

## IDENTIFIKÁCIA A ANALÝZA MIKROPLASTOV Z VODNÉHO PROSTREDIA

ANDREA ŠKULCOVÁ<sup>a,b</sup>, ANNA GREŇČIKOVÁ<sup>c</sup>,  
NOEMI BELIŠOVÁ<sup>c</sup>, DMITRIJ BONDAREV<sup>d</sup>,  
PAVEL HORKÝ<sup>a</sup> a TOMÁŠ MACKULAK<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Katedra zoologie a rybárství, Fakulta agrobiologie potravinných a prírodných zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6 – Suchbátol,

<sup>b</sup> Oddelenie dreva, celulózy a papiera, Ústav prírodných a syntetických polymérov, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, <sup>c</sup> Oddelenie environmentálneho inžinierstva, Ústav chemického a environmentálneho inžinierstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, <sup>d</sup> Ústav polymérov SAV, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 41 Bratislava  
andrea.skulcova@gmail.com

Došlo 22.2.19, prijaté 24.4.19.

Kľúčové slová: mikroplasty, SEM, FTIR, Ramanova spektroskopia, identifikácia

## Obsah

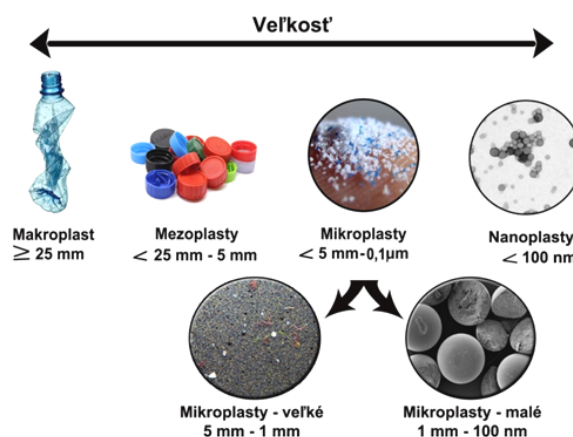
1. Úvod
2. Odber a izolácia vzorky
  - 2.1. Izolácia mikroplastov z kvapalín
  - 2.2. Izolácia mikroplastov zo sedimentu
  - 2.3. Izolácia mikroplastov z biologických vzoriek
3. Čistenie izolovaných vzoriek mikroplastov
4. Identifikácia a kvantifikácia vzoriek mikroplastov
  - 4.1. Vizualná detekcia
  - 4.2. Skenovacia elektrónová mikroskopia
  - 4.3. Infračervená spektroskopia
  - 4.4. Ramanova spektroskopia
  - 4.5. Pyrolýza spojená s plynovou chromatografiou a hmotnostnou spektroskopiou (py-GC-MS)
  - 4.6. NMR spektroskopia
5. Vývoj nových analytických metód
6. Záver

## 1. Úvod

V 20. storočí sa plasty stali každodennou súčasťou ľudského života a základným materiálom v mnohých priemyselných odvetviach, najmä vďaka ich relatívne jednoduchšej a lacnej výrobe, a tiež vďaka ich vlastnostiam, kto-

ré sa líšia v závislosti od ich druhu. Celosvetová produkcia plastov stúpila z 1,5 miliónov ton v roku 1950 na hodnotu 335 miliónov ton v roku 2016 (cit.<sup>1</sup>). Pri celkovom množstve plastu vyprodukovaného do roku 2015, ktorý je vedcami odhadovaný až na hodnotu 8300 miliónov ton, tvorí odpad až 6300 miliónov ton (cit.<sup>2</sup>). Z tohto množstva odpadu je recyklovaných približne len 9 %, 12 % bolo spaľených a až 79 % skládkovaných alebo akumulovaných v rôznych zložkách životného prostredia. Správy o plastových objektoch s rozmerom 2,5–5 cm pozorovaných v Sargasovom mori boli po prvý raz publikované v práci Carpenter a Smith v roku 1972 (cit.<sup>3</sup>). V roku 2004 boli častice milimetrových a menších rozmerov pomenované ako „mikroplasty“. V roku 2008 bol v Tacome vo Washingtonu (USA) na memorande Národnej oceánskej a atmosférickej kancelárie (National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA) uvedený návrh definovať mikroplasty všeobecne ako častice s veľkosťou menšou ako 5 mm (obr. 1). Od roku 2009, kedy bolo memorandum publikované, bola táto definícia všeobecne prijatá.

Mikroplasty sa dostávajú do životného prostredia prostredníctvom rôznych dráh, pričom takmer vždy majú terestriálny pôvod. Rozoznávame primárne a sekundárne zdroje mikroplastov. Primárne mikroplasty sú cielene vyrábané plastové častice malých rozmerov pridávané najmä do kozmetických prípravkov<sup>4,5</sup>, alebo do prípravkov určených na tryskové čistenie náterov, hrdze<sup>6</sup> alebo nadmerne znečistených trupov lodí<sup>7</sup>. Sekundárne mikroplasty sú fragmenty vzniknuté rozpadom väčších plastov vplyvom degradácie<sup>8</sup> a fyzikálneho pôsobenia vonkajších síl, napríklad pri skládkovaní<sup>9</sup> a vplyvom mechanických pohybov vo vodných tokoch<sup>10</sup> a vzduchu<sup>11</sup>.



Obr. 1. Rozdelenie plastov podľa veľkosti

Veľkým zdrojom mikroplastov je odevný priemysel. Pránič syntetického textilu sa do odpadovej vody uvoľňujú vlákna polyesteru, polyamidu, akrylu alebo iných zlúčenín. Tieto vlákna sa vzhľadom na svoje rozmery nezachytávajú na čistiarni odpadových vôd, ale prechádzajú ďalej do riek až sa dostávajú do morí a oceánov, kde sú často detegované v sedimentoch<sup>12</sup>.

