarveny

NČ dle protokolu a přefiltrovány. Negativní kontroly (bez mikroplastů) byly zpracovány paralelně s ostatními vzorky experimentu, u kterých flotace proběhla. Výsledná výtěžnost byla korigována o počet fluoreskujících částic v negativních kontrolách. Všechny typy vzorků byly testovány ve čtyřech paralelách (Tabulka č.2).

Tabulka č.2 Schéma flotačního experimentu s polymerem PET

Vzorek	Velikost PET částic [μm]	Hmotnost PET částic na vzorek [μg]	Počet paralel
PET – Kontrola (100 %)	20–40	1,25	4
PET – Flotace	20–40	1,25	4
Negativní kontrola	/	0	4
PET – Kontrola (100 %)	150–300	500	4
PET – Flotace	150–300	500	4
Negativní kontrola	/	0	4

Pro optimalizaci flotace PET částic o velikostech 20–40 μm byl využit zásobní roztok polymeru 25 μg/ml v ethanolu, ze kterého bylo pipetováno 50 μl do centrifugačních zkumavek. Částice z frakce 150–300 μm byly naváženy rovnou do centrifugačních zkumavek s přesností na 0,0001 g. Do dvou negativních kontrol bylo přidáno 50 μl čistého ethanolu, do dvou nebylo přidáno nic. Poté byl ke vzorkům přidán nasycený roztok NaI a vzorky byly vortexovány. Následně byly centrifugovány v centrifuze Medifriger BL (1h, 4000 g, 27 °C). Po skončení centrifugace byla vrchní vrstva s flotovanými částicemi (supernatant) sbírána opatrným odlitím spolu se zhruba polovinou objemu NaI ve zkumavkách. Vzorky byly opět vortexovány, NaI byl doplněn a postup centrifugace byl ještě dvakrát zopakován. Získaný supernatant obsahující mikroplasty byl přefiltrován, aby byl odstraněn roztok NaI. Obsah vzorků na filtrech byl přenesen do nové vialky oplachem 15 ml 20% ethanolu. Následně byly vzorky nabarveny NČ a přefiltrovány. Filtry se vzorky byly umístěny na mikroskopická sklíčka a uchovávány v temnu až do provedení fluorescenční analýzy (max. 4 dny). Vzorky s vyflotovanými mikroplasty byly dále kvantitativně analyzovány pomocí fluorescenčního mikroskopu (5.5.2). Fluoreskující částice z pořízených snímků byly spočítány manuálně s pomocí programu ImageJ2. Částice, které vykazovaly velikost v rámci rozmezí testované frakce a slabě šedou až bílou barvu na černém pozadí snímků, byly započítány mezi fluoreskující mikroplasty.

5.6.2 Optimalizace flotace s částicemi PET a ultrazvukem

Na základě nedostatečné výtěžnosti flotace s PET částicemi o velikostech 20–40 μm (Obrázek č. 5) byl postup pozměněn pro dosažení vyšší výtěžnosti. Nejprve byla zkoumána příčina, poté byl do metodiky přidán proces ultrazvukování filtru po filtraci vzorků od roztoku supernatantu s NaI, který měl za účel pomoci uvolnit zachycené částice z tkaniny filtru.

Příčina nulové výtěžnosti flotace byla zkoumána experimentem oplachování částic z filtru po jejich filtraci od nasyceného roztoku NaI. Samostatný vzorek s částicemi PET (20–40 μm) byl nabarven NČ a přefiltrován na filtr. Poté byla plocha filtru opláchnuta 15 ml 20% ethanolu stejně jako v prvotním flotačním pokusu (5.6.1) do nové vialky. Původní filtr byl uschován, obsah vialky byl přefiltrován na nový filtr. Částice na obou filtrech byly detekovány na fluorescenčním mikroskopu. Podle výsledků (Obrázek č. 5) byl testován nový způsob kvantitativního přenosu částic z filtru do 20% ethanolu pomocí ultrazvukování (

Tabulka č. 3). Vzorky s částicemi o velikostech 20–40 μm v roztoku NaI byly nejprve přefiltrovány na filtr a poté i s ním ponořeny do 5 ml 20% ethanolu. Filtr byl ultrazvukován 5 minut a poté byl vyjmut a do stejné zkumavky opláchnut 10 ml 20% ethanolu. Poté byly vzorky barveny NČ i s připravenými kontrolami se 100 % částic, přefiltrovány a detekovány na fluorescenčním mikroskopu.

Experiment pro výtěžnost flotace s částicemi PET o velikosti 20–40 μm byl zopakován dle předchozího (5.6.1) s výjimkou přidání kroku s ultrazvukem. Experiment byl proveden v paralelách a obsahoval opět jak kontrolní vzorky se 100 % částic, tak i negativní kontroly (Tabulka č. 4). Pro upřesnění příčin dalších ztrát částic během flotace byly zbylé sedimenty (vzorky neobsahovaly pevnou matici, pouze NaI a mikroplasty) testovaných vzorků po flotaci zachovány. Jelikož polymer PET bylo možné nabarvit NČ i v přítomnosti NaI, sedimenty testovaných vzorků byly přeneseny do skleněných zkumavek, byl k nim přidán ethanol (výsledný obsah 20 %) a byly obarveny NČ dle protokolu, přefiltrovány na filtr a detekovány na fluorescenčním mikroskopu.

Tabulka č. 3 Schéma experimentu ověření účinnosti kvantitativního přenosu částic PET o velikostech 20–40 μm z nerezového filtru o porozitě 1 μm.

Vzorek	Velikost PET částic [μm]	Hmotnost PET částic na vzorek [μg]	Počet paralel
PET – Kontrola (100 %)	20–40	1,25	3
PET – Opláchnutý filtr	20–40	}1,25	1
PET – Obsah oplachu filtru	20–40		1
PET – Výtěžnost přenosu částic z filtru po ultrazvuku	20–40	1,25	3

Tabulka č. 4 Schéma experimentu optimalizované flotace částic PET o velikostech 20–40 μm s přidáním krokem ultrazvuku.

Vzorek	Velikost PET částic [μm]	Hmotnost PET částic na vzorek [μg]	Počet paralel
PET – Kontrola (100 %)	20–40	1,25	4
PET – Flotace s ultrazvukem filtru	20–40	1,25	4
Negativní kontrola	/	0	4
Sediment po flotaci	20–40	/	4

5.7 Výtěžnost celé metodiky

Pro následující experiment výtěžnosti celé metodiky byl vybrán polymer HDPE ($\rho = 0,93 - 0,97 \text{ g/cm}^3$), který je jedním z celosvětově nejrozšířenějších polymerů (Plastics Europe, 2023). Ten byl testován ve dvou velikostních frakcích: 20–40 a 150–300 μm. Pro simulaci reálných podmínek extrakce částic z kalu byl HDPE vnesen do předem připraveného slepého vzorku matrice, tedy čistírenského kalu, u kterého byla provedena homogenizace, digesce a flotace, přičemž za slepý vzorek matrice byla označena ta část kalu, která při flotačním kroku zůstala v sedimentu. Takto připravený vzorek kalu byl tedy potenciálně zbavený mikroplastů. V rámci pokusu byly vytvořeny kontroly se 100 % částic, které byly zpracovány separátně – barveny NČ a přefiltrovány. Negativní kontroly (bez matrice a bez přidáných mikroplastů) a vzorky matrice bez mikroplastů s uměle přidávanými HDPE

částicemi byly zpracovány paralelně s ostatními vzorky experimentu, u kterých proběhl celý postup.

5.7.1 Příprava slepých vzorků matrice

Pro tento experiment byl využity dostupné kaly z čistíren odpadních vod v ČR. Kaly byly nejprve lyofilizovány a homogenizovány ve třecích miskách. Poté byly separátně rozděleny na nominální frakce A: <63 μm a frakce B: 63 μm –1 mm, suchým síťováním přes soustavu nerezových sít (Retsch), dokud se jednotlivé frakce viditelně nepřestaly prosévat na nižší úroveň. Z každého přesítovaného kalu bylo odváženo přibližně přesně 0,1000 g a stejné nominální frakce byly smíchány dohromady (obě na množství 1 g). Směsné frakce kalu A i B byly podrobeny digesci Fentonovým činidlem dle následujícího schématu (Tabulka č. 5).

Tabulka č. 5 Schéma postupu při oxidaci 1 g nominálních frakcí kalů A i B.

Čas reakce [min]	Objem přidaného roztoku iontů Fe^{2+} [ml]	Objem přidaného 30% H_2O_2 [ml]
0	8	8
15	8	8
30	/	16
45	/	16
60	/	16
240	Zastavení reakce	

Reakce probíhala celkem 4 hodiny v teplé vodní lázni při 60 °C a byla zastavena filtrací vzorků. Obsah přefiltrovaných vzorků byl seškrábán z filtrů a vložen do centrifugačních zkumavek i s nasyceným roztokem NaI. Vzorky byly homogenizovány za použití vortexu a ultrazvuku po dobu 1 minuty. Poté byl obsah flotován během hodinové centrifugace při 4000 g a 27 °C. Po skončení byla vrchní vrstva flotovaných částic opatrně odlita spolu se zhruba polovinou objemu NaI ve zkumavkách. Vzorky byly opět vortexovány, NaI byl doplněn do zkumavek a postup flotace centrifugací ještě dvakrát zopakován. Po poslední flotaci byla spodní vrstva nevyflotované části kalu po částech přefiltrována (5.2.1) a následně vysušena při 30 °C v peci do konstantního hmotnosti. Jednotlivé části byly po vysušení smíchány a homogenizovány

třením opět do sypké formy. Takto připravené směsné vzorky byly označeny jako Slepý vzorek matrice A a Slepý vzorek matrice B.

5.7.2 Celková výtěžnost metodiky

Připravené slepé vzorky matrice byly odváženy po přibližně přesně 25,0 mg do zkumavek a tyto vzorky byly uměle kontaminovány známým množstvím mikroplastů z HDPE polymeru (

Tabulka č. 6). Mikroplasty obou velikostních frakcí (20–40 μm a 150–300 μm) byly pipetovány ze zásobních roztoků v ethanolu, do samotných slepých vzorků matrice a negativních kontrol bylo pipetováno příslušné množství ethanolu. Zkumavky byly vloženy do pece při 30 °C, aby došlo k odpaření ethanolu. Poté byly vzorky podrobeny digesci Fentonovým činidlem za stejných podmínek jako při tvorbě slepých vzorků matrice (Tabulka č. 5), pouze s tou výjimkou, že bylo použito dvacetinové množství činidel a roztoků. Reakce byla zastavena filtrací vzorků a poté byly filtry vloženy do centrifugačních zkumavek. NaI byl přidán tak, aby byl filtr ponořený, a vzorky byly ultrazvukovány 5 minut. Poté byl filtr vyjmut a opláchnut cca 7 ml NaI. Vzorky byly třikrát centrifugovány po hodinových intervalech při 4000 g a 27 °C (5.6.1). Po flotaci byl supernatant přefiltrován a částice na filtru byly ultrazvukovány 5 minut ve 20% ethanolu, poté byl filtr vyjmut a opláchnut. Vzorky byly obarveny NČ a přefiltrovány na 1 μm filtr z nerezové oceli.

Snímky částic ve vzorcích byly pořízeny na fluorescenčním mikroskopu za stejných podmínek jako při pokusech v kapitolách 5.6.

Tabulka č. 6 Schéma pokusu výtěžnosti celkové metodiky při použití různých velikostních frakcí HDPE a připravených slepých vzorků matrice.

Vzorky	Nominální velikost částic v matrici [μm]	Velikost částic HDPE [μm]	Hmotnost HDPE ve vzorku [μg]	Počet paralel
HDPE – Kontrola (100 %)	/	20–40	2,5	4
HDPE plus slepý vzorek matrice A	<63	20–40	2,5	3
Slepý vzorek matrice A	<63	/	/	3
Negativní kontrola	/	/	/	4
HDPE – Kontrola (100 %)	/	150–300	200	4
HDPE plus slepý vzorek matrice B	1000–63	150–300	200	3
Slepý vzorek matrice B	1000–63	/	/	3
Negativní kontrola	/	/	/	4

5.8 Optimalizace detekce mikroplastů v kalech

Z hlediska nejmenší časové náročnosti byla pro kvantitativní analýzu extrahovaných částic zvolena fluorescenční mikroskopie. Pro ověření, zda-li budou mikroplasty fluoreskovat za stejných podmínek i v nabarveném kalu, byly přidány standardy mikroplastů do slepých vzorků matric kalů připravených dle kapitoly 5.7.1. Fluorescence mikroplastů byla testována s polymery HDPE; LDPE; PP; PS; PVC a PET ve směsi velikostních frakcí: 5–60 μm; 60–300 μm. Do slepých vzorků byla odvážena matrice s přesností 0,0001 g a do nich bylo přidáno nespécifické množství polymerů. Vzorky byly nabarveny NČ ve 20% lihu a přefiltrovány. Kromě standardů mikroplastů byly separátně nabarveny i další materiály a látky.

Pro provedení kvalitativní analýzy extrahovaných mikroplastů v kalech byl poskytnut infračervený spektroskop s Fourierovou transformací (FTIR; Nicolet iN10, Thermo Scientific) profesorem RNDr. Ivanem Němcem, Ph.D. z katedry anorganické chemie Univerzity Karlovy. Přístroj umožňuje identifikaci jednotlivých typů polymerů. Předtím, než se analyzovaly reálné vzorky, byly naměřeny absorpční spektra všech uměle vyrobených polymerů mikroplastů, jejich různých variant, včetně stárnutých polymerů a dalších materiálů (

Tabulka č. 7;

Tabulka č. 8). Všechna spektra byla použita jako referenční a byla naměřena na povrchu nerezového filtru s velikostí ok 1 μm za podmínek: reflektivní režim, doba měření 22 s, počet skenů 64, velikost apertury 30 x 30 μm nebo 100 x 100 μm . Kromě různých velikostí mikroplastů byly záměrně měřeny částice různých šířek, jejichž spektra reprezentovala různé varianty stejných látek.

Tabulka č. 7 Seznam měřených referenčních spekter částic polymerů a materiálů na infračerveném spektroskopu FTIR (Nicolet iN10, Thermo Scientific).