Intenzívna snaha o zmapovanie distribúcie (nie len) plastového odpadu v príromskom a oceánskom prostredí siaha do 80. až 90. rokov minulého storočia, kedy bola publikovaná správa Charlesa Moora, ktorá popisovala tzv. Veľký pacifický kôš – miesto so zvýšenou koncentráciou oceánskeho plastového odpadu. Vplyvom oceánskych prúdov sú plastové zvyšky unášané a kumulované, čím dochádza k vytváraniu špecifických zón s vyššou koncentráciou plastových fragmentov<sup>13</sup>. Ich distribúcia vo vodnom prostredí je ovplyvnená hustotou častíc, miestom kde sa nachádza ich zdroj a hydrodynamickými pomermi, umožňujúcimi ich jednoduché šírenie<sup>14,15</sup>. Súčasný výskum potvrdil prienik mikroplastov do celosvetových vodných ekosystémov<sup>16–18</sup>. Vzhľadom na stanovenie skutočného rizika, ktoré mikroplasty predstavujú, je nevyhnutné vypracovať a implementovať do praxe štandardné protokoly na odber, kvantifikáciu a charakterizáciu mikroplastov. Analytické techniky zahŕňajú najmä odber vzorky, úpravu vzorky, identifikáciu a kvantifikáciu mikroplastov, prípadne nanoplastov, z rôzneho prostredia (voda, sedimenty, biologické tkanivá). Napriek veľkému záujmu o tému mikroplastov je vo výskumnej oblasti stále nedostatok štandardizovaných metód na ich extrakciu, predovšetkým zo sedimentu.

## 2. Odber a izolácia vzorky

Mikroplasty možno nájsť vo vode od jej povrchu až k sedimentu a tiež v rôznych tkanivách a bunkách vodných organizmov<sup>19</sup>. Na odber vzorky existuje niekoľko spôsobov v závislosti od miesta výskytu vzorky. Pre vzorky, ktoré plávajú na povrchu, je vhodné použiť zberáky s obdĺžnikovým vstupom a so zberným vreckom zo sieťoviny. Pre odber vzoriek v strednej časti vodnej hladiny je vhodné použiť tzv. bongo siete kónického tvaru. Na vzorky nachádzajúce sa vo vodných sedimentoch sa využívajú rôzne zariadenia. Pre odber povrchových sedimentov sa využívajú zariadenia, ktoré len minimálne narúšajú povrch sedimentu, napríklad účinkom jemných vln. Niektoré vzorky z morského dna je možné odobrať pomocou kovových lyžíc, alebo pomocou sietí. Veľkosť ôk na sieťach sa pohybuje v rozmedzí 53  $\mu\text{m}$  až do 3 mm v závislosti od zariadenia, čo ďalej ovplyvňuje povahu odobratých vzoriek. Z biologických tkanív sa vzorky odoberajú pitvaním živočíchov, alebo odoberaním z tiel po ich vyplavení, prípadne po samovoľnom úniku vzorky z tráviaceho systému<sup>20</sup>.

Podľa práce Hidalgo-Ruz a spol.<sup>21</sup> môžeme spôsoby odberu vzoriek z morskej bioty rozdeliť nasledovne:

a) selektívny odber vzorky (najčastejšie sediment) – zber

priamou extrakciou, vzorku možno identifikovať voľným okom (častice veľkosti 1–5 mm),

- b) objemový odber vzorky (voda, sediment) – komplexný zber bez triedenia vzorky,  
 c) objemovo-redukujúci odber vzorky (voda, sediment) – po komplexnom odbere vzorky sa zachová len požadovaná časť z celého objemu.

Počas odberu vzorky je dôležité identifikovať potenciálny zdroj kontaminácie plastov a minimalizovať ďalšie znečistenia, ktoré by mohli vzniknúť počas odberu vzoriek.

### 2.1. Izolácia mikroplastov z kvapalín

Z kvapalných vzoriek získaných z morskej vody sa mikroplasty najčastejšie izolujú filtráciou<sup>21,22</sup>. Vo väčšine prípadov sa využíva filtračná aparatúra s lievikom a filtračným médiom (papier) pod vákuom. Mikroplasty sa zachytia na filtračnom médiu s veľkosťou pórov 1–2  $\mu\text{m}$ . Aby sa zabránilo znečisteniu filtračného média v dôsledku iných tuhých častíc obsiahnutých vo vode, môže sa postupovať dvoma spôsobmi: zníži sa filtrovaný objem alebo sa vzorka najprv prečistí. Ďalšou možnosťou je použiť na frakcionáciu mikroplastov sitá. Veľkosť ôk závisí od veľkosti mikroplastových častíc, ale pohybuje sa v rozmedzí 38  $\mu\text{m}$  – 4,75 mm.

### 2.2. Izolácia mikroplastov zo sedimentu

Zo sedimentu sa najčastejšie mikroplasty izolujú na základe rôznej hustoty, flotáciou alebo elúciou plastových častíc a častíc sedimentu. Do procesu delenia na základe hustoty sa pridáva soľ, ako napr. NaCl (cit.<sup>23</sup>) alebo NaI (cit.<sup>24,25</sup>), prípadne  $\text{ZnCl}_2$  (cit.<sup>26,27</sup>). Aj keď je využitie NaCl výhodné z hľadiska ceny aj vplyvu na životné prostredie, jeho nízka hustota (1,2 g  $\text{cm}^{-3}$ ) nie je vhodná na všetky druhy polymérov. Vhodnejší sa javí NaI (1,8 g  $\text{cm}^{-3}$ ) alebo roztok  $\text{ZnCl}_2$  (1,5–1,7 g  $\text{cm}^{-3}$ ). Po izolácii vrstvy s mikroplastom nasleduje filtrácia a frakcionácia, resp. sitovanie. Pri flotácii sa využíva vzťah mikroplastov k vode, teda ich hydrofóbnosť alebo hydrofilita. Do vzorky sa pridáva povrchovo aktívna zlúčenina a hydrofóbnosť častice sa odoberajú z procesu spolu so vznikajúcou penou.