Polymer/materiál	Zdroj	Popis a tvar	Velikost
	mikroplastů		
Akryl	Nitě klubka	Žlutá vlákna z nití	Směs heterogenních velikostí
Celulóza	Viskózní látka	Světle modrá a černá vlákna	Směs heterogenních velikostí
	Bavlna	Bílá vlákna z laboratorního pláště	Směs heterogenních velikostí
	Bavlna	Bílá vlákna z vaty	Směs heterogenních velikostí
HDPE	HDPE granulát	Uměle vytvořené (mleté a přesívané), heterogenní tvary – fragmenty	Směs: 5–60 μm; 150–300 μm; >300 μm
Latex	Laboratorní rukavice	Bílé tenké fragmenty nastříhané z rukavic	Průměr fragmentů 0,1 mm
LDPE	LDPE granulát	Uměle vytvořené (mleté a přesívané), heterogenní tvary – fragmenty	Směs: 5–60 μm; 150–300 μm; >300 μm; 3–5 mm
	LDPE granulát	Uměle vytvořené (mleté a přesívané), termooxidačně stárnuté mikroplasty UV zářením při teplotě 60 °C 120 dní, heterogenní tvary – fragmenty	Směs: < 100 μm; směs: <1 mm
	LDPE granulát	Uměle vytvořené (mleté a přesívané), urychlené stárnutí mikroplastů za střídavých podmínek suché (UV světlo) a mokré fáze (temnostní, 60% vlhkost) 28 dní, heterogenní tvary – fragmenty	Směs: < 100 μm; směs: <1 mm
Nitril	Laboratorní rukavice	Modré tenké fragmenty nastříhané z rukavic	Průměr fragmentů 0,1 mm
PES	PET granulát	Uměle vytvořené (mleté a přesívané), heterogenní tvary – fragmenty	5–60 μm; 150–300 μm; >300 μm; 3–5 mm
	PET granulát	Uměle vytvořené (mleté a přesívané), termooxidačně stárnuté mikroplasty UV zářením při teplotě 60 °C 120 dní, heterogenní tvary – fragmenty	Směs: < 100 μm; směs: <1 mm
	PET granulát	Uměle vytvořené (mleté a přesívané), 28 denní urychlené stárnutí mikroplastů za střídavých podmínek suché (UV světlo) a	Směs: < 100 μm; směs: <1 mm

		mokrý fáze (temnotní, 60% vlhkost), heterogenní tvary – fragmenty	
	PES látka	Sametová, fialová vlákna	Směs heterogenních velikostí
	Šicí nitě	Černé a bílé šicí nitě	Průměr nitě 0,3 mm
	PES látka	Černá vlákna z nepromokavé látky	Směs heterogenních velikostí
Polyamid	Punčocháče	Běžová vlákna z látky	Směs heterogenních velikostí
	Vlasec	Bílo transparentní, pevný	Průměr vlasce 0,25 mm
PP	PP granulát	Uměle vytvořené (mleté a přesívané), heterogenní tvary – fragmenty	5–60 µm; 150–300 µm; >300 µm; 3–5 mm
PS	PS granulát	Uměle vytvořené (mleté a přesívané), heterogenní tvary – fragmenty	5–60 µm; 150–300 µm; >300 µm; 3–5 mm
PUR	Polyuretanová pěna	Uměle vytvořené, termooxidačně stárnuté mikroplasty UV zářením při teplotě 60 °C a 5% vlhkostí, 120 dní, heterogenní tvary – fragmenty	<100 µm; <1 mm
	Polyuretanová pěna	Uměle vytvořené, heterogenní tvary – fragmenty	100 µm; <1 mm
	Bio PUR	Uměle vytvořené, termooxidačně stárnuté mikroplasty UV zářením při teplotě 60 °C a 5% vlhkostí, 120 dní,	Směs: < 100 µm; směs: <1 mm
	Bio PUR	Uměle vytvořené, heterogenní tvary – fragmenty	Směs: < 100 µm; směs: <1 mm
PVC	PVC deska	Uměle vytvořené (mleté a přesívané), heterogenní tvary – fragmenty	5–60 µm; 150–300 µm; >300 µm; 3–5 mm
	PVC deska	Uměle vytvořené (mleté a přesívané), termooxidačně stárnuté mikroplasty UV zářením při teplotě 60 °C 120 dní, heterogenní tvary – fragmenty	Směs: < 100 µm; směs: <1 mm
	PVC deska	Uměle vytvořené (mleté a přesívané), urychlené stárnutí mikroplastů za střídavých podmínek suché (UV světlo) a mokré fáze (temnotní, 60% vlhkost) 28 dní , heterogenní tvary – fragmenty	Směs: < 100 µm; směs: <1 mm

Tabulka č. 8 Seznam měřených referenčních spekter směsí materiálů na infračerveném spektroskopu FTIR (Nicolet iN10, Thermo Scientific).

Směsi materiálů	Zdroj mikroplastů	Popis a tvar	Velikost
Bambus 95% a elastan 5%	Bambusový úplet	Směs tkanin, černá a modrobílá vlákna	Směs heterogenních velikostí
Polyamid 85% a elastan 15%	Fitness látka	Směs tkanin, černá a modrá vlákna	Směs heterogenních velikostí
PES 95% a elastan 5%	Polyesterový úplet	Směs tkanin, stříbrná vlákna	Směs heterogenních velikostí
PES, PUR a nylon	Softshellová látka	Směs tkanin, bílá, černá a zelená vlákna	Směs heterogenních velikostí

5.9 Detekce mikroplastů v reálných vzorcích čistírenských kalů

Pro detekci mikroplastů v reálných vzorcích byly vybrány dva čistírenské kaly původem z anonymních čistíren odpadních vod (ČOV) České republiky označené čísly 4 a 5. Byly odebrány po stabilizaci a odvodnění z kalového hospodářství v září roku 2021 do skleněných lahví v množství okolo 150,0 g (Tabulka č. 9). Následný popis postupu přípravy kalů a extrakce mikroplastů i s detekcí je zde orientační, detailní protokol celého postupu je k dispozici v příloze č. 2.

Tabulka č. 9 Informace o čistírnách odpadních vod z ČR, ze kterých byly pořízeny vzorky kalů k analýze mikroplastů. EO – ekvivalentní počet obyvatel.

Analyzovaný vzorek	Velikost ČOV [EO]	Metoda stabilizace kalu	Metoda odvodnění a využití kalu	Množství sušiny odebraného kalu [g]
Kal 4	10 000 - 40 000	Anaerobní: fermentační reaktor	Strojní odvodnění pro další využití: místní deponie, plynojem, energetické využití, zemědělské využití	146,1
Kal 5	100 000 - 500 000	Anaerobní: termická hydrolýza	Strojní odvodnění pro další využití: plynojem, energetické využití, zemědělské využití (kompostárny)	152,2

Vzorky kalů 4 a 5 byly lyofilizovány a homogenizovány ve třecích miskách. Poté z nich bylo odebráno homogenní množství 5 g, které bylo podrobena suchému sítování na nominální frakce A: $< 63 \mu\text{m}$ a B: $63 \mu\text{m} - 1 \text{mm}$, přes soustavu nerezových sít (Retsch). Vybraná velikostní hranice $63 \mu\text{m}$ byla zvolena dle Wentworth (1922) vzhledem k jejímu běžnému použití v enviromentální praxi pro oddělení jemnějších frakcí (jílů a prachu) od hrubších frakcí (písku). Ze všech nominálních frakcí přesátých kalů bylo odváženo přibližně přesně po 0,0500 g v triplikátech, k tomu byly vytvořeny i tři negativní kontroly bez matrice. Kaly byly podrobeny oxidaci Fentonovým činidlem, aby v nich byl redukován obsah organické hmoty. Poté byly přefiltrovány od přebytečných činidel na filtr a kvantitativně přeneseny s pomocí ultrazvuku filtru do nasyceného roztoku NaI. V nasyceném roztoku byly kaly hustotně rozděleny, proces flotace probíhal v centrifuze 1 hodinu a byl opakován třikrát. Na konci byl supernatant obsahující mikropasty zbaven NaI filtrací. Částice zachycené na filtrech byly kvantitativně přeneseny s pomocí ultrazvuku do 20% ethanolu. Každý vzorek kalu byl kvantitativně naředěn podle potřeby (15–30x) a fluorescenčně obarven ve 20% ethanolu NČ v koncentraci $10 \mu\text{g/ml}$. Po nabarvení byly vzorky přefiltrovány na $1 \mu\text{m}$ filtr, který byl vložen do nerezových držáků vyrobených na míru na Ústavu Akademie věd v Krči.

Vzorky kalů v nerezových držácích byly kvantitativně analyzovány na fluorescenčním mikroskopu (Olympus OV 100) a fluoreskující částice (velikostní limit detekce: $25 \mu\text{m}$) byly nafoceny objektivy s přiblížením 0,56x a 4x a spočteny manuálně z celé plochy filtru s pomocí programu ImageJ2. Kvalitativní analýza byla zprostředkována analýzou FTIR spekter jednotlivých částic. Poměrná část (50–70 částic/vzorek) náhodně vybraných fluoreskujících částic ze snímků fluorescenčního mikroskopu o minimální velikosti $25 \mu\text{m}$ (limit detekce FTIR) byla analyzována manuálně prostřednictvím FTIR. Spektra z FTIR byla identifikována porovnáním s volně dostupnou knihovnou spekter siMPLe obohacenou o vlastní standardy mikroplastů, vláken a dalších materiálů (

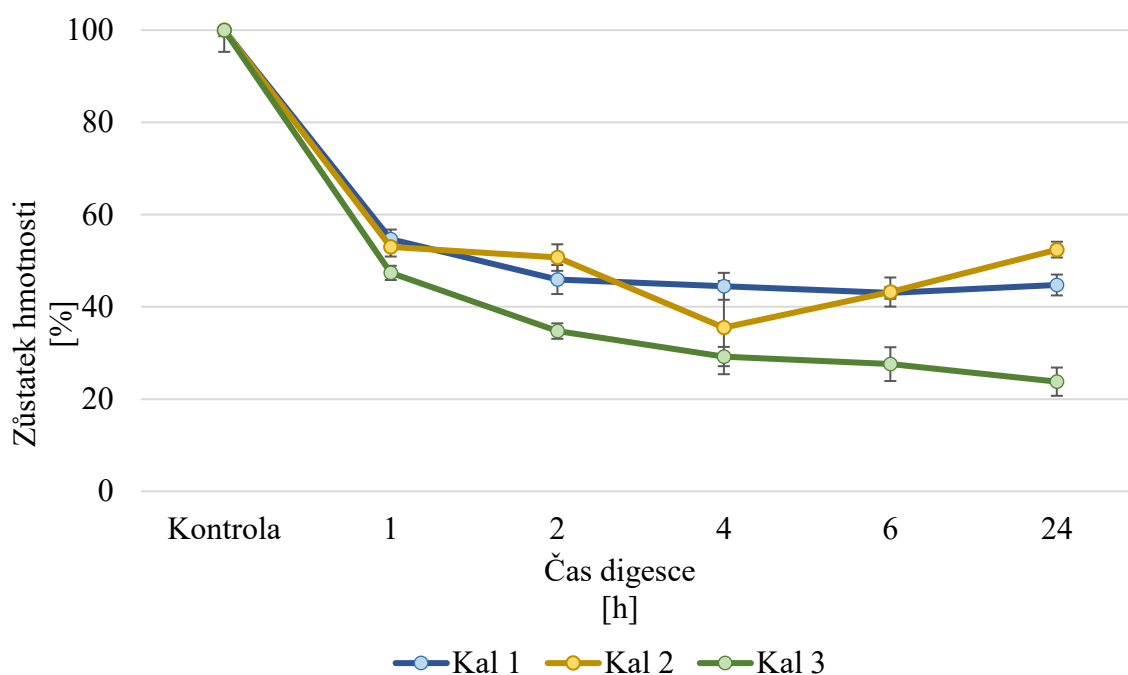
Tabulka č. 7;

Tabulka č. 8). U výsledných počtů částic na g sušiny vzorku kalu byla provedena korekce odečtením průměrného množství částic v negativních kontrolách. Zároveň s tím byl pro výpočet počtu mikroplastů na g sušiny vzorku kalu, celkový počet částic byl vynásoben poměrem fluoreskujících částic/fluoreskujících mikroplastů. Dále bylo z dat vyhodnoceno procentuální zastoupení polymerů v kalech a procentuální tvarová odlišnost mikroplastů: fragment či vlákno. Ačkoli jsou v literatuře používány i další typy částic, jako jsou pěny nebo filmy (Lozano et al., 2021), jejich podrobná charakterizace nebyla ve většině případů v této práci proveditelná vzhledem k malé velikosti částic. V souladu s definicí Evropské agentury pro chemické látky byly částice klasifikovány jako vlákna, pokud měly poměr délky k šířce částice větší než 3 (Geoffroy et al., 2020). Ostatní částice mikroplastů, jež nespádaly do definice vláken, byly v rámci této práce považovány za fragmenty.

6. Výsledky

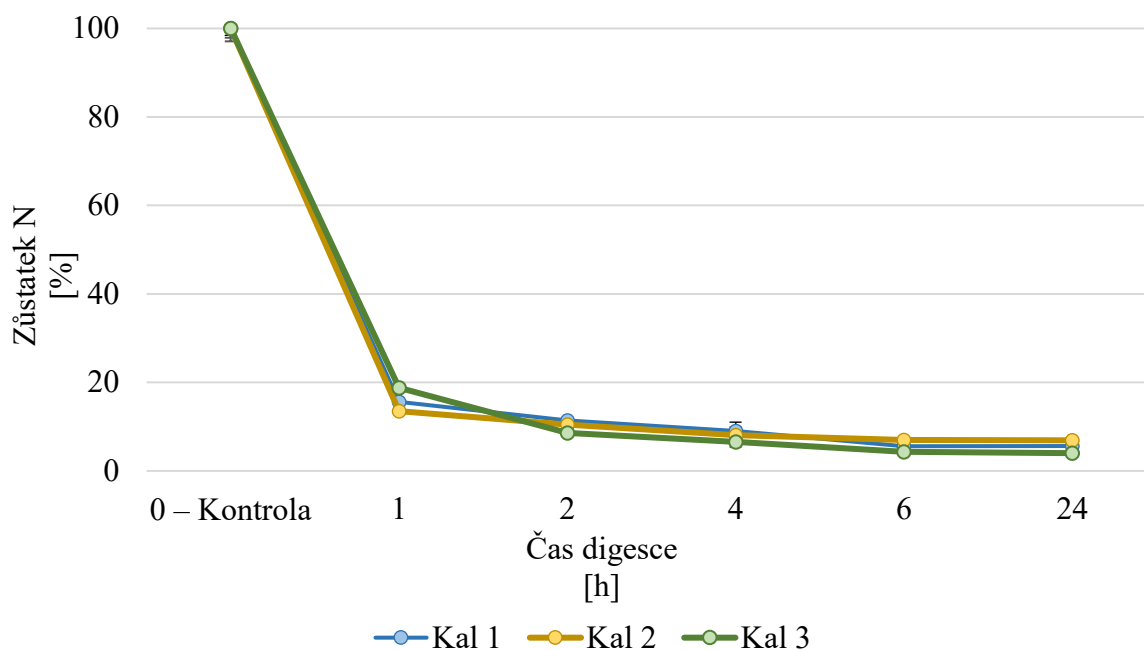
6.1 Výsledky optimalizace digesce

Ve všech kalech byl pozorován úbytek hmotnosti v čase (Obrázek č. 1). Již po uplynutí první hodiny digesce došlo k 40–50% úbytku hmotnosti všech kalů. Úbytek v čase se dále zvyšoval a nejvyšší byl zaznamenán u kalu 3, kde celková hmotnost poklesla o 76 % po 24 h reakce. Nejmenší úbytek byl naopak vypořizován u kalu 2, kde celková hmotnost vzorku byla redukována pouze o 48 % za 24 h.