### 2.3. Izolácia mikroplastov z biologických vzoriek

Odber mikroplastu z biologických vzoriek závisí najmä od veľkosti organizmu. Odber vzorky zahŕňa pitvu a odber mikroplastu z tela organizmu pomocou pinzety. Ďalšou možnosťou je vyplavenie mikroplastu pomocou vody, čo sa využíva najmä u morských vtákov ako súčasť monitoringu. V prípade veľmi malých organizmov, medzi ktoré patrí napríklad zooplanktón, je vizuálna identifikácia takmer nemožná. Zooplanktón, ktorý bol vystavený požitiu mikroplastov s rozmermi  $\leq 31 \mu\text{m}$  v priemere, vylučuje možnosti pitvy a vizuálnej identifikácie<sup>28</sup>. Na separáciu mikroplastov sa využíva chemický alebo enzymatický rozklad organického materiálu. Na rozklad týchto malých

organizmov sa využívajú najmä kyseliny (kyselina dusičná, kyselina dusičná: kyselina chlór vodíková v pomere 3:1 obj:obj, peroxid vodíka, kyselina dusičná: kyselina chloristá v pomere 1:1 obj:obj)<sup>24</sup>, zásady (hydroxid sodný, hydroxid draselný)<sup>24,29</sup>, a príslušné enzýmy (proteináza-K, lipáza, celulóza, chitináza)<sup>28</sup>, ktoré by boli schopné ich rozložiť aj v prirodzenom prostredí, napr. v žalúdku ryby. Problémom pri aplikácii chemikálií môže byť ich vplyv na menšie mikroplasty vo forme vlákien. Najčastejšie používanou metódou, odporúčanou aj Medzinárodnou radou pre výskum mora (International Council for the Exploration of the Sea, ICES), je kyslý rozklad biologických tkanív s využitím zmesi 65% HNO<sub>3</sub> a 68% HClO<sub>4</sub> v pomere 4:1 (obj:obj)<sup>30</sup>. V procese dochádza ku kompletnému rozkladu tkanív a organických zlúčenín, pričom sa zachovávajú plasty a kremičitany. V priebehu metódy dochádza aj k rozpúšťaniu vlákien umelého hodvábu (viskózy), ktorý sa vyrába z regenerovanej celulózy a jeho zaradenie medzi mikroplasty je diskutabilné<sup>30</sup>. Ďalšie metódy zahŕňajú použitie kyseliny dusičnej, peroxidu vodíka a hydroxidu sodného s vysokým výtlačkom polystyrénu (94–98 %), ale s nestabilným výtlačkom nylónových vlákien (0–98 %)<sup>24</sup>. V prípade peroxidu vodíka sa ukázalo, že nie vždy dochádza k rozpusteniu všetkých organických tkanív a niekedy dochádza k značnej strate mikroplastov špecifickej veľkosti<sup>31</sup>. Vhodnejšou možnosťou sa preto zdá použitie enzýmov ako napr. proteinázy, lipázy, celulózy alebo chitinázy<sup>32</sup>. Národná oceánska a atmosférická kancelária (National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA) už vypracovala memorandum, ktoré zahŕňa postupy a laboratórne metódy na analýzu mikroplastov v morskom prostredí so zameraním na kvantifikáciu syntetických častíc vo vode aj v sedimente<sup>33</sup>. Čiastkové kroky, ktoré sú v memorande zhrnuté pre plasty polyetylén, polypropylén, polyvinylchlorid a polystyrén sú nasledovné:

- analýza mikroplastov vo vode,
- zber sieťou na hladine – 15 min,
- filtrácia tuhých častíc cez sieť s okami 0,335 mm,
- sušenie sypkých materiálov – stanovenie tuhých častíc,
- mokrú peroxidovú oxidáciu tuhých častíc (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) v prítomnosti 0,05 M Fe (II) roztoku ako katalyzátora – odstránenie nestálych organických častíc,
- flotácia získanej zmesi (napr. 5 M NaCl, d = 1,15 g ml<sup>-1</sup>) – izolácia plastových nečistôt,
- zber a sušenie plastových nečistôt – separátor 0,3 mm filter,
- váženie plastových nečistôt – stanovenie koncentrácie mikroplastov.

Nakoľko je metodika použiteľná len pre vybrané druhy plastov v rozmedzí veľkosti 0,3–5 mm, rozsah identifikácie mikroplastov v oceáne je obmedzený.

### 3. Čistenie izolovaných mikroplastov

Každý povrch vystavený morskej alebo sladkej vode je časom zanášaný rôznymi nečistotami, zvyčajne vrstvou