Obrázek č. 1 Průběh změny hmotnosti kalů 1, 2 a 3 působením digesce Fentonovým činidlem v časech reakce 1, 2, 4, 6 a 24 hodin. Výsledky jsou uvedeny formou průměrů se směrodatnými odchylkami. Kontrola reprezentuje změnu hmotnosti kalů, u nichž digesce byla simulována bez přidání Fentonova činidla.

Úbytek celkového dusíku, který reprezentuje úbytek organické hmoty v kalech, byl také pozorován v průběhu experimentu (Obrázek č. 2). Nejvýraznější úbytek nastal již po 1. hodině digesce, kdy bylo redukováno 81–87 % celkového dusíku ve všech kalech. Obsah dusíku však stále klesal a nejnižší podíl celkového N po 24 hodinách reakce byl pozorován u kalu 2 a činil 93 %, nejvyšší zase u kalu 3 s úbytkem N o 97 %.



Obrázek č. 2 Průběh změny obsahu celkového N v kalech 1, 2 a 3 působením digesce Fentonovým činidlem v časech reakce 1, 2, 4, 6, a 24 hodin. Výsledky jsou uvedeny formou průměrů se směrodatnými odchylkami. Kontrola reprezentuje změnu obsahu celkového N v kalech, u nichž digesce byla simulována bez přidání Fentonova činidla.

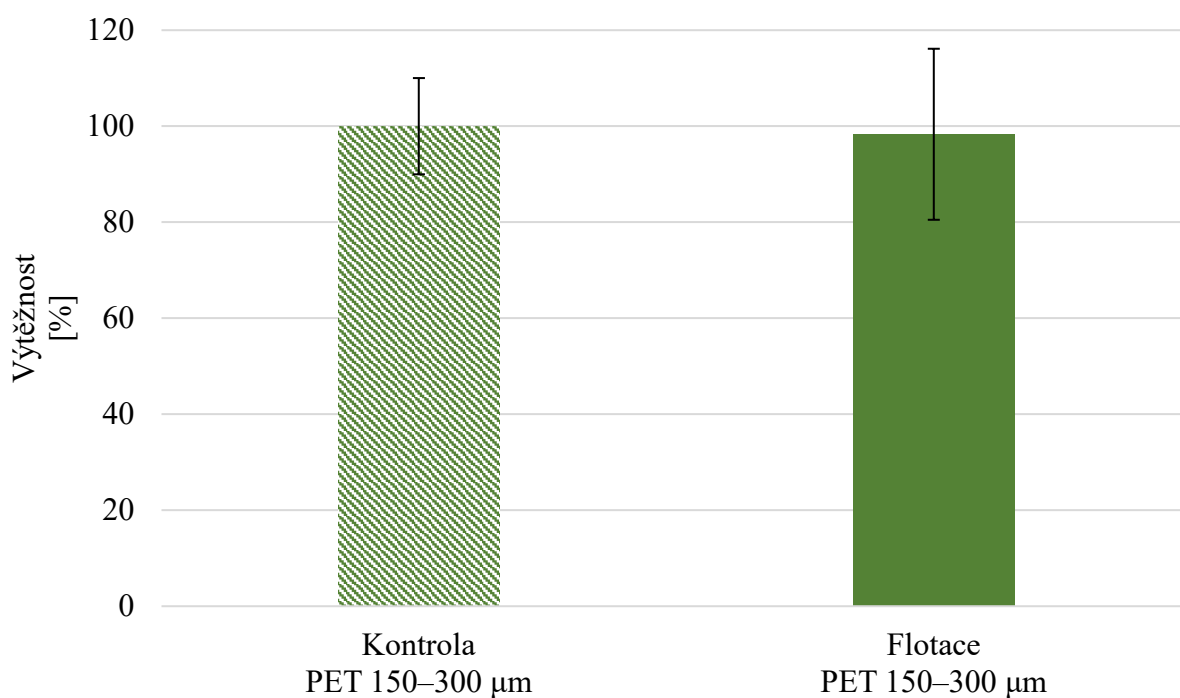
Tímto experimentem nebyla zamítnuta první hypotéza, která zněla, digesce Fentonovým činidlem odstraní většinu organické hmoty v kalech do 24 hodin reakce navzdory vysokému obsahu organických látek.

6.2 Výsledky fluorescenčního barvení mikroplastů

Intenzita fluorescence mikroplastů nabarvených NČ se lišila v závislosti na typu polymeru (příloha č. 1). Nejvyšší intenzitu fluorescence vykazovaly částice PET, HDPE a PS. Na povrchu částic polymerů PET a HDPE byla barva vždy distribuována rovnoměrně, zatímco u PS docházelo náhodně k výraznému zbarvení některých částic, což způsobilo přesycení detektoru a znemožňovalo přesné určení jejich skutečných velikostí. Nejslabší fluorescence byla zaznamenána u PVC v porovnání s ostatními polymery. U LDPE bylo z fotografií patrné, že NČ také nebyla rovnoměrně distribuovaná na povrchu částic.

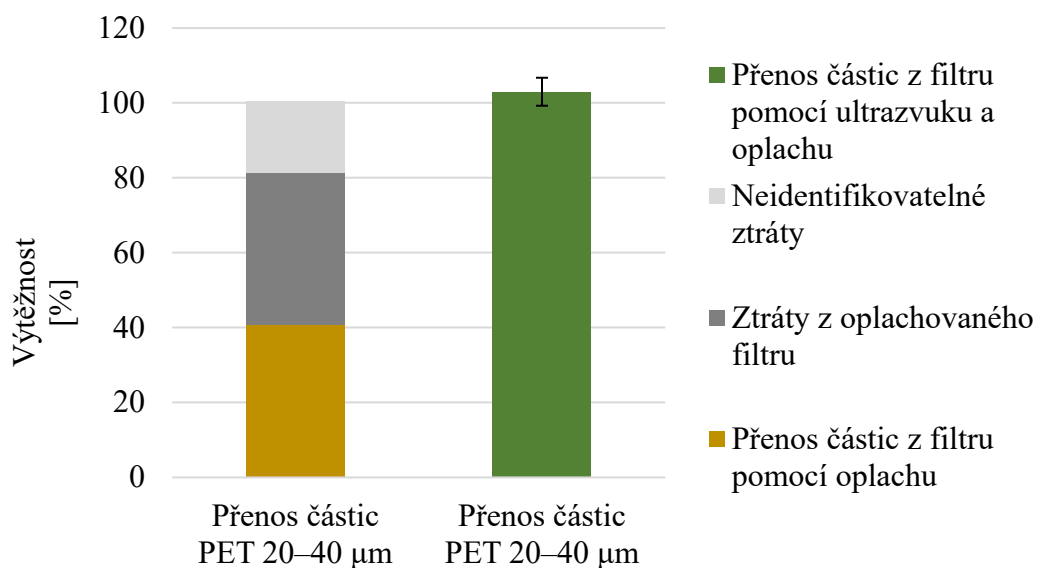
6.3 Výsledky optimalizace flotace

Testování flotace mikroplastů v nasyceném roztoku NaI bylo provedeno na částicích PET ve dvou různých velikostních frakcích. Výsledky se pro velikostní frakce lišily. Výťažnost flotace PET částic o velikostech 150–300 μm dosáhla hodnot až $98 \pm 18 \%$ (182 ± 18 částic oproti kontrole se 179 ± 32 částicemi) (Obrázek č. 3).



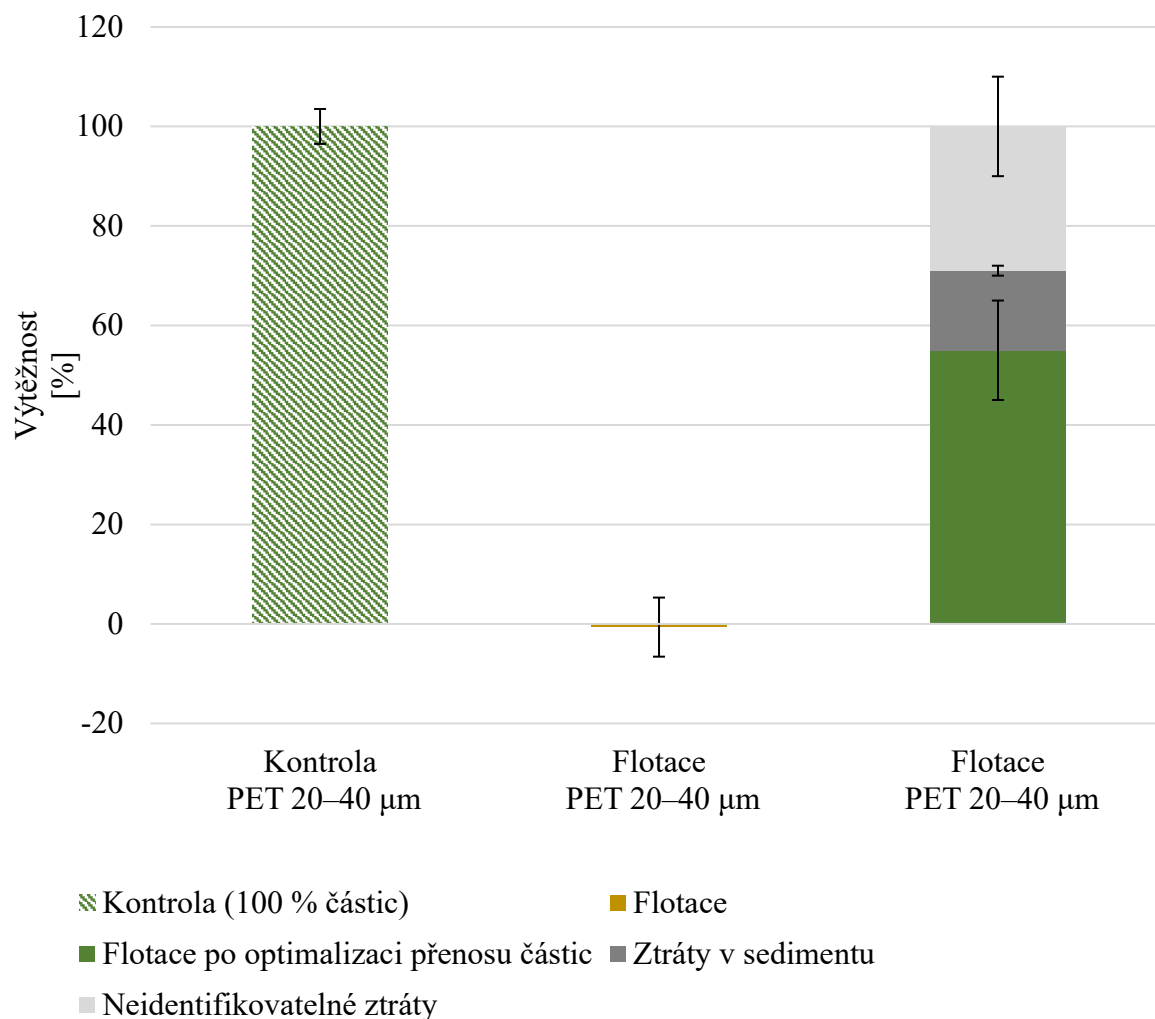
Obrázek č. 3 Průměrná procentuální výtěžnost flotace PET částic o velikostech 150–300 µm v nasyceném roztoku NaI původním postupem bez optimalizace přenosu částic z filtru pomocí ultrazvuku, vztaheno na původní počet částic v kontrolních vzorcích. Detekce částic pro kvantifikaci byla provedena za použití fluorescenčního obarvení a snímky částic byly pořizeny ve fluorescenčním mikroskopu a zpracovány manuálně v programu ImageJ2.

U částic menších o velikostech 20–40 µm byla výtěžnost $-1 \pm 6 \%$ -9 ± 86 částic oproti kontrole s 1441 ± 84 částicemi (Obrázek č. 5). Na základě negativních výsledků s menšími částicemi bylo zkoumáno, proč flotace s touto frakcí neměla dostatečnou výtěžnost. U jednoho vzorku byl analyzován samotný přenos částic z filtru pomocí oplachu, jehož výtěžnost činila přibližně 40 %. U zbylých 60% ztrát, 40 % z celkového počtu částic zůstalo na oplachovaném filtru a 20 % tvořily neidentifikovatelné ztráty (Obrázek č. 4). Tím bylo potvrzeno, že nedošlo ke kvantitativnímu přenosu částic z filtru během oplachu. Následně byl proces přenosu částic optimalizován. Byl zahrnut krok vložení filtru do ultrazvukové lázně před oplachem, což vedlo k navýšení výtěžnosti samotného přenosu částic na $103 \pm 4 \%$ (1424 ± 52 částic oproti kontrole se 1403 ± 49 částicemi).



Obrázek č. 4 Optimalizace přenosu částic PET o velikostech 20–40 µm po filtraci na 1 µm nerezový filtru. Výtěžnost přenosu částic samotným oplachem z původního postupu představuje první sloupec a druhý již optimalizovaný přenos částic po přidání kroku ultrazvuku filtru před jeho oplachem. Detekce částic pro kvantifikaci byla provedena za použití fluorescenčního obarvení a snímky částic byly pořízeny ve fluorescenčním mikroskopu a zpracovány manuálně v programu ImageJ2.