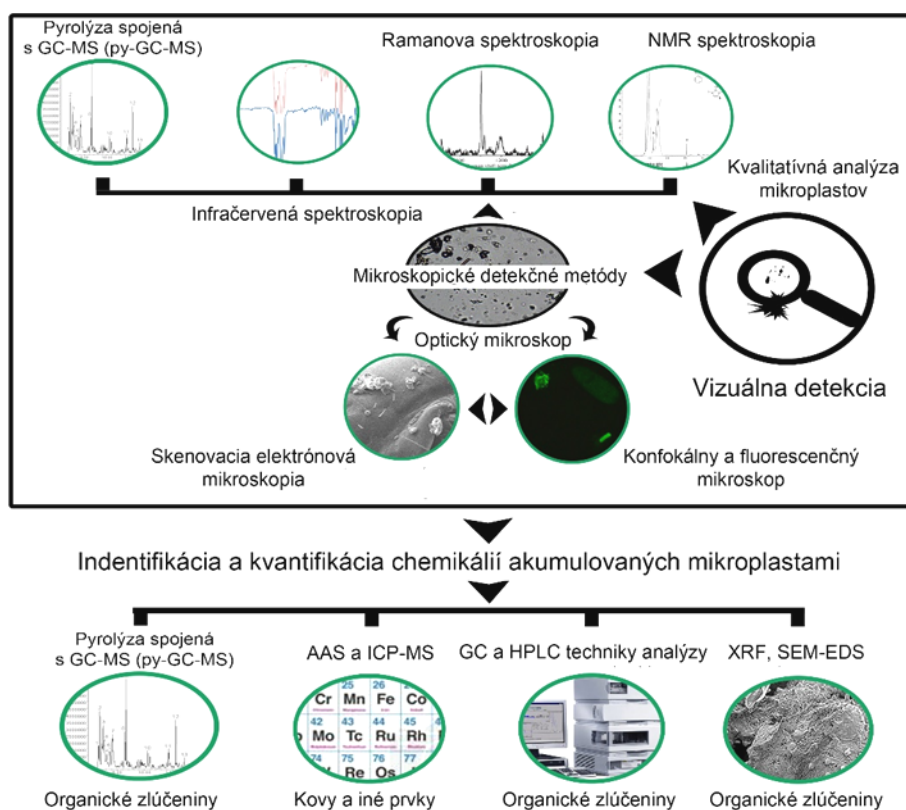
mikroorganizmov (baktérie, riasy, huby alebo planktón). Prítomnosť biologického znečistenia možno stanoviť elementárnou analýzou cez prítomnosť dusíka. Zmeny na povrchu mikroplastu so sebou prinášajú rôzne problémy pri identifikácii, najmä pri vizuálnej detekcii, kedy sa treba zamerať na farbu, štruktúru a tvar vzorky. Negatívne ovplyvnené môžu byť tiež techniky, ktoré na identifikáciu využívajú povrchové skúmanie, ako napr. FTIR analýza alebo Ramanova spektroskopia. Preto sa po separácii odporúča zaradiť krok čistenia vzorky s využitím chemikálií (HCl, NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), vody, enzýmov, prípadne ultrazvuku. Krok čistenia sa v niektorých prácach prekrýva s procesom izolácie, kedy sa často využívajú kyseliny a enzýmy<sup>34</sup>. Aj pri čistení vzorky môže dochádzať k jej znehodnoteniu, čo sa týka najmä polymérnych vlákien v kombinácii s peroxidom vodíka. V prípade, že vzorka nie je značne znečistená a pri separácii sa využíval chemický postup, nie je potrebné krok čistenia vzorky do procesu zaradiť. Pri väčších mikroplastoch sa odporúča zoškrabať povrchovú vrstvu skalpelom a následne vykonať analýzu.

### 4. Identifikácia a kvantifikácia mikroplastov

V súčasnosti neexistuje všeobecný laboratórny protokol na odber, identifikáciu a kvantifikáciu mikroplastov v prostredí. Nakoľko je väčšina priemyselne vyrábaných plastov miešaná s plnivami, inými aditívami, alebo ide o kopolyméry, je veľmi náročné identifikovať získané fragmenty z prostredia. Najjednoduchším spôsobom na detekciu mikroplastov je ich vizuálna identifikácia, po ktorej nasleduje potvrdenie s využitím chemickej (inštrumentálnej) analýzy, najčastejšie v kombinácii s optickým mikroskopom a s využitím spektroskopických techník, aby sa zamedzilo chybné identifikácii<sup>21,35,36</sup> (obr. 2).

#### 4.1. Vizuálna detekcia

Prvotné hodnotenie vzorky sa vykonáva na základe vizuálneho pozorovania a to voľným okom (0,5–5 mm), alebo s využitím optického mikroskopu (1 μm – 0,5 mm). Pomocou mikroskopu dokážeme získať informácie o povrchovej štruktúre častíc, ktoré boli voľným okom nejednoznačne definované, ale sledujeme aj ich farbu a tvar. Z hľadiska tvaru mikroplastov sa potvrdilo, že na povrchu vody sa nachádzajú predovšetkým častice listového tvaru a rôzne ploché fragmenty, zatiaľ čo v sedimente sa našli predovšetkým penové častice a častice podlhovastého tvaru. Vizuálna identifikácia je rýchla, jednoduchá a lacná metóda, ktorú možno vykonávať priamo na mieste (tab. I). Ťažkosti môžu spôsobovať častice z iných materiálov, ktoré sú farebne podobné plastom. Okrem mikroskopu možno pri vizuálnom hodnotení použiť aj lupu, avšak vždy v kombinácii s následnou spektroskopickou analýzou, ako napríklad s FTIR alebo Ramanovou spektroskopiou. V práci Lenz a spol.<sup>37</sup> sa celkovo skúmalo 452 vlákien a 827 častíc, ktoré boli vizuálne vyhodnotené ako plasty. Po Ramanovej spektroskopii sa ukázalo, že iba 75 % vlá-



Obr. 2. Schematické zobrazenie identifikácie a kvantifikácie mikroplastov

kien a 64 % častíc boli skutočne plastom. Pre zachovanie prirodzenej bioty, v ktorej sa vzorky nachádzali, možno použiť na fixáciu 4% roztok formaldehydu<sup>38</sup>.

Efektívita vizuálneho hodnotenia je do istej miery subjektívna metóda a závisí od veľkosti skúmaného materiálu. Pri kategorizácii mikroplastu sa odporúča postupovať podľa systému na štandardizované zatriedenie vzorky podľa veľkosti a farby (SCS System)<sup>40</sup>.

#### 4.2. Skenovacia elektrónová mikroskopia

Použitie elektrónového mikroskopu umožňuje ľahšie odlišenie mikroplastu od organického materiálu<sup>41</sup>. Kombináciou techník SEM-EDS (skenovací elektrónový mikroskop s energetickým disperzným röntgenovým spektrometrom) možno jednoduchšie odlišiť anorganické materiály od plastových častíc s komplikovanejším zložením, avšak metodika je cenovo a časovo náročná na prípravu vzorky<sup>42</sup>. Použitím SEM však nemožno rozlíšiť vzorky na základe farby, teda metodika je vhodná len pre špecifické druhy plastu<sup>43</sup>. V stopových množstvách možno detegovať