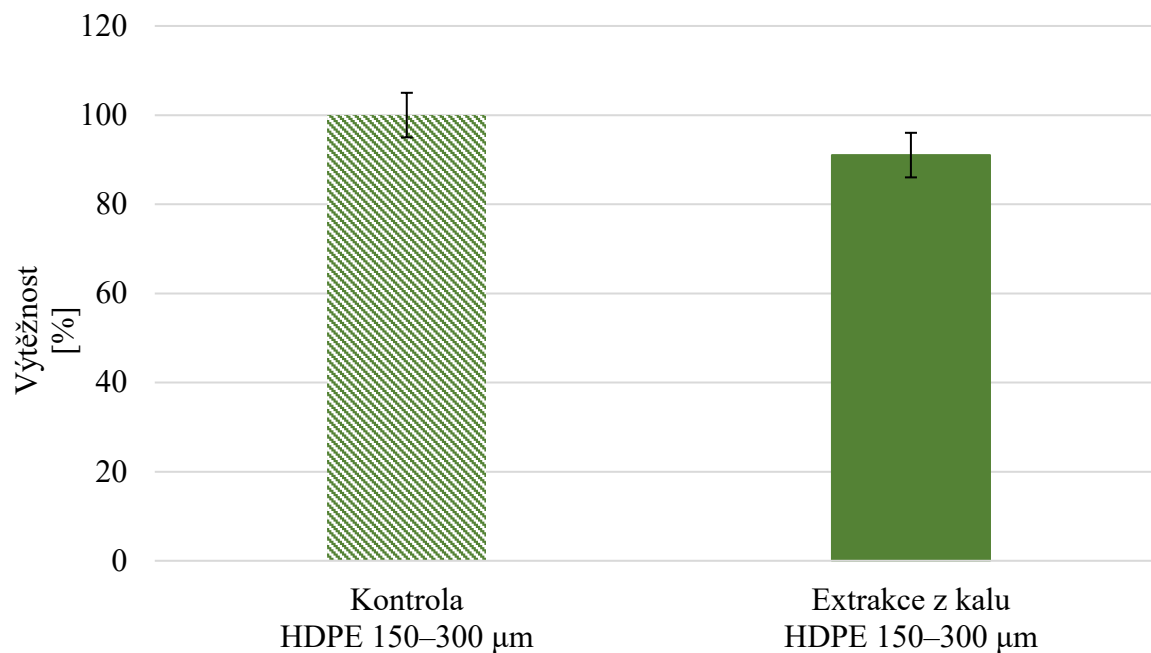
Nakonec byl zopakován celý flotační pokus s mikroplasty (PET; 20–40 µm), a to s přidáním kroku ultrazvukové lázně. Výtěžnost vyflotovaných částic byla zvýšena na $55 \pm 10 \%$ (772 ± 140 z 1403 ± 49 částic), z toho $16 \pm 1 \%$ částic zůstalo nevyflotováno v sedimentu a $29 \pm 10 \%$ představovaly neidentifikovatelné ztráty (Obrázek č. 5). Tímto výsledkem byla vyvrácena i druhá nulová hypotéza, která zněla, že malé částice polymeru PET o heterogenních tvarech a rozměru 20–40 µm neflotují v nasyceném roztoku NaI, ať už vlivem jejich malé velikosti, či z důvodu vysoké hustoty polymeru.



Obrázek č. 5 Procentuální výtěžnost flotace PET částic o velikostech 20–40 µm v nasyceném roztoku NaI před a po optimalizaci jejich přenosu z filtru. V prvním sloupci je kontrola (100 % částic), ve druhém výsledná výtěžnost flotace původním postupem bez optimalizace přenosu částic a poslední sloupec představuje výtěžnost flotace po optimalizaci přenosu včetně kroku s ultrazvukem a dále procentuální podíl příčin ztrát částic. Detekce částic pro kvantifikaci byla provedena za použití fluorescenčního obarvení a snímky částic byly pořízeny ve fluorescenčním mikroskopu a zpracovány manuálně v programu ImageJ2.

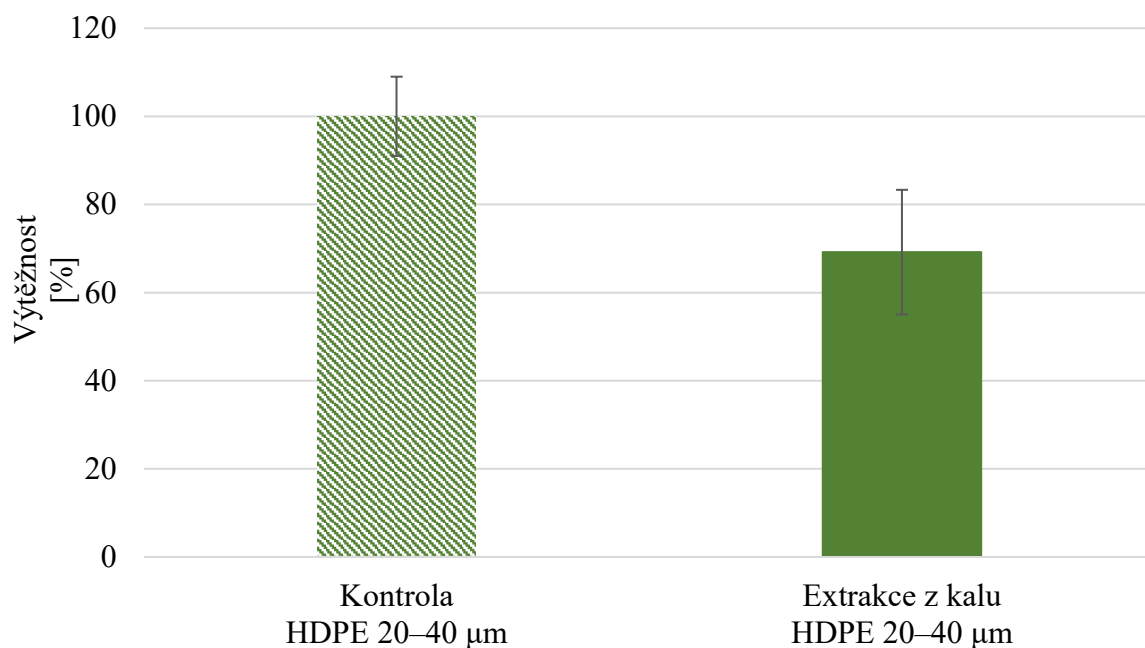
6.4 Výsledky výtěžnosti celé metodiky

Výtěžnost celé metodiky byla zjišťována extrakcí známého množství částic HDPE ve dvou různých velikostních frakcích z kalu uměle kontaminovaného mikroplasty (HDPE plus slepý vzorek matrice). Pro částice o větší velikostní frakci 150–300 µm byla výtěžnost extrakce $91 \pm 3 \%$, jelikož bylo identifikováno 194 ± 7 částic oproti kontrole s 214 ± 51 částicemi (Obrázek č. 6).



Obrázek č. 6 Průměrná procentuální výtěžnost celé metodiky extrakce HDPE částic o velikosti 150–300 µm z kalu uměle kontaminovaného mikroplasty. V prvním sloupci je kontrola (100 % částic), ve druhém výsledná výtěžnost extrakce. Detekce částic pro kvantifikaci byla provedena za použití fluorescenčního obarvení a snímky částic byly pořízeny ve fluorescenčním mikroskopu a zpracovány manuálně v programu ImageJ2.

Extrakce částic o velikostech 20–40 µm z kalu uměle kontaminovaného mikroplasty dosáhla hodnot 69 ± 16 %. Zde se podařilo extrahovat až 679 ± 139 částic oproti kontrole s 982 ± 88 částicemi (Obrázek č. 7). Těmito výsledky nebyla zamítnuta třetí hypotéza, která, zněla, že výtěžnost optimalizované metodiky extrakce částic HDPE z uměle kontaminovaného kalu bude dostatečná navzdory vlivu přítomné matrice.



Obrázek č. 7 Průměrná procentuální výtěžnost celé metodiky extrakce HDPE částic o velikosti 20–40 µm z kalu uměle kontaminovaného mikroplasty. V prvním sloupci je kontrola (100 % částic), ve druhém výsledná výtěžnost extrakce. Detekce částic pro kvantifikaci byla provedena za použití fluorescenčního obarvení a snímky částic byly pořizeny ve fluorescenčním mikroskopu a zpracovány manuálně v programu ImageJ2.

6.5 Výsledky extrakce mikroplastů z čistírenských kalů

Mikroplasty se podařilo extrahovat z čistírenských kalů a byla provedena kvalitativní a kvantitativní analýza. Dále byl stanoven i poměr zastoupených tvarů z detekovaných částic mikroplastů. Kvalitativní analýzou fluoreskujících částic za pomoci infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací bylo kvůli časové náročnosti ověřeno jen 19–46 % částic z celkového počtu fluoreskujících částic na filtru vzorků kalů. U kalu 4 A (nominální frakce <63 µm) zhruba 35 ± 1 % bylo identifikováno jako plast, zatímco u kalu 4 B (nominální frakce 63 µm–1mm) tento podíl byl 38 ± 7 % ze všech měřených částic na infračervené spektroskopii. U kalu 5 A (nominální frakce <63 µm) byl poměr vyšší a zhruba 62 ± 5 % tvořily plasty, u kalu 5 B (nominální frakce 63 µm–1mm) tento podíl tvořil 53 ± 3 %. U pozitivních kontrol bylo změřeno 56–78 % částic z celkového počtu fluoreskujících částic a poměr mezi fluoreskujícími částicemi/fluoreskujícími mikroplasty činil 48 ± 24 %.

6.5.1 Kvalitativní analýza

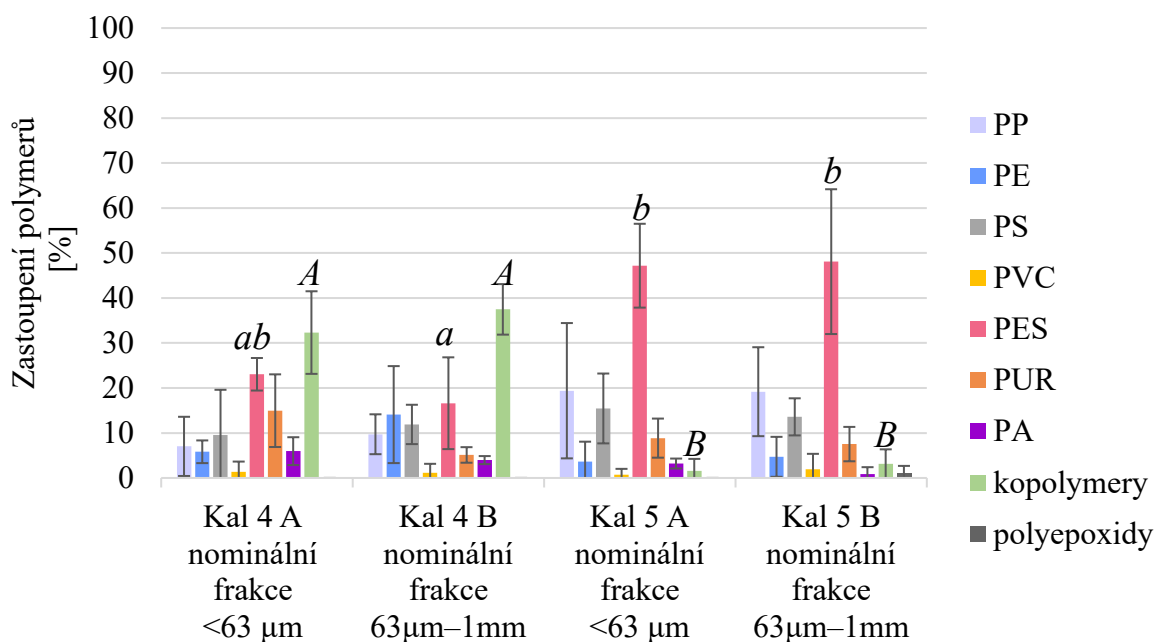
V analyzovaných kalech, rozdělených na nominální frakce A (<63 µm) a B (63 µm–1mm), byly detekovány různé mikroplasty všech velikostí > 25 µm. Výsledky počtu detekovaných polymerů v kalech byly podrobeny statistické analýze rozptylu (ANOVA). Za signifikantně

významný rozdíl byly považovány výsledky, u nichž byla dosažena hladina signifikance menší než $p = 0,05$. K účelu testování rozdílů mezi jednotlivými kaly spolu s testem analýzy rozptylu (ANOVA) byl také pro signifikantně odlišné polymery proveden Tukey HSD post hoc test s hladinou významnosti ($\alpha = 0,05$). Písmeny nad sloupci jsou vyznačeny vzorky kalu, u nichž nebyl detekován statisticky významný rozdíl ($\alpha = 0,05$). Velkými písmeny byly vyznačeny rozdílné skupiny kopolymerů a malými písmeny rozdílné skupiny PES (Obrázek č. 8).

V kalu 4 obou nominálních frakcí byly detekovány tyto polymery: PP, PE, PS, PVC, PES, PUR, PA a kopolymery (spektra identifikovaná dle knihovny jako poly[(3-fenyl)propylakrylát]; styren ethylen butylen, nebo styren butyl metakrylát; polymethylmethakrylát). V nominálních frakcích A i B největší podíl z hlediska počtu polymeru měly kopolymery, s procentuálním zastoupením $32 \pm 9 \%$ a $38 \pm 6 \%$ respektive. Polymerem s nejnižším zastoupením ve frakci A i B byl PVC s procentuálním zastoupením $1 \pm 2 \%$ v obou frakcích.

V kalu 5 byly naměřeni tito zástupci mikroplastů: PP, PE, PS, PVC, PES, PUR, PA, kopolymery a polyepoxydy. Ve frakci A i B se vyskytoval nejhojněji polymer PES, jehož zastoupení ve frakci 5 A činilo $47 \pm 9 \%$ a $48 \pm 16 \%$ ve frakci 5 B. Polymerem s nejnižším zastoupením ve frakci 5 A byl PVC ($1 \pm 1 \%$) a ve frakci 5 B PA ($1 \pm 2 \%$).

Těmito výsledky byla zamítnuta čtvrtá hypotéza, která zněla, že nejvíce se v analyzovaných čistírenských kalech budou vyskytovat polymery PE a PP, které jsou v kalech dle dostupné literatury detekovány nejčastěji.