#### Tabuľka I

Kritéria na vizuálnu identifikáciu mikroplastov<sup>39</sup>

---

Častica alebo vlákno nemá viditeľnú organickú, alebo bunkovú štruktúru

---

Vlákno je rovné, neohýba sa ani sa nezužuje

---

V prípade červených vlákien sa odporúča použiť mikroskop s vysokým rozlíšením, fluorescenčný mikroskop a metódu farbenia chloroplastu, aby sa vylúčilo, že ide o riasu

---

Častice sú čisté a farebne stábe

---

V prípade transparentných, belavých a bielych častíc, sa odporúča mikroskopia s vysokým rozlíšením a fluorescenčná mikroskopia, aby sa vylúčil biologický pôvod

---

Al, Na, Ca, Mg a Si, ktoré môžu byť súčasťou plnív plastov, ale tiež môžu byť prítomné v dôsledku neskoršej adsorbpcie na povrch fragmentu<sup>42</sup>. Plastové častice PVC veľkosti 70–600  $\mu\text{m}$  možno dobre identifikovať pomocou SEM-EDS vďaka chlóru, ktorý molekula obsahuje. Priehľadné guľovité častice, voľným okom definované ako mikroplasty, boli pomocou mikro-FTIR analýzy identifikované ako kremičitan hlinitý, avšak pomocou SEM analýzy sa zistilo, že išlo o rozsievky, patriace medzi mikroriasy<sup>44</sup>. Snímky z elektrónového mikroskopu môžu odhaliť aj trhliny a nerovnosti na povrchu mikroplastu, čo môže pomôcť pri skúmaní procesu jeho degradácie v prostredí<sup>44</sup>. Na rozdiel od spektroskopických metód, nie je možné s využitím SEM identifikovať chemické zloženie mikroplastu. V prípade kombinácie SEM-EDS je však možné identifikovať anorganické aditíva.

### 4.3. Infračervená spektroskopia

Infračervená spektroskopia s Furierovou transformáciou (FTIR) je najpopulárnejšou a najrozšírenejšou technikou na identifikáciu typu plastu, z ktorého pochádza mikroplast nájdený v prostredí. Je to veľmi presná, čistá a spoľahlivá metóda, pri ktorej sa dajú jednoducho rozlíšiť plasty od prírodných materiálov vďaka špecifickým pásom, ktoré v spektrách vykazujú. Jednotlivé čisté plasty majú špecifickú štruktúru, a preto dva rôzne čisté plasty nemajú rovnaké infračervené spektrá, čo umožňuje ich jednoznačnú identifikáciu (ak nie sú v zmesi)<sup>45</sup>. Infračervená spektroskopia je rýchla a jednoduchá metóda na identifikáciu funkčných skupín v polymérnej matici, čo umožňuje najmä skúmanie v oblasti odtlačkov prstov (finger prints region) 1450–400  $\text{cm}^{-1}$ . Pred FTIR identifikáciou je vhodné odstrániť zo vzorky biologický materiál účinkom 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (cit.<sup>46</sup>). V prípade využitia transmisných techník treba zabezpečiť priehľadnosť polyméru. Nepriehľadné polyméry možno nanášať v tenkom filme na KBr tabletu, rozpúšťať v rozpúšťadle alebo pripraviť disperziu polyméru s minerálnym olejom. Pre zjednodušenie analýzy sa odporúča využívať reflektančné techniky (napr. ATR – metóda zoslabeného celkového odrazu)<sup>47</sup>. Aj pri využití ATR sú isté obmedzenia na vlastnosti plastového materiálu. Vyžaduje sa, aby mal analyzovaný materiál nižší index lomu ako kryštál, ktorý je súčasťou zariadenia. Vzorky pre infračervenú spektroskopiu musia byť väčšie ako 10 až 20  $\mu\text{m}$ , pričom pre vzorky, ktoré sú menšie ako 500  $\mu\text{m}$ , sa odporúča použiť FTIR spektroskopiu vo viacerých módoch (transmitancia, reflektancia)<sup>48</sup>. Namerané IR spektrum sa vyhodnocuje s využitím elektronickej databázy referenčných spektier. Namerané a referenčné spektrá sa môžu v malej miere líšiť vplyvom nečistôt alebo v dôsledku degradácie mikroplastov (vznik nových skupín). Tieto zmeny sa môžu prejaviť vznikom absorpčného pásu (napr. 1715  $\text{cm}^{-1}$  pre polyetylén a polypropylén alebo pri 3000  $\text{cm}^{-1}$  pre polyetylén) v dôsledku prítomnosti karboxylových a hydroxylových skupín<sup>11</sup>. Pre rýchlejšiu analýzu možno využiť aj NIR spektroskopiu, ktorá je menej citlivá na čistotu vzorky<sup>49</sup>.

### 4.4. Ramanova spektroskopia

Ramanova spektroskopia je spolu s infračervenou spektroskopiou najviac používaná technika na charakterizáciu mikroplastov a ich využitie je odporúčané Rámcovou smernicou o námornej stratégii (Marine Strategy Framework)<sup>50</sup>. Ramanovú spektroskopiu možno analyzovať vzorky väčšie ako 1  $\mu\text{m}$  a umožňuje sledovať veľmi malé rozdiely pri molekulovej konformite polymérov, pri stupni kryštalinity s ohľadom na amorfné oblasti a pri sledovaní stereoregularity polyméru<sup>51</sup>. Vzhľadom k tomu, že väčšina polymérov sa nevyskytuje ako čistá látka, obsahujú tiež aditíva – plnivá a farebné pigmenty, ktoré absorbujú svetlo a tým sa vzorka zahrieva. Dochádza k redukcii Ramanovho signálu a k termickému znehodnoteniu vzorky. Ramanova spektroskopia je tiež obmedzená v prípade vystavenia vzorky UV žiareniu. Vplyvom UV žiarenia dochádza k redukcii intenzity signálu charakteristických pásov a môže dochádzať k chybným interpretáciám spektra. V porovnaní s FTIR spektroskopiou dosahuje Ramanova spektroskopia lepšiu odozvu nepolárnych symetrických väzieb, zatiaľ čo pri FTIR je jasnejšia identifikácia polárnych skupín<sup>37</sup>. Pri Ramanovej spektroskopii je výhodou lepšie rozlíšenie a nižšia interferencia s vodou v porovnaní s FTIR.

### 4.5. Pyrolýza spojená s plynovou chromatografiou a hmotnostnou spektroskopiou (py-GC-MS)

V tomto prípade sa jedná o deštruktívnu metódu na charakterizáciu mikroplastov z hľadiska analýzy degradačných produktov daného polyméru<sup>45</sup>. Pyrolýza je dej založený na termickej degradácii materiálu v inertnej atmosfére, alebo vo vákuu, pri teplote 200–600  $^{\circ}\text{C}$  za vzniku nízkomolekulových rozkladných produktov. Nie je potrebná žiadna predúprava vzorky a množstvo vzorky je v rozsahu 5–200  $\mu\text{g}$  (cit.<sup>52</sup>). Touto metodikou je možné súbežne identifikovať typ polyméru a organického plniva<sup>53</sup>. Z morských sedimentov sa v práci Fries a spol.<sup>53</sup> podarilo identifikovať častice polyetylénu, polypropylénu, polystyrénu, polyamidu, chlórovaného a chlórulosulfonovaného polyetylénu a zároveň polyméry obsahujúce dietylhexylftalát, dibutylftalát, dietylftalát, diizobutylftalát, dimetylftalát, benzaldehyd a 2,4-di-*tert*-butylfenol. S využitím py-GC-MS nie je možné rozlíšiť nízko- a vysokohustotný polyetylén od vysokohustotného. Obmedzenia sú aj v dávkovaní vzorky, pretože každá vzorka sa testuje separátne a dávkuje sa individuálne. Taktiež nie je možné stanoviť početnosť alebo morfológiu mikroplastov, pretože sa testuje vždy len časť jednej konkrétnej vzorky. Odporúča sa najprv vykonať selekciu častíc s využitím optických techník. Na základe týchto informácií boli vyvinuté nové kombinované techniky, ktoré by nevyžadovali predtriedenie vzorky. Ide napríklad o termo-extrakciu a desorpciu spojenú s plynovou chromatografiou s hmotnostnou spektroskopiou (TED-GC-MS), prípadne o ich kombináciu s termogravimetrickou analýzou (TGA)<sup>54</sup>.

#### 4.6. NMR spektroskopia

Pri NMR spektroskopii je možné získať informácie o chemickej štruktúre polymérneho reťazca plastových materiálov, detailné informácie o monóméroch v prípade kopolymérnych zlúčenín, stupeň kryštalinity pri semi-kryštalických polyméroch a tiež informácie o vetvení a takticitě. Vyžaduje sa však 10–50 mg rozpustenej vzorky, čo vedie k strate informácie o veľkosti vzorky, avšak NMR spektroskopia v tuhom stave nie je považovaná za dostatočne citlivú metódu. Dôležité je nájsť vhodné rozpúšťadlo, ktoré by neprekývalo signál polyméru<sup>55</sup>.

### 5. Vývoj nových analytických metód

Na identifikáciu a charakterizáciu mikroplastov sa neustále vyvíjajú a zavádzajú nové technológie, ktoré sa líšia najmä v spôsobe úpravy vzorky. Jednou z novších metód je napríklad extrakcia so stlačenou kvapalinou (Pressurized Fluid Extraction, PFE)<sup>56</sup>, ktorá slúži na lepšiu kvantifikáciu mikroplastov z komplexnej vzorky obsahujúcej aj komunálny odpadový materiál a vzorky pôdy<sup>56</sup>. V roku 2017 navrhol Coppock a spol.<sup>57</sup> malé prenosné zariadenie na jedнокrokovú extrakciu mikroplastov z morských sedimentov fungujúce na princípe hustoty. Účinnosť získavania mikroplastov zo sedimentu bola 96 %. Ďalšou možnosťou je kvantifikácia mikroplastov na základe selektívneho fluorescenčného značenia s použitím lipofilného farbiva Nile Red<sup>58</sup>. Farbivo sa adsorbuje na povrchu plastu (> 100 μm) a pri interakcii s modrým svetlom fluoreskuje. Veľkou výzvou v oblasti analýzy mikroplastov sú častice, ktoré majú rozmery 20 nm – 10 μm. Pri ich izolácii a analýze dochádza k problémom, najmä ak sú súčasťou sedimentu.

V životnom prostredí, a to najmä vo vode, sú plastové fragmenty schopné akumulovať kontaminanty, ako napríklad PCB<sup>59,60,61</sup>, DDT<sup>60</sup>, PAH<sup>62,63</sup>, kovy<sup>64,65</sup> ale aj antibiotiká<sup>66</sup>, čo sťažuje ich identifikáciu. Niektoré práce sa preto venujú analýze chemických zlúčenín nahromadených v mikroplastoch, pričom sa využívajú techniky ako GC-ECD, GC-MS, XRF, prípadne SEM-EDS.

### 6. Záver

Na to, aby mohli byť výsledky z analytických meraní medzi sebou porovnateľné, je nevyhnutné používať štandardizované metódy a postupy. Počas celého procesu od odberu vzorky až po jej analýzu treba dbať na prevenciu a zabrániť kontaminácii vzorky – odporúča sa práca so sklenenými pomôckami, bavlnený oblek, bavlnené rukavice a kontrolná vzorka<sup>67</sup>. V oblasti detekcie, identifikácie a kvantifikácie mikroplastov v prostredí zatiaľ neexistuje štandardný protokol, čo má negatívny vplyv na medzilaboratórne porovnanie výsledkov. Odporúča sa používať certifikované referenčné materiály so známou koncentráciou, paralelné merania a odhady neistôt, či iných chýb.