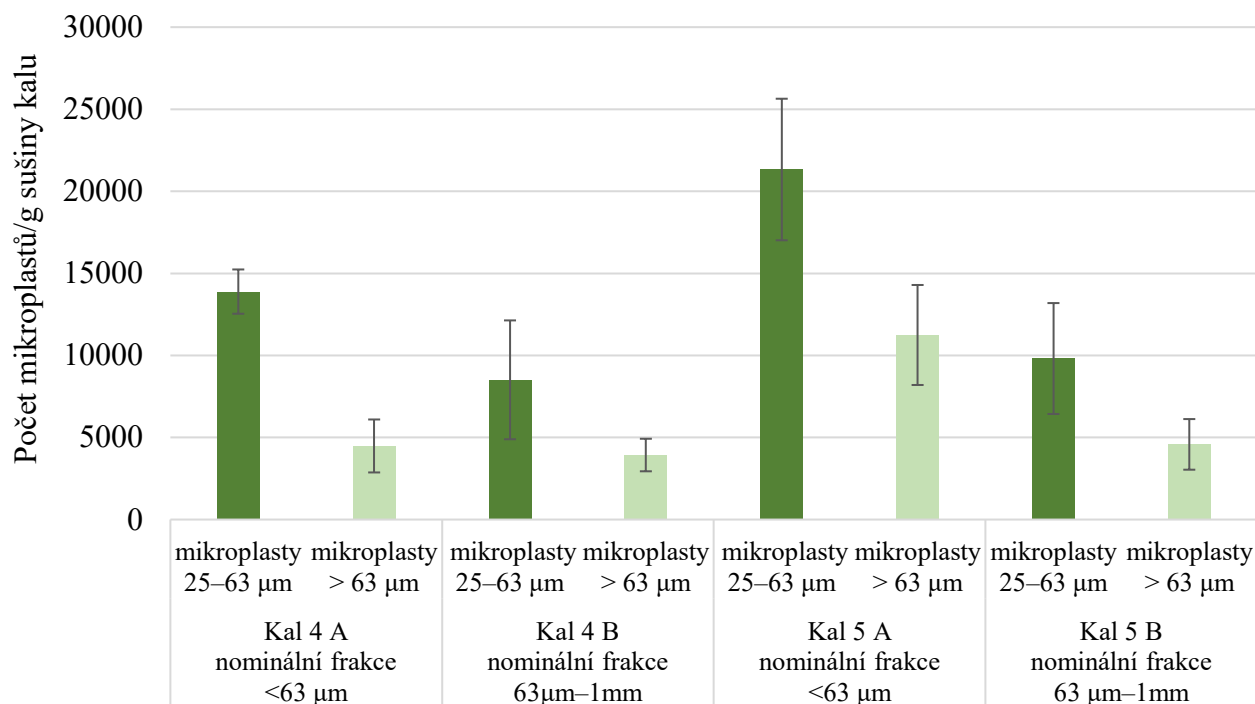
Obrázek č. 8 Průměrné procentuální zastoupení polymerů mikroplastů o velikostech $> 25 \mu\text{m}$ v nominálních frakcích kalů 4 A ($< 63 \mu\text{m}$), 4 B ($63 \mu\text{m} - 1\text{mm}$) a kalů 5 A ($< 63 \mu\text{m}$), 5 B ($63 \mu\text{m} - 1\text{mm}$). Chybové úsečky vyjadřují směrodatné odchylky. K účelu testování rozdílů mezi jednotlivými kaly spolu s testem analýzy rozptylu (ANOVA) byl také pro signifikantně odlišné polymery proveden Tukey HSD post hoc test s hladinou významnosti ($\alpha = 0,05$). Písmeny nad sloupci jsou vyznačeny vzorky kalů, u nichž nebyl detekován statisticky významný rozdíl ($\alpha = 0,05$). Velkými písmeny jsou vyznačeny skupiny kopolymerů, malými písmeny jsou vyznačeny skupiny PES.

6.5.2 Kvantitativní analýza

V kalech rozdělených na nominální frakce A ($<63 \mu\text{m}$) a B ($63 \mu\text{m} - 1\text{mm}$) byly detekovány částice o velikostech, jež nespádají do daných velikostních skupin. Výsledky jsou uvedeny na Obrázek č. 9. Tato skutečnost byla zjištěna při kvantifikaci částic v programu ImageJ2. Většinu mikroplastů detekovaných ve všech kalech tvořily částice rozměrů od 25 do 63 μm .

V kalu 4 A bylo zjištěno, že se nachází 18372 ± 1481 částic mikroplastů na gram sušiny kalu. Podíl částic o velikostech 25–63 μm tvořil 76 % a u mikroplastů o rozměru $> 63 \mu\text{m}$ jen 24 %. V kalu 4 B bylo kvantifikováno na 12445 ± 2306 částic na gram sušiny, z čehož 68 % byly mikroplasty o velikostech 25–63 μm a zbylých 32 % částice o rozměru $> 63 \mu\text{m}$.

V kalu 5 A byla zjištěna koncentrace mikroplastů rovná 32573 ± 3679 částic na gram sušiny. Z toho 65 % tvořily částice o velikosti 25–63 μm a 35 % částice o velikosti $> 63 \mu\text{m}$. U nominální frakce 5 B bylo zjištěno celkově $14\,391 \pm 2\,461$ částic na gram sušiny kalu, ze kterých 68 % tvořily částice ve velikostním rozsahu 25–63 μm a zbylých 32 % částice o velikosti $> 63 \mu\text{m}$.

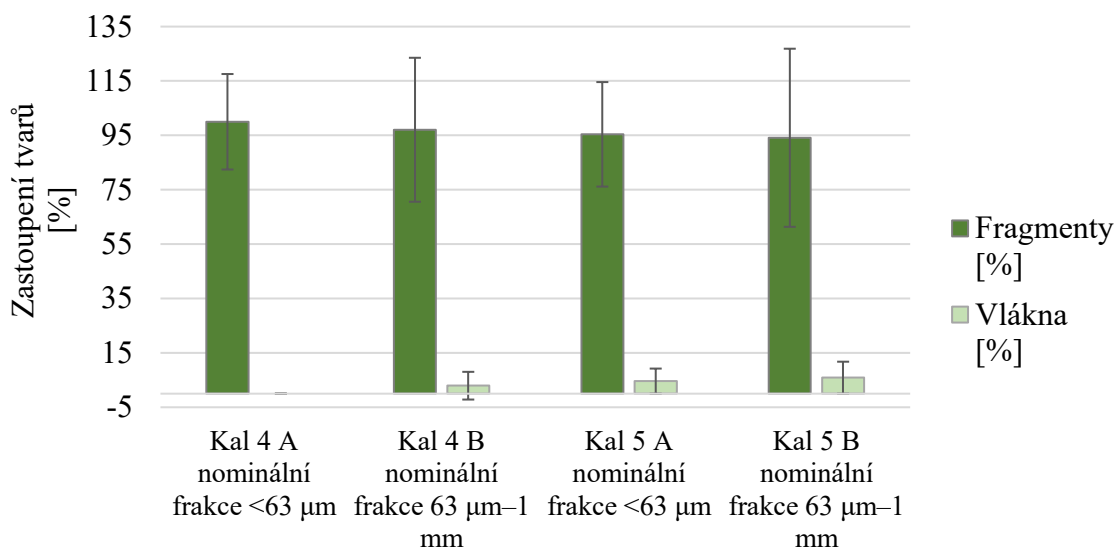


Obrázek č. 9. Zjištěný počet mikroplastů detekovaných v nominálních frakcích jednotlivých kalů 4 A (< 63 µm), 4 B (63 µm –1mm) a kalů 5 A (< 63 µm), 5 B (63 µm–1mm) vztažený na gram sušiny kalu. Tmavě zelené sloupce reprezentují mikroplasty o velikostech 25–63 µm; světle zelené sloupce reprezentují částice o velikosti > 63 µm. Stanovení velikostí částic bylo provedeno za pomoci programu ImageJ2.

6.5.3 Tvary detekovaných mikroplastů

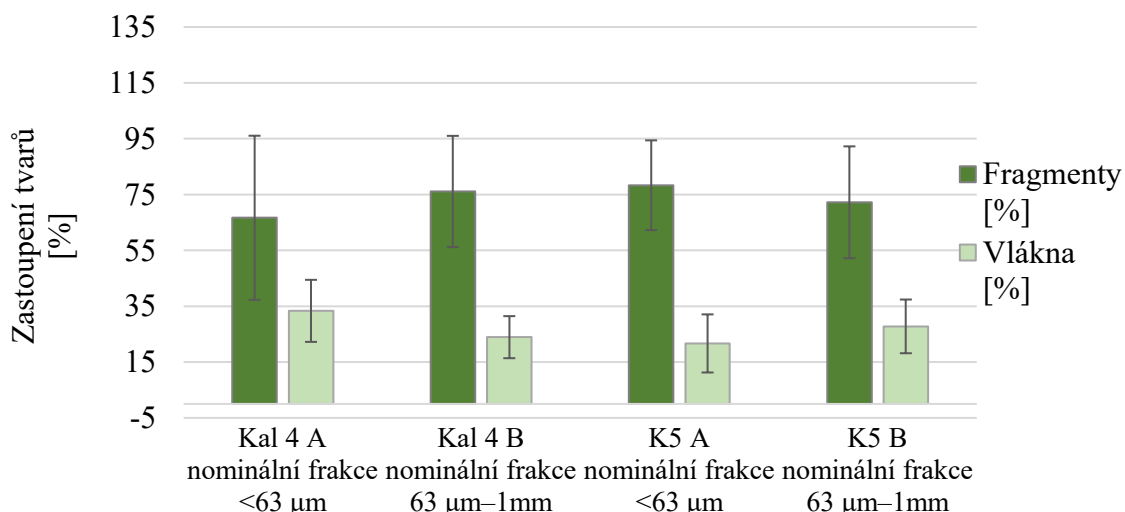
V rámci hodnocení tvarů detekovaných mikroplastů veškeré částice byly rozděleny do dvou skupin: fragmenty a vlákna. Kromě toho částice byly rozděleny do dvou velikostních frakcí: 25–63 µm (Obrázek č.10) a > 63 µm (Obrázek č. 11). Fragmenty dominovaly svým zastoupením v obou testovaných kalech 4 a 5, a to ve všech nominálních frakcích.

U mikroplastů ve velikostním rozmezí 25–63 µm u obou nominálních frakcí (A, B) dominantní podíl tvořily fragmenty. V případě kalu 4 A nebyla detekována žádná vlákna, zatímco ve frakci 4 B podíl vláken tvořil $3 \pm 5 \%$ z celkového počtu detekovaných částic. Kdežto v případě kalu frakce 5 B podíl vláken dosahoval hodnot podílu relativního zastoupení $6 \pm 6 \%$.



Obrázek č.10 Procentuální zastoupení tvarů mikroplastů – fragmentů a vláken mezi detekovanými mikroplasty v obou nominálních velikostních frakcích kalů 4 A (< 63 μm), 4 B (63 μm–1mm) a kalů 5 A (< 63 μm), 5 B (63 μm–1mm) o velikostech 25–63 μm. Stanovení tvarů částic bylo provedeno za pomoci programu ImageJ2.

U částic > 63 μm byl pozorován vyšší relativní výskyt vláken ve srovnání s částicemi v rozmezí 25–63 μm. V nominální velikostní frakci 4 A podíl vláken dosahoval až 33 %, zatímco u kalu z nominální velikostní frakci 5 B tento podíl měl nejvyšší hodnotu relativního zastoupení 28 %. Tímto výsledkem byla zamítnuta poslední pátá hypotéza, která zněla, že z hlediska tvarů mikroplastů budou v analyzovaných čistírenských kalech převažovat vlákna, nikoliv fragmenty, kvůli vysokým koncentracím vláken v odpadních vodách především z praní syntetických materiálů.



Obrázek č. 11 Procentuální zastoupení tvarů mikroplastů – fragmentů a vláken mezi detekovanými mikroplasty v obou nominálních velikostních frakcích kalů 4 A (< 63 μm), 4 B (63 μm–1mm) a kalů 5 A (< 63 μm), 5 B (63 μm–1mm) o velikostech > 63 μm. Stanovení tvarů částic bylo provedeno za pomoci programu ImageJ2.

7. Diskuze

Digestce Fentonovým činidlem byla vybrána pro rozklad organické hmoty vzhledem ke své účinnosti, vysoké rychlosti degradace a nízké agresivitě vůči mikroplastům při dodržení teploty do 60 °C (Tagg et al., 2017; Munno et al., 2018). Kvůli nejednotnosti metodických postupů z hlediska průběhu času reakce potřebného k maximálnímu úbytku organické hmoty byl proveden experiment, který sledoval v různých časech reakce vybrané ukazatele úbytku celkového dusíku a celkové hmotnosti. Obdobné experimenty provedla pouze studie, která sledovala změnu hmotnosti a úbytek organické hmoty v testované půdě a kalu metodou ztráty žiháním (Hurley et al., 2018). Výsledky této studie ukázaly, že v kalech a půdě se podařilo redukovat $43 \pm 7\%$ hmotnosti a $87 \pm 10\%$ organické hmoty během Fentonovy reakce. Výsledek experimentů této diplomové práce potvrdil, že Fentonova reakce byla obdobně účinná, jako u výše zmíněné publikace Hurley et al., 2018 s maximálním úbytkem 48–76 % hmotnosti a 93–97 % celkového dusíku. Ukazatel dusíku, jakožto ukazatel úbytku organické hmoty, byl vybrán vzhledem k jeho zanedbatelnému zastoupení v molekulách polymerů oproti např. celkovému uhlíku ve struktuře molekul polymerních materiálů. Například u polymerů ze skupiny polyamidů či polyuretanu, který se vyskytují v kalech, obsahují ve své struktuře dusík, a tak by se dalo diskutovat o částečném nadhodnocení výsledků. Jejich zastoupení v kalech však je nízké (El Hayany et al., 2022; Ziajahromi a Leusch 2022), a tak se lze usoudit, že mají na výsledky této práce zanedbatelný vliv.

Při vytváření protokolu barvení mikroplastů NČ k validacím dalších kroků metodiky bylo ověřeno, že intenzita fluorescenčního zbarvení mikroplastů se lišila v závislosti na jednotlivých typech polymerů, jak už bylo naznačeno v některých publikacích (Shruti et al., 2022; Lv et al., 2019; Erni-Cassola et al., 2017). V některých publikovaných studiích se nepodařilo silně či vůbec nabarvit částice polymeru LDPE (Al-Azzawi et al., 2023; Hurley et al., 2018). Nicméně, v literatuře se častěji objevuje problém nabarvit polymery o vyšších hustotách, například částice PVC či PET, které mají méně hydrofobní povrch (Shim et al., 2016; Liu et al., 2022a). Vyrobené mikroplasty polymeru PET se dle výsledků této diplomové práce naopak barvily nejintenzivněji a stejnoměrně. U PVC, obdobně jako ve studii Erni-Cassola et al. (2017), byla detekována nejslabší fluorescence. Kromě intenzity zbarvení byl vyzorován jev nestejnoměrné adsorpce barvy na povrchu částic u PS a HDPE. Zejména některé částice PS fluoreskovaly tak intenzivně, že nebylo možné rozpoznat jejich tvar a velikost vlivem přesycení detektoru.

Schopnost částic flotovat teoreticky klesá se zvyšující se hustotou a zároveň se snižující se velikostí částic (Nguyen et al., 2019). Proto pro ověření výtěžnosti flotačního kroku byl v této práci vybrán jeden z nejhustších polymerů, PET, o dvou různých velikostních frakcích. Zároveň tento polymer patří mezi nejvíce vyráběné polymery celosvětově a hojně se vyskytuje i v čistírenských kalech (PlasticsEurope, 2023; El Hayany et al., 2022; Hatinoğlu & Sanin, 2021; Yaseen et al., 2022). Navíc díky vysoké intenzitě fluorescence a specifickému tvaru byly PET částice ve vzorcích snadno rozpoznatelné od případné okolní kontaminace.