*Táto práca bola finančne podporená z projektu Európskeho fondu regionálneho rozvoja “Centrum pro studium vzniku a transformací nutričně významných látek v potravním řetězci v interakci s potenciálně rizikovými látkami antropogenního původu: komplexní posouzení rizika kontaminace půdy pro kvalitu zemědělské produkce” (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000845).*

*Autori ďakujú STU za finančnú podporu v rámci Grantovej schémy na podporu mladých výskumníkov: Mikroplasty – riziko pre životné prostredie na Slovensku, a v rámci Grantovej schémy na podporu excelentných tímov mladých výskumníkov: Mikroplasty vo vodách Slovenska - monitoring a možnosti použitia inovatívnych postupov na ich odstránenie.*

#### Zoznam skratiek

ATR	spektroskopia zoslabeného celkového odrazu
FTIR	infračervená spektroskopia s Furierovou transformáciou
GC-ECD	plynová chromatografia s detektorom elektrónového záchytu
GC-MS	plynová chromatografia s hmotnostným spektrometrom
ICES	Medzinárodná rada pre výskum mora
NOAS	Národná oceánska a atmosférická kancelária
PA	polyamid
PE	polyetylén
PET	polyetyléntereftalát
PFE	extrakcia so stlačenou kvapalinou
PP	polypropylén
PS	polystyrén
py-GC-MS	pyrolýza spojená s plynovou chromatografiou a hmotnostnou spektroskopiou
SCS	štandardizovaný systém zatriedenia plastových fragmentov podľa veľkosti a farby
SEM	skenovacia elektrónová mikroskopia
SEM-EDS	skenovacia elektrónová mikroskopia s energetickým disperzným röntgenovým spektrometrom
TED-GC-MS	termo-extrakcia a desorpcia spojená s plynovou chromatografiou s hmotnostnou spektroskopiou
TGA	termogravimetrická analýza
XRF	röntgenová fluorescenčná spektroskopia

#### LITERATÚRA

- <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950>, stiahnuté 13.2.2019.
- Geyer R., Jambeck J. R., Law K. L.: Sci. Adv. 3,

- e1700782 (2017).
3. Carpenter E. J., Smith K. L.: *Science* 175, 1240 (1972).
  4. Gregory M. R.: *Mar. Pollut. Bull.* 32, 867 (1996).
  5. Godoy V., Martín-Lara M. A., Calero M., Blázquez G.: *Mar. Pollut. Bull.* 139, 91 (2019).
  6. Derraik J. G.: *Mar. Pollut. Bull.* 44, 842 (2002).
  7. Syberg K., Khan F. R., Selck H., Palmqvist A., Banta G. T., Daley J., Sano L., Duhaime M. B.: *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 945 (2015).
  8. Ryan P. G., Moore C. J., van Franeker J. A., Moloney C. L.: *Biol. Sci.* 364, 1999 (2009).
  9. Grenčíková A., Brandeburová P., Ryba J., Vlčková S., Mackuřák T.: *Chem. Listy* 113, 16 (2019).
  10. da Costa J. P., Santos P. S. M., Duarte A. C., Rocha-Santos T.: *Sci. Total Environ.* 566–567, 15 (2016).
  11. Cai L., Wang J., Peng J., Tan Z., Zhan Z., Tan X., Chen, Q.: *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 24928 (2017).
  12. De Falco F. a 14 spoluautorov: *Environ. Pollut.* 236, 916 (2018).
  13. Moore C. J., Moore S. L., Leecaster M. K., Weisberg S. B.: *Mar. Pollut. Bull.* 42, 1297 (2001).
  14. Kukulka T., Proskurowski G., Morét-Ferguson S., Meyer D., Law K.: *Geophys. Res. Lett.* 39, 7601 (2012).
  15. Magnusson K., Eliasson K., Fråne A., Haikonen, K., Hutlén, J., Olshammar M., Stadmark J., Voisin A. Björndal K.: <https://www.naturvardsverket.se/upload/miljoarbete-i-samhallet/miljoarbete-i-sverige/regeringsuppdrag/2016/mikroplaster/swedish-sources-and-pathways-for-microplastics-to-marine%20environment-ivl-c183.pdf>, stiahnuté 13.2.2019.
  16. Barnes D. K. A., Galgani F., Thompson R. C., Barlaz M.: *Biol. Sci.* 364, 1985 (2009).
  17. Lusher A. L., Tirelli V., O'Connor I., Officer R.: *Sci. Rep. UK* 5, 14947 (2015).
  18. Lusher A. L., Hernandez-Milian G., O'Brien J., Berrow S., O'Connor I., Officer R.: *Environ. Pollut.* 199, 185 (2015).
  19. <https://www.cbd.int/doc/publications/cbd-ts-83-en.pdf>, stiahnuté 13.2.2019.
  20. Lusher A., Hollman P., Mendoza-Hill J.: <http://www.fao.org/3/a-i7677e.pdf>, stiahnuté 13.2.2019.
  21. Hidalgo-Ruz V., Gutow L., Thompson R. C., Thiel M.: *Environ. Sci. Technol.* 46, 3060 (2012).
  22. Bannick C. G., Szewzyk R., Ricking M., Schniegler S., Obermaier N., Barthel A. K., Altmann K., Eisen-traut P., Braun U.: *Water Res.* 149, 650 (2019).
  23. Claessens M., De Meester S., Van Landuyt L., De Clerck K., Janssen C. R.: *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2199 (2011).
  24. Claessens M., Van Cauwenberghe L., Vandegehuchte M. B., Janssen C. R.: *Mar. Pollut. Bull.* 70, 227 (2013).
  25. Dekiff J. H., Remy D., Klasmeier J., Fries E.: *Environ. Pollut.* 186, 248 (2014).
  26. Imhof H. K., Schmid J., Niessner R., Ivleva N. P., Laforsch C.: *Limnol. Oceanogr.: Methods* 10, 524 (2012).
  27. Liebezeit G., Dubaish F.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 213 (2012).
  28. Cole M., Lindeque P., Fileman E., Halsband C., Goodhead R., Moger J., Galloway T. S.: *Environ. Sci. Technol.* 47, 6646 (2013).
  29. Foekema E. M., De Gruijter C., Mergia M. T., van Franeker J. A., Murk A. J., Koelmans A. A.: *Environ. Sci. Technol.* 47, 8818 (2013).
  30. Vandermeersch G. a 10 spoluautorov: *Environ. Res.* 143, 46 (2015).
  31. Nuelle M. T., Dekiff J. H., Remy D., Fries E.: *Environ. Pollut.* 184, 161 (2014).
  32. Duis K., Coors A.: *Environ. Sci. Eur.* 28, 2 (2016).
  33. Masura J., Baker J., Foster G., Arthur C., Herring C.: [https://marinedebris.noaa.gov/sites/default/files/publications-files/noaa\\_microplastics\\_methods\\_manual.pdf](https://marinedebris.noaa.gov/sites/default/files/publications-files/noaa_microplastics_methods_manual.pdf), stiahnuté 13.2.2019.
  34. Löder M. G. J. a 10 spoluautorov: *Environ. Sci. Technol.* 51, 14283 (2017).
  35. Koehler A. a 19 spoluautorov: [http://ec.europa.eu/environment/marine/good-environmental-status/descriptor-10/pdf/GESAMP\\_microplastics%20full%20study.pdf](http://ec.europa.eu/environment/marine/good-environmental-status/descriptor-10/pdf/GESAMP_microplastics%20full%20study.pdf), stiahnuté 13.2.2019.
  36. Eriksen M., Mason S., Wilson S., Box C., Zellers A., Edwards W., Farley H., Amato S.: *Mar. Pollut. Bull.* 77, 177 (2013).
  37. Lenz R., Enders K., Stedmon C. A., Mackenzie D. M. A., Nielsen T. G.: *Mar. Pollut. Bull.* 100, 82 (2015).
  38. van der Hal N., Ariel A., Angel D. L.: *Mar. Pollut. Bull.* 116, 151 (2017).
  39. Norén F.: <http://www.n-research.se/pdf/Small%20plastic%20particles%20in%20Swedish%20West%20Coast%20Waters.pdf>, stiahnuté 13.2.2019.
  40. Crawford C. B., Quinn, B. (ed): *Microplastic Pollutants*, 1. vydanie. Elsevier Science, Amsterdam 2017.
  41. Cooper D. A., Corcoran P. L.: *Mar. Pollut. Bull.* 60, 650 (2010).
  42. Dehghani S., Moore F.: *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 20360 (2017).
  43. Shim W. J., Hong S. H., Soeun E. E.: *Anal. Methods UK* 9, 1384 (2017).
  44. Li J., Qu X., Su L., Zhang W., Yang D., Kolandhasamy P., Li D., Shi H.: *Environ. Pollut.* 214, 177 (2016).
  45. Qiu Q., Tan Z., Wang J., Peng J., Li M., Zhan Z.: *Estuarine, Coastal Shelf Sci.* 176, 102 (2016).
  46. Tagg A. S., Sapp M., Harrison J. P., Ojeda J. J.: *Anal. Chem.* 87, 6032 (2015).
  47. Pegado T. S. S., Schmid K., Winemiller K. O., Chelazzi D., Cincinelli A., Dei L., Giarrizzo, T.: *Mar. Pollut. Bull.* 133, 814 (2018).
  48. Rocha-Santos T., Duarte A. C.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 65, 47 (2015).
  49. Corradini F., Bartholomeus H., Huerta Lwanga E., Gertsen H., Geissen V.: *Sci. Total Environ.* 650, 922 (2019).