Výsledná výtěžnost experimentu flotace mikroplastů o velikostní frakci 150–300 μm dosahovala v této práci až 98 %, a tím potvrdila svou vysokou účinnost i podle jiných výsledků z literatury (Grause et al., 2022). Ve studii Grause et al. (2022) byla testována gravimetrická výtěžnost flotace centrifugací také s PET částicemi o podobných velikostech, ovšem za odlišných centrifugačních podmínek, času flotace a v jiném nasyceném roztoku. Bohužel výsledky této práce s velikostní frakcí PET částic o rozměrech 20–40 μm nelze se žádnou studií porovnat, jelikož se žádná z nich nezaměřovala na takto malé částice s obdobným flotačním postupem. Pouze autoři jedné německé studie testovali výtěžnost flotace elutriací pro částice PET o velikostech 20–63 μm , která dosahovala 47–77 % (Hengstmann et al., 2018). V souvislosti s účinností flotace se ukazuje, že i právě odlišné tvary mikroplastů mohou mít potenciální vliv na výtěžnost metodik, a tak by se jako další parametr měly zahrnout do budoucích validačních experimentů (Kedziński et al., 2017).

Výskyt odborných publikací, v nichž se provádějí experimenty ke stanovení výtěžnosti metodik extrakce mikroplastů pomocí přídavku mikroplastů do matric, je relativně častý. Výtěžnost zjištěná v předložené práci (69–89 %) je podobná výsledkům jiných publikací. Například Harley-Nyang et al. (2022) uvádějí výtěžnost až 60–102 %, Corradini et al. (2019) 49–78 % a Li et al. (2018) 67–98 %. Navíc výsledky studie Li et al. (2018) obdobně ukázaly, že míra výtěžnosti může úměrně stoupat s větší velikostí částic. Pro validační pokus této práce v rámci celé metodiky byl vybrán polymer HDPE, který se vyskytuje v kalech nejhojněji a jeho detekce na fluorescenčním mikroskopu byla rozpoznatelná od pozadí bez nutnosti ověření výsledků chemickou detekční metodou, např. spektroskopicky (Hatinoğlu a Sanin, 2021). Přesnost fluorescenční detekce HDPE částic vnesených do slepého vzorku kalu byla podpořena i skutečností, že byla tato matrice předem zbavena organické hmoty digescí a flotujícího materiálu v supernatantu právě kvůli potenciální interferenci a nadhodnocení množství mikroplastů a organické hmoty z původní matrice.

Ve dvou čistírenských kalech z ČR se podařilo identifikovat různé polymery o různých velikostech a množstvích. V kalech 4 a 5 byly nejzastoupenějšími polymery PES a kopolymery,

což nekorelovalo s nejběžnějšími mikroplasty v kalech podle literatury (PE a PP). Důvodem ovšem může být různorodé složení kalů v závislosti na zdroji znečištění v odpadních vodách a technologických postupech při zpracování čistírenských kalů (Conley et al., 2019; Schnaak et al. 1997).

Množství odhadovaných mikroplastů v g sušiny testovaných kalů v této práci v jednotkách 10^3 – 10^4 v g sušiny kalu neodpovídalo množství částic v kalech dle literatury (10 – 10^2 částic g sušiny kalu), shrnuté od Gao et al. (2023a). Dle jiné literatury se ovšem mohou objevovat i větší rozptyly množství částic v kalech, které mohou dosahovat až osmi řádů (Ziajahromi a Leusch 2022). Nadhodnocení kvantitativních výsledků může být způsobeno i fluorescenčním barvením. Autoři studií uvádí, že při použití fluorescenčních metodik detekce bez zavedení kvalitativní analýzy může docházet až ke 40–100% nadhodnocení (Stanton et al., 2019; Nel et al., 2021). Poměr fluoreskujících částic/fluoreskujících plastů byl stanoven i v této práci a pohyboval se v rozmezí 35–62 %. Proto pro výsledné přepočty částic na gram sušiny kalu byl použit korekční faktor individuální pro každý vzorek měřeného kalu z hlediska změřeného poměru fluoreskujících částic/fluoreskujících plastů, a tedy lze výsledky této práce pokládat za věrohodné a nikoliv nadhodnocené. Na základě výsledků kvantitativní analýzy se také potvrdilo, že suché sítování kalu za účelem rozdělení částic dle velikostí, není účinné, jelikož se různé velikosti vyskytovaly v obou použitých nominálních frakcích kalu (frakce $< 63 \mu\text{m}$ a frakce $63 \mu\text{m}$ – 1mm). K uvolnění částic ze shluků může pravděpodobně docházet až při digesci Fentonovou reakcí.

Mezi mikroplasty v kalech převažovaly z hlediska tvaru fragmenty nad vlákny. V literatuře se ovšem vyskytovaly častěji vlákna než fragmenty (Hatinoğlu a Sanin, 2021; Yaseen et al., 2022). Možným vysvětlením jsou opět zmiňované různé zdroje znečištění odpadních vod, které určují složení kalu nebo variabilita napříč jednotlivými metodikami (Schnaak et al. 1997).

Analyzovaná navážka kalu (0,0500 g) byla zvolena na základě limitací metodiky. Tyto limitace vznikaly už při úpravě vzorku k analýze, kdy docházelo k ucpání filtrů z nerezový oceli jemnými částicemi kalu při použití větších navážek. Další limitací bylo i celkové množství částic – vzorky musely být ředěny tak, aby se částice nepřekrývaly. V neposlední řadě bylo množství detekovaných částic omezeno časovou náročností, hledáním částic ze snímků z fluorescenčního mikroskopu a měřením spekter fluoreskujících částic manuálně. Pro představu, měření zvoleného minima 50–70 částic na FTIR v jednom vzorku, trvalo $\pm 4 \text{h}$. Proto je vhodné zvážit měření za použití pokročilejších a efektivnějších instrumentací, které zvládají automatickou analýzu a vyhledávání částic ve vzorku.

Vytvořenou metodiku lze považovat za úspěšnou z hlediska analýzy mikroplastů v reálných vzorcích životního prostředí. Nicméně pro její reprodukovatelnost je důležité zejména používání negativních kontrol a dodržování podmínek pro minimalizaci kontaminace mikroplasty z okolního prostředí.

8. Závěr

V rámci předložené práce byla vyvinuta a experimentálně optimalizována metodika separace mikroplastů z pevných vzorků životního prostředí. V průběhu této práce proběhlo testování a validace jednotlivých kroků úpravy vzorků pro následnou detekci mikroplastů, používaných v odborné literatuře. Před zahájením této práce vytvořeno pět hypotéz. Při optimalizaci digesce byl sledován úbytek hmotnosti kalů v průběhu času a úbytek celkového dusíku v kalech, který reprezentoval snížení obsahu organické hmoty. Výsledek experimentu potvrdil úbytek organické hmoty z 93–97 %, a tak nebyla zamítnuta první hypotéza, která zněla, že digesce Fentonovým činidlem odstraní většinu organické hmoty v kalech do 24 hodin reakce navzdory vysokému obsahu organických látek. Po úspěšném vytvoření protokolu pro fluorescenční barvení a detekci vyrobených mikroplastů na fluorescenčním mikroskopu byla experimentálně ověřena flotace PET částic v nasyceném roztoku NaI. Tento polymer byl zvolen vzhledem k jeho vyšší hustotě v porovnání s jinými polymery. Výsledky výtěžnosti flotace ukázaly, že účinnost flotace mikroplastů z PET byla nižší u částic o velikostech 25–40 μm (55% výtěžnost), než li u částic o velikostech 150–300 μm (98 % výtěžnost), ale flotace byla pozorována u obou velikostních frakcí. Na základě těchto výsledků byla zamítnuta druhá hypotéza, která zněla, že částice polymeru PET o heterogenních tvarech a rozměru 20–40 μm nebudou flotovat v nasyceném roztoku NaI, ať už vlivem jejich malé velikosti, či povahou vysoké hustoty polymeru. Celá metodika extrakce mikroplastů z kalu byla validována s částicemi z HDPE a dosahovala lepších výsledků (69–92 %), než li v případě ověření účinnosti flotace. To naznačuje, že faktory, které přispívají k nižší výtěžnosti extrakce polymerů u frakce částic 20–40 μm , nejsou dosud zcela objasněny. Mezi možná vysvětlení lze uvést vyšší hustotu polymeru, malou velikost částic nebo jejich nepravidelný tvar. Díky těmto výsledkům nebyla zamítnuta třetí hypotéza, která zněla, že výtěžnost optimalizované metodiky extrakce částic HDPE z uměle kontaminovaného kalu bude dostatečná navzdory vlivu přítomné matrice. Poté byla extrakce mikroplastů provedena ve vzorcích dvou čistírenských kalů z ČR v triplicátech pomocí optimalizované metodiky. Ve všech testovaných kalech byly identifikovány mikroplasty různých polymerů, počtů, velikostí a tvarů. Konkrétně v kalu 4 byly nejhojněji zastoupeny kopolymery, zatímco nejméně zastoupeným polymerem byl PVC. Naopak v kalu 5 byl převažujícím polymerem PES a podobně jako v kalu 4 nejmenší zastoupení bylo pozorováno u PVC. Tato zjištění jsou v rozporu se čtvrtou hypotézou, která zněla, že nejvíce se v analyzovaných čistírenských kalech budou vyskytovat polymery PE a PP, které jsou v kalech dle dostupné literatury detekovány nejčastěji. V případě mikroplastů

ve velikostním rozsahu 25–63 μm byl zjištěn průměrný počet částic v rozsahu 8 513 až 21 328 mikroplastů na gram suchého kalu. V případě mikroplastů s velikostí nad 63 μm byl detekován průměrný počet částic v rozsahu 3 932 až 11 245 mikroplastů na gram suchého kalu. Zjištěná množství částic byla řádově vyšší, než se běžně uvádí v literatuře. Tento rozpor nemusí nutně znamenat nepřesnost výsledků této práce, nýbrž může být značnými zdroji environmentální variability kontaminace kalů, rozdíly v metodikách přípravy vzorků nebo rozdílné detekční metody. Z tohoto vyplývá, že metodiky detekce mikroplastů v životním prostředí jsou stále ve vývoji a vyžadují další standardizaci, sjednocení a porovnání jednotlivých metod napříč různými výzkumnými skupinami. Z hlediska tvarů polymerů byly v kalech nalezeny převážně fragmenty, než-li vlákna. Toto poslední zjištění vedlo k zamítnutí páté hypotézy, kterou bylo, že z hlediska tvarů mikroplastů budou v analyzovaných čistírenských kalech převažovat vlákna, nikoliv fragmenty, kvůli vysokým koncentracím vláken v odpadních vodách především z praní syntetických materiálů.

Jednou z nevýhod vyvinuté metodiky je její časová náročnost spojená s nutností dodržovat přísné podmínky pro minimalizaci kontaminace zpracovávaných vzorků. Budoucí výzkum by se měl soustředit na zlepšení výtěžnosti extrakční metodiky, zejména pro mikroplasty v blízkosti dolní meze detekce; vyhodnocení vlivu tvaru částic na výtěžnost jejich extrakce; snížení environmentální stopy analytického postupu; jeho zjednodušení a jeho automatizace.

9. Seznam použité literatury:

ALAVIAN PETROODY, Somayye Sadat, Seyed Hossein HASHEMI a Cornelis A.M. VAN GESTEL, 2021. Transport and accumulation of microplastics through wastewater treatment sludge processes. *Chemosphere* [online]. **278**. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2021.130471

AL-AZZAWI, Mohammed S.M., Marco KUNASCHK, Kristina MRAZ, Korbinian P. FREIER, Oliver KNOOP a Jörg E. DREWES, 2023. Digest, stain and bleach: Three steps to achieving rapid microplastic fluorescence analysis in wastewater samples. *Science of the Total Environment* [online]. **863**. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.160947

ALBERTSSON, A.-C., 1980. The shape of the biodegradation curve for low and high density polyethenes in prolonged series of experiments. *European Polymer Journal* [online]. **16**, 623–630 [vid. 2023-11-08]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/0014-3057(80)90100-7

ANDRADY, Anthony L., 2011. *Microplastics in the marine environment* [online]. srpen 2011. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.030

ANDRADY, Anthony L. a Mike A. NEAL, 2009. Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **364**(1526), 1977–1984. ISSN 14712970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2008.0304

AZEEM, Imran, Muhammad ADEEL, Muhammad Arslan AHMAD, Noman SHAKOOR, Gama Dingba JIANGCUO, Kamran AZEEM, Muhammad ISHFAQ, Awais SHAKOOR, Muhammad AYAZ, Ming XU a Yukui RUI, 2021. *Uptake and accumulation of nano/microplastics in plants: A critical review* [online]. 1. listopad 2021. B.m.: MDPI. ISSN 20794991. Dostupné z: doi:10.3390/nano11112935

BECKINGHAM, Barbara, Adriana APINTILOAIEI, Caroline MOORE a Jay BRANDES, 2023. Hot or not: systematic review and laboratory evaluation of the hot needle test for microplastic identification. *Microplastics and Nanoplastics* [online]. **3**(1). Dostupné z: doi:10.1186/s43591-023-00056-4

BHUTTO, Seerat Ul Ain, Yi fei MA, Muhammad AKRAM a Xue yi YOU, 2023. Microplastics in Tai lake food web: Trophic transfer and human health risk assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. **101**. ISSN 18727077. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2023.104206

BOUCHER, Julien a Damien FRIOT, 2017. *Primary Microplastics in the Oceans: a Global Evaluation of Sources Primary* [online]. B.m.: IUCN, Gland, Switzerland. ISBN 978-2-8317-1827-9. Dostupné z: doi:dx.doi.org/10.2305/IUCN.CH.2017.01.en

BRETAS ALVIM, C., M. A. BES-PIÁ a J. A. MENDOZA-ROCA, 2020. Separation and identification of microplastics from primary and secondary effluents and activated sludge from wastewater treatment plants. *Chemical Engineering Journal* [online]. **402**. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2020.126293

CLARKE, Bradley O. a Nichola A. PORTER, 2010. Persistent organic pollutants in sewage sludge: Levels, sources, and trends. In: *ACS Symposium Series* [online]. B.m.: American Chemical Society, s. 137–171. ISBN 9780841224964. Dostupné z: doi:10.1021/bk-2010-1048.ch006

CONLEY, Kenda, Allan CLUM, Jestine DEEPE, Haven LANE a Barbara BECKINGHAM, 2019. Wastewater treatment plants as a source of microplastics to an urban estuary: Removal efficiencies and loading per capita over one year. *Water Research X* [online]. **3**. ISSN 25899147. Dostupné z: doi:10.1016/j.wroa.2019.100030

CORRADINI, Fabio, Pablo MEZA, Raúl EGUILUZ, Francisco CASADO, Esperanza HUERTA-LWANGA a Violette GEISSEN, 2019. Evidence of microplastic accumulation in agricultural soils from sewage sludge disposal. *Science of the Total Environment* [online]. **671**, 411–420. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.368

ČERNÁ, Tereza, Kateřina PRAŽANOVÁ, Hynek BENEŠ, Ivan TITOV, Kateřina KLUBALOVÁ, Alena FILIPOVÁ, Petr KLUSOŇ a Tomáš CAJTHAML, 2021. Polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in aged and unaged polyurethane microplastics in contaminated soil. *Science of the Total Environment* [online]. **770**. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145254

DE FALCO, Francesca, Emilia DI PACE, Mariacristina COCCA a Maurizio AVELLA, 2019. The contribution of washing processes of synthetic clothes to microplastic pollution. *Scientific Reports* [online]. **9**(1). ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-43023-x

DE SÁ, Luís Carlos, Miguel OLIVEIRA, Francisca RIBEIRO, Thiago Lopes ROCHA a Martyn Norman FUTTER, 2018. *Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future?* [online]. 15. prosinec 2018. B.m.: Elsevier B.V. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.207

DEMIRBAS, Ayhan, Gaber EDRIS a Walid M. ALALAYAH, 2017. *Sludge production from municipal wastewater treatment in sewage treatment plant* [online]. 19. květen 2017. B.m.: Taylor and Francis Inc. ISSN 15567230. Dostupné z: doi:10.1080/15567036.2017.1283551

DING, Jiannan, Shanshan ZHANG, Roger Mamitiana RAZANAJATOVO, Hua ZOU a Wenbin ZHU, 2018. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Pollution* [online]. **238**, 1–9. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2018.03.001

DING, Runrun, Ling TONG a Weicheng ZHANG, 2021a. *Microplastics in Freshwater Environments: Sources, Fates and Toxicity* [online]. 1. květen 2021. B.m.: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. ISSN 15732932. Dostupné z: doi:10.1007/s11270-021-05081-8

DING, Runrun, Ling TONG a Weicheng ZHANG, 2021b. *Microplastics in Freshwater Environments: Sources, Fates and Toxicity* [online]. 1. květen 2021. B.m.: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. ISSN 15732932. Dostupné z: doi:10.1007/s11270-021-05081-8

EHLERT, K. A., C. W.E. BEUMER a M. C.E. GROOT, 2008. Migration of bisphenol A into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* [online]. **25**(7), 904–910. ISSN 19440057. Dostupné z: doi:10.1080/02652030701867867

EL HAYANY, Bouchra, Cornelia RUMPEL, Mohamed HAFIDI a Loubna EL FELS, 2022. *Occurrence, analysis of microplastics in sewage sludge and their fate during composting: A literature review* [online]. 1. září 2022. B.m.: Academic Press. ISSN 10958630. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2022.115364

ERNI-CASSOLA, Gabriel, Matthew I. GIBSON, Richard C. THOMPSON a Joseph A. CHRISTIE-OLEZA, 2017. Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20 µm) in Environmental Samples. *Environmental Science and Technology* [online]. **51**(23), 13641–13648. ISSN 15205851. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.7b04512

ERNI-CASSOLA, Gabriel, Vinko ZADJELOVIC, Matthew I. GIBSON a Joseph A. CHRISTIE-OLEZA, 2019. Distribution of plastic polymer types in the marine environment; A meta-analysis. *Journal of Hazardous Materials* [online]. **369**, 691–698. ISSN 18733336. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2019.02.067

FEITEIRO, Joana, Melissa MARIANA a Elisa CAIRRÃO, 2021. *Health toxicity effects of brominated flame retardants: From environmental to human exposure* [online]. 15. září 2021. B.m.: Elsevier Ltd. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2021.117475

FENDALL, Lisa S. a Mary A. SEWELL, 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **58**(8), 1225–1228. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2009.04.025

FOLEY, Carolyn J., Zachary S. FEINER, Timothy D. MALINICH a Tomas O. HÖÖK, 2018. *A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates* [online]. 1. srpen 2018. B.m.: Elsevier B.V. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.046

FRIAS, J. P.G.L. a Roisin NASH, 2019. Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **138**, 145–147 [vid. 2023-04-19]. ISSN 0025-326X. Dostupné z: doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2018.11.022

GAO, Zhiqiang, James V. CIZDZIEL a Laiguo CHEN, 2023a. Microplastics profile in sludge from a university wastewater treatment plant and the influence of chemical digestions on Nile red stained microplastics. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. **11**(3). ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2023.109671

GAO, Zhiqiang, Laiguo CHEN, James CIZDZIEL a Yumei HUANG, 2023b. Research progress on microplastics in wastewater treatment plants: A holistic review. *Journal of Environmental Management* [online]. **325**. ISSN 10958630. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2022.116411

GEOFFROY, Laure, Pietro PARIS, Joao CARVALHO, Ignacio DE LA FLOR TEJERO, Bert-Ove LUND, Raili MOLDOV, Michael NEUMANN, Karen THIELE a Simon COGEN, 2020. *Opinion on an Annex XV dossier proposing restrictions on intentionally-added microplastics*.

GRAUSE, Guido, Yamato KUNIYASU, Mei Fang CHIEN a Chihiro INOUE, 2022. Separation of microplastic from soil by centrifugation and its application to agricultural soil. *Chemosphere* [online]. **288**. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2021.132654

HAHLADAKIS, John N., Costas A. VELIS, Roland WEBER, Eleni IACOVIDOU a Phil PURNELL, 2018. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials* [online]. **344**, 179–199. ISSN 18733336. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2017.10.014

HAMMER, Jort, Michiel H.S. KRAAK a John R. PARSONS, 2012. *Plastics in the marine environment: The dark side of a modern gift* [online]. 2012. ISBN 9781461434139. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4614-3414-6_1

HANSEN, Erik, Nils H. NILSSON, Delilah LITHNER a Carsten LASSEN, 2013. *Hazardous substances in plastic materials*.

HARLEY-NYANG, Daisy, Fayyaz Ali MEMON, Nina JONES a Tamara GALLOWAY, 2022. Investigation and analysis of microplastics in sewage sludge and biosolids: A case study from one wastewater treatment works in the UK. *Science of the Total Environment* [online]. **823**. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.153735

HARTMANN, Nanna B., Thorsten HÜFFER, Richard C. THOMPSON, Martin HASSELLÖV, Anja VERSCHOOR, Anders E. DAUGAARD, Sinja RIST, Therese KARLSSON, Nicole BRENNHOLT, Matthew COLE, Maria P. HERRLING, Maren C. HESS, Natalia P. IVLEVA, Amy L. LUSHER a Martin WAGNER, 2019. Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environmental Science and Technology* [online]. **53**(3), 1039–1047. ISSN 15205851. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.8b05297

HATINOĞLU, M. Dilara a F. Dilek SANIN, 2021. *Sewage sludge as a source of microplastics in the environment: A review of occurrence and fate during sludge treatment* [online]. 1. říjen 2021. B.m.: Academic Press. ISSN 10958630. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2021.113028

HENGSTMANN, Elena, Matthias TAMMINGA, Constantin VOM BRUCH a Elke Kerstin FISCHER, 2018. Microplastic in beach sediments of the Isle of Rügen (Baltic Sea) - Implementing a novel glass elutriation column. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **126**, 263–274. ISSN 18793363. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2017.11.010

HERMABESSIERE, Ludovic, Alexandre DEHAUT, Ika PAUL-PONT, Camille LACROIX, Ronan JEZEQUEL, Philippe SOUDANT a Guillaume DUFLOS, 2017. *Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review* [online]. 2017. B.m.: Elsevier Ltd. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.05.096

HOEKSTRA, Eddo J. a Catherine SIMONEAU, 2013. Release of Bisphenol A from Polycarbonate-A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **53**(4), 386–402. ISSN 10408398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2010.536919

HUERTA LWANGA, Esperanza, Jorge MENDOZA VEGA, Victor KU QUEJ, Jesus de los Angeles CHI, Lucero SANCHEZ DEL CID, Cesar CHI, Griselda ESCALONA SEGURA, Henny GERTSEN, Tamás SALÁNKI, Martine VAN DER PLOEG, Albert A. KOELMANS a Violette GEISSEN, 2017. Field evidence for transfer of plastic debris along a terrestrial food chain. *Scientific Reports* [online]. **7**(1). ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-14588-2

HURLEY, Rachel R., Amy L. LUSHER, Marianne OLSEN a Luca NIZZETTO, 2018. Validation of a Method for Extracting Microplastics from Complex, Organic-Rich, Environmental Matrices. *Environmental Science and Technology* [online]. **52**(13), 7409–7417. ISSN 15205851. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.8b01517

JAMBECK, Jenna R., Roland GEYER, Chris WILCOX, Theodore R. SIEGLER, Miriam PERRYMAN, Anthony ANDRADY, Ramani NARAYAN a Kara Lavender LAW, 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* [online]. **347**(6223), 768–771. ISSN 10959203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1260352

JEONG, Jaeseong a Jinhee CHOI, 2019. *Adverse outcome pathways potentially related to hazard identification of microplastics based on toxicity mechanisms* [online]. 1. září 2019. B.m.: Elsevier Ltd. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.05.003

JIA, Weiqian, Aleksandra KARAPETROVA, Mengjun ZHANG, Libo XU, Kang LI, Muke HUANG, Jie WANG a Yi HUANG, 2022. Automated identification and quantification of invisible microplastics in agricultural soils. *Science of the Total Environment* [online]. **844**. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.156853

KÄPPLER, Andrea, Dieter FISCHER, Sonja OBERBECKMANN, Gerald SCHERNEWSKI, Matthias LABRENZ, Klaus Jochen EICHHORN a Brigitte VOIT, 2016. Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **408**(29), 8377–8391. ISSN 16182650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-016-9956-3

KEDZIERSKI, Mikaël, Véronique LE TILLY, Patrick BOURSEAU, Hervé BELLEGOU, Guy CÉSAR, Olivier SIRE a Stéphane BRUZAUD, 2017. Microplastics elutriation system. Part A: Numerical modeling. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **119**(2), 151–161. ISSN 18793363. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2017.04.060

LEI, Lili, Siyu WU, Shibo LU, Mengting LIU, Yang SONG, Zhenhuan FU, Huahong SHI, Kathleen M. RALEY-SUSMAN a Defu HE, 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science of the Total Environment* [online]. **619–620**, 1–8. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2017.11.103

LESLIE, Heather A., Martin J.M. VAN VELZEN, Sicco H. BRANDSMA, A. Dick VETHAAK, Juan J. GARCIA-VALLEJO a Marja H. LAMOREE, 2022. Discovery and quantification of plastic particle

pollution in human blood. *Environment International* [online]. **163**. ISSN 18736750. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2022.107199

LI, Qinglan, Jiangtong WU, Xiaopeng ZHAO, Xueyuan GU a Rong JI, 2019. Separation and identification of microplastics from soil and sewage sludge. *Environmental Pollution* [online]. **254**. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.113076

LI, W. C., H. F. TSE a L. FOK, 2016. *Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects* [online]. 1. říjen 2016. B.m.: Elsevier B.V. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.084

LI, Xiaowei, Lubei CHEN, Qingqing MEI, Bin DONG, Xiaohu DAI, Guoji DING a Eddy Y. ZENG, 2018. Microplastics in sewage sludge from the wastewater treatment plants in China. *Water Research* [online]. **142**, 75–85. ISSN 18792448. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2018.05.034

LINARES, Victoria, Montserrat BELLÉS a José L. DOMINGO, 2015. *Human exposure to PBDE and critical evaluation of health hazards* [online]. 20. únor 2015. B.m.: Springer Verlag. ISSN 14320738. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-015-1457-1

LIU, Shengdong, Enxiang SHANG, Jingnan LIU, Yining WANG, Nanthi BOLAN, M. B. KIRKHAM a Yang LI, 2022a. *What have we known so far for fluorescence staining and quantification of microplastics: A tutorial review* [online]. 1. leden 2022. B.m.: Higher Education Press Limited Company. ISSN 2095221X. Dostupné z: doi:10.1007/s11783-021-1442-2

LIU, Xuemin, Huahong SHI, Bing XIE, Dionysios D. DIONYSIOU a Yaping ZHAO, 2019. Microplastics as Both a Sink and a Source of Bisphenol A in the Marine Environment. *Environmental Science and Technology* [online]. **53**(17), 10188–10196. ISSN 15205851. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.9b02834

LIU, Yi, Bei WANG, Vince PILEGGI a Sheng CHANG, 2022b. Methods to recover and characterize microplastics in wastewater treatment plants. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* [online]. **5**. ISSN 26660164. Dostupné z: doi:10.1016/j.cscee.2022.100183

LLORCA, Marta, Gabriella SCHIRINZI, Mònica MARTÍNEZ, Damià BARCELÓ a Marinella FARRÉ, 2018. Adsorption of perfluoroalkyl substances on microplastics under environmental conditions. *Environmental Pollution* [online]. **235**, 680–691. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2017.12.075

LOBELLE, Delphine a Michael CUNLIFFE, 2011. Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **62**(1), 197–200. ISSN 0025326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2010.10.013

LÖDER, Martin Günter Joachim, Mirco KUCZERA, Svenja MINTENIG, Claudia LORENZ a Gunnar GERDTS, 2015. Focal plane array detector-based micro-Fourier-transform infrared imaging for the analysis of microplastics in environmental samples. *Environmental Chemistry* [online]. **12**(5), 563–581. ISSN 14482517. Dostupné z: doi:10.1071/EN14205

LOZANO, Yudi M., Timon LEHNERT, Lydia T. LINCK, Anika LEHMANN a Matthias C. RILLIG, 2021. Microplastic Shape, Polymer Type, and Concentration Affect Soil Properties and Plant

Biomass. *Frontiers in Plant Science* [online]. **12**. ISSN 1664462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2021.616645

LUSHER, Amy L., Rachel HURLEY, Christian VOGELSANG, Luca NIZZETTO a Marianne OLSEN, 2017. *Mapping microplastics in sludge* [online]. Dostupné z: www.niva.no

LV, Lulu, Junhao QU, Zihua YU, Daihuan CHEN, Chunxia ZHOU, Pengzhi HONG, Shengli SUN a Chengyong LI, 2019. A simple method for detecting and quantifying microplastics utilizing fluorescent dyes - Safranin T, fluorescein isophosphate, Nile red based on thermal expansion and contraction property. *Environmental Pollution* [online]. **255**. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2019.113283

MAES, Thomas, Rebecca JESSOP, Nikolaus WELLNER, Karsten HAUPT a Andrew G. MAYES, 2017. A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Scientific Reports* [online]. **7**. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep44501

MARTÍ, Elisa, Cecilia MARTIN, Matteo GALLI, Fidel ECHEVARRÍA, Carlos M. DUARTE a Andrés CÓZAR, 2020. The Colors of the Ocean Plastics. *Environmental Science and Technology* [online]. **54**(11), 6594–6601. ISSN 15205851. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.9b06400

MASURA, J., J. BAKER, G. FOSTER a C. ARTHUR, 2015. *Laboratory Methods for the Analysis of Microplastics in the Marine Environment: Recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments*.

MATO, Yukie, Tomohiko ISOBE, Hideshige TAKADA, Haruyuki KANEHIRO, Chiyoko OHTAKE a Tsuguchika KAMINUMA, 2001. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environmental Science and Technology* [online]. **35**(2), 318–324. ISSN 0013936X. Dostupné z: doi:10.1021/es0010498

MICHELUZ, Anna, Eva Mariasole ANGELIN, João Almeida LOPES, Maria João MELO a Marisa PAMPLONA, 2021. Discoloration of historical plastic objects: New insight into the degradation of β -naphthol pigment lakes. *Polymers* [online]. **13**(14). ISSN 20734360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13142278

MINTENIG, S. M., I. INT-VEEN, M. G.J. LÖDER, S. PRIMPKE a G. GERDTS, 2017. Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging. *Water Research* [online]. **108**, 365–372. ISSN 18792448. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2016.11.015

MONIRA, Sirajum, Rajeev ROYCHAND, Muhammed Ali BHUIYAN a Biplob Kumar PRAMANIK, 2023. Role of water shear force for microplastics fragmentation into nanoplastics. *Environmental Research* [online]. **237**. ISSN 10960953. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2023.116916

MOORE, Charles James, 2008. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research* [online]. **108**(2), 131–139. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2008.07.025

MUNNO, Keenan, Paul A. HELM, Donald A. JACKSON, Chelsea ROCHMAN a Alina SIMS, 2018. Impacts of temperature and selected chemical digestion methods on microplastic particles. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. **37**(1), 91–98. ISSN 15528618. Dostupné z: doi:10.1002/etc.3935

NAPPER, Imogen E., Bede F.R. DAVIES, Heather CLIFFORD, Sandra ELVIN, Heather J. KOLDEWEY, Paul A. MAYEWSKI, Kimberley R. MINER, Mariusz POTOCKI, Aurora C. ELMORE, Ananta P. GAJUREL a Richard C. THOMPSON, 2020. Reaching New Heights in Plastic Pollution—Preliminary Findings of Microplastics on Mount Everest. *One Earth* [online]. **3**(5), 621–630. ISSN 25903322. Dostupné z: doi:10.1016/j.oneear.2020.10.020

NAPPER, Imogen E. a Richard C. THOMPSON, 2019. Environmental Deterioration of Biodegradable, Oxo-biodegradable, Compostable, and Conventional Plastic Carrier Bags in the Sea, Soil, and Open-Air over a 3-Year Period. *Environmental Science and Technology* [online]. **53**(9), 4775–4783. ISSN 15205851. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.8b06984

NEL, Holly A., Andrew J. CHETWYND, Liam KELLEHER, Iseult LYNCH, Imogen MANSFIELD, Henar MARGENAT, Simeon ONOJA, Pola GOLDBERG OPPENHEIMER, Gregory H. SAMBROOK SMITH a Stefan KRAUSE, 2021. Detection limits are central to improve reporting standards when using Nile red for microplastic quantification. *Chemosphere* [online]. **263**. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127953

NGUYEN, Brian, Dominique CLAVEAU-MALLET, Laura M. HERNANDEZ, Elvis Genbo XU, Jeffrey M. FARNER a Nathalie TUFENKJI, 2019. Separation and Analysis of Microplastics and Nanoplastics in Complex Environmental Samples. *Accounts of Chemical Research* [online]. **52**(4), 858–866. ISSN 15204898. Dostupné z: doi:10.1021/acs.accounts.8b00602

OKOFFO, Elvis D., Stacey O'BRIEN, Jake W. O'BRIEN, Benjamin J. TSCHARKE a Kevin V. THOMAS, 2019. Wastewater treatment plants as a source of plastics in the environment: A review of occurrence, methods for identification, quantification and fate. *Environmental Science: Water Research and Technology* [online]. **5**(11), 1908–1931. ISSN 20531419. Dostupné z: doi:10.1039/c9ew00428a

PASTORELLI, Gianluca, Costanza CUCCI, Oihana GARCIA, Giovanna PIANTANIDA, Abdelrazek ELNAGGAR, May CASSAR a Matija STRLIČ, 2014. Environmentally induced colour change during natural degradation of selected polymers. *Polymer Degradation and Stability* [online]. **107**, 198–209. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2013.11.007

PENG, X., M. CHEN, S. CHEN, S. DASGUPTA, H. XU, K. TA, M. DU, J. LI, Z. GUO a S. BAI, 2018. Microplastics contaminate the deepest part of the world's ocean. *Geochemical Perspectives Letters* [online]. **9**, 1–5. ISSN 24103403. Dostupné z: doi:10.7185/geochemlet.1829

PLASTICSEUROPE, 2023. *Plastics – the fast Facts 2023*.

QUINN, Brian, Fionn MURPHY a Ciaran EWINS, 2017. Validation of density separation for the rapid recovery of microplastics from sediment. *Analytical Methods* [online]. **9**(9), 1491–1498. ISSN 17599679. Dostupné z: doi:10.1039/c6ay02542k

REDDY, A. Sudharshan a Abhilash T. NAIR, 2022. *The fate of microplastics in wastewater treatment plants: An overview of source and remediation technologies* [online]. 1. listopad 2022. B.m.: Elsevier B.V. ISSN 23521864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2022.102815

S MAXWELL, Helmberger, Frame MELINDA K a Grieshop MATTHEW, 2020. Counterstaining to Separate Nile Red-Stained Microplastic Particles from Terrestrial Invertebrate Biomass. *Environmental Science and Technology* [online]. **54**(9), 5580–5588. ISSN 15205851. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.0c00711

SHIM, Won Joon, Young Kyoung SONG, Sang Hee HONG a Mi JANG, 2016. Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. *Marine Pollution Bulletin* [online]. **113**(1–2), 469–476. ISSN 18793363. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2016.10.049

SHRUTI, V. C., Fermín PÉREZ-GUEVARA, Priyadarsi D. ROY a Gurusamy KUTRALAM-MUNIASAMY, 2022. *Analyzing microplastics with Nile Red: Emerging trends, challenges, and prospects* [online]. 5. únor 2022. B.m.: Elsevier B.V. ISSN 18733336. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127171

SCHNAAK, W., Th. KÜCHLER, M. KUJAWA, K.-P. HENSCHKE, D. SÜSSENBAACH a R. DONAU, 1997. Organic contaminants in sewage sludge and their ecotoxicological significance in the agricultural utilization of sewage sludge. *Chemosphere*. **35**(1/2), 5–11.

SILVA, Ana B., Ana S. BASTOS, Celine I.L. JUSTINO, João P. DA COSTA, Armando C. DUARTE a Teresa A.P. ROCHA-SANTOS, 2018. *Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry - A review* [online]. 9. srpen 2018. B.m.: Elsevier B.V. ISSN 18734324. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2018.02.043

STANTON, Thomas, Matthew JOHNSON, Paul NATHANAIL, Rachel L. GOMES, Teresa NEEDHAM a Amanda BURSON, 2019. Exploring the Efficacy of Nile Red in Microplastic Quantification: A Costaining Approach. *Environmental Science and Technology Letters* [online]. **6**(10), 606–611. ISSN 23288930. Dostupné z: doi:10.1021/acs.estlett.9b00499

SUN, Jing, Xiaohu DAI, Qilin WANG, Mark C.M. VAN LOOSDRECHT a Bing Jie NI, 2019. *Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal* [online]. 1. duben 2019. B.m.: Elsevier Ltd. ISSN 18792448. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2018.12.050

SUN, Xinwei, A. N. ANOOPKUMAR, Aravind MADHAVAN, Parameswaran BINOD, Ashok PANDEY, Raveendran SINDHU a Mukesh Kumar AWASTHI, 2023. *Degradation mechanism of microplastics and potential risks during sewage sludge co-composting: A comprehensive review* [online]. 15. září 2023. B.m.: Elsevier Ltd. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2023.122113

SUNDT, Peter, Per-Erik SCHULZE a Frode SYVERSEN, 2014. *Sources of microplastic-pollution to the marine environment*.

SURENDRAN, U., M. JAYAKUMAR, P. RAJA, Girish GOPINATH a Padmanaban Velayudhaperumal CHELLAM, 2023. Microplastics in terrestrial ecosystem: Sources and

migration in soil environment. *Chemosphere* [online]. **318**. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2023.137946

TAGG, A. S., J. P. HARRISON, Y. JU-NAM, M. SAPP, E. L. BRADLEY, C. J. SINCLAIR a J. J. OJEDA, 2017. Fenton's reagent for the rapid and efficient isolation of microplastics from wastewater. *Chemical Communications* [online]. **53(2)**, 372–375. ISSN 1364548X. Dostupné z: doi:10.1039/c6cc08798a

THOMPSON, Richard C., Ylva OLSON, Richard P. MITCHELL, Anthony DAVIS, Steven J. ROWLAND, Anthony W.G. JOHN, Daniel MCGONIGLE a Andrea E. RUSSELL, 2004. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science* [online]. **304(5672)**, 838. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1094559

VAN DEN BERG, Pim, Esperanza HUERTA-LWANGA, Fabio CORRADINI a Violette GEISSEN, 2020. Sewage sludge application as a vehicle for microplastics in eastern Spanish agricultural soils. *Environmental Pollution* [online]. **261**. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2020.114198

VAN POMEREN, M., N. R. BRUN, W. J.G.M. PEIJNENBURG a M. G. VIJVER, 2017. Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages. *Aquatic Toxicology* [online]. **190**, 40–45. ISSN 18791514. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquatox.2017.06.017

WANG, Fen, Fei WANG a Eddy Y. ZENG, 2018. Sorption of toxic chemicals on microplastics. In: *Microplastic Contamination in Aquatic Environments: An Emerging Matter of Environmental Urgency* [online]. B.m.: Elsevier, s. 225–247. ISBN 9780128137475. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813747-5.00007-2

WANG, Chunhui, Jian ZHAO a Baoshan XING, 2021. *Environmental source, fate, and toxicity of microplastics* [online]. 5. duben 2021. B.m.: Elsevier B.V. ISSN 18733336. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124357

WANG, Teng, Baojie LI, Xinqing ZOU, Ying WANG, Yali LI, Yongjiang XU, Longjiang MAO, Chuchu ZHANG a Wenwen YU, 2019. Emission of primary microplastics in mainland China: Invisible but not negligible. *Water Research* [online]. **162**, 214–224. ISSN 18792448. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2019.06.042

WEBER, Annkatrin, Christian SCHERER, Nicole BRENNHOLT, Georg REIFFERSCHIED a Martin WAGNER, 2018. PET microplastics do not negatively affect the survival, development, metabolism and feeding activity of the freshwater invertebrate *Gammarus pulex*. *Environmental Pollution* [online]. **234**, 181–189. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2017.11.014

WENTWORTH, Chester K., 1922. A Scale of Grade and Class Terms for Clastic Sediments. *The Journal of Geology* [online]. **30(5)**, 377–392. Dostupné z: doi:https://www.jstor.org/stable/30063207

WRIGHT, Stephanie L., Richard C. THOMPSON a Tamara S. GALLOWAY, 2013. *The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review*. [online]. 2013. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2013.02.031

XIAO, Shuolin, Yuanfeng CUI, Janice BRAHNEY, Natalie M. MAHOWALD a Qi LI, 2023. Long-distance atmospheric transport of microplastic fibres influenced by their shapes. *Nature Geoscience* [online]. **16**(10), 863–870. ISSN 17520908. Dostupné z: doi:10.1038/s41561-023-01264-6

XU, Jun Li, Kevin V. THOMAS, Zisheng LUO a Aoife A. GOWEN, 2019. *FTIR and Raman imaging for microplastics analysis: State of the art, challenges and prospects* [online]. 1. říjen 2019. B.m.: Elsevier B.V. ISSN 18793142. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.115629

YARANAL, Naveenkumar Ashok, Senthilmurugan SUBBIAH a Kaustubha MOHANTY, 2021. Identification, extraction of microplastics from edible salts and its removal from contaminated seawater. *Environmental Technology and Innovation* [online]. **21**. ISSN 23521864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2020.101253

YASEEN, Aarif, Irfana ASSAD, Mohd Sharjeel SOFI, Muhammad Zaffar HASHMI a Sami Ullah BHAT, 2022. A global review of microplastics in wastewater treatment plants: Understanding their occurrence, fate and impact. *Environmental Research* [online]. **212**. ISSN 10960953. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2022.113258

ZÁKONY PRO LIDI, 2016. *Vyhláška o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady a změně vyhlášky č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady a o změně vyhlášky č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady (vyhláška o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady)*.

ZETTLER, Erik R., Tracy J. MINCER a Linda A. AMARAL-ZETTLER, 2013. Life in the „plastisphere“: Microbial communities on plastic marine debris. *Environmental Science and Technology* [online]. **47**(13), 7137–7146. ISSN 0013936X. Dostupné z: doi:10.1021/es401288x

ZHANG, Junjie, Lei WANG, Rolf U. HALDEN a Kurunthachalam KANNAN, 2019. Polyethylene Terephthalate and Polycarbonate Microplastics in Sewage Sludge Collected from the United States. *Environmental Science and Technology Letters* [online]. **6**(11), 650–655. ISSN 23288930. Dostupné z: doi:10.1021/acs.estlett.9b00601

ZHANG, Kai, Amir Hossein HAMIDIAN, Aleksandra TUBIĆ, Yu ZHANG, James K.H. FANG, Chenxi WU a Paul K.S. LAM, 2021. Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review. *Environmental Pollution* [online]. **274**. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2021.116554

ZHAO, Xiaoli, Junyu WANG, Kenneth Mei YEE LEUNG a Fengchang WU, 2022. *Color: An Important but Overlooked Factor for Plastic Photoaging and Microplastic Formation* [online]. 5. červenec 2022. B.m.: American Chemical Society. ISSN 15205851. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.2c02402

ZIAJAHROMI, Shima, Anupama KUMAR, Peta A. NEALE a Frederic D.L. LEUSCH, 2018. Environmentally relevant concentrations of polyethylene microplastics negatively impact the survival, growth and emergence of sediment-dwelling invertebrates. *Environmental Pollution* [online]. **236**, 425–431. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2018.01.094

ZIAJAHROMI, Shima a Frederic D.L. LEUSCH, 2022. *Systematic assessment of data quality and quality assurance/quality control (QA/QC) of current research on microplastics in biosolids and agricultural soils* [online]. 1. únor 2022. B.m.: Elsevier Ltd. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2021.118629