50. <http://mcc.jrc.ec.europa.eu/documents/201702074014.pdf>, stiahnuté 13.2.2019.
51. Ribeiro-Claro P., Nolasco M., Araújo C., v knihe: *Characterization and Analysis of Microplastics* (Rocha-Santos T., Duarte A., ed.), kapitola 5, str. 119. Elsevier Science, Oxford 2017.
52. Kusch P. v knihe: *Characterization and Analysis of Microplastics* (Rocha-Santos T., Duarte A., ed.), kapitola 7, str. 169. Elsevier Science, Oxford 2017.
53. Fries E., Dekiff J. H., Willmeyer J., Nuelle M. T., Ebert M., Remy D.: *Environ. Sci.: Processes Impacts* 15, 1949 (2013).
54. Dümichen E., Eisentraut P., Bannick C. G., Barthel A. K., Senz R., Braun U.: *Chemosphere* 174, 572 (2017).
55. Peez N., Janiska M. C., Imhof W.: *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 823 (2019).
56. Fuller S., Gautam A. A.: *Environ. Sci. Technol.* 50, 5774 (2016).
57. Coppock R. L., Cole M., Lindeque P. K., Queiros A. M., Galloway T. S.: *Environ. Pollut.* 230, 829 (2017).
58. Shim W. J., Song Y. K., Hong S. H., Jang M.: *Mar. Pollut. Bull.* 113, 469 (2016).
59. Endo S., Takizawa R., Okuda K., Takada H., Chiba K., Kanehiro H., Ogi H., Yamashita R., Date T.: *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1103 (2005).
60. Ogata Y. a 30 spoluautorov: *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1437 (2009).
61. Filip L., Zolal A.: *Chem. Listy* 111, 782 (2017).
62. Fisner M., Taniguchi S., Majer A. P., Bicego M. C., Turra A.: *Mar. Pollut. Bull.* 76, 349 (2013).
63. Chen Q., Zhang H., Allgeier A., Zhou Q., Ouellet J. D., Crawford S. E., Luo Y., Yang Y., Shi H., Hollert H.: *J. Hazard. Mater.* 364, 82 (2019).
64. Brennecke D., Duarte B., Paiva F., Caçador I., Canning-Clode J.: *Estuarine, Coastal Shelf Sci.* 178, 189 (2016).
65. Makovníková J., Barančíková G., Pavel D., Dercová K.: *Chem. Listy* 100, 424 (2006).
66. Li J., Zhang K., Zhang H.: *Environ. Pollut.* 237, 460 (2018).
67. Dehaut A., Hermabessiere L., Duflos G.: *TrAC, Trends Anal. Chem.*, v tlači. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.011>.

**A. Škulcová<sup>a,b</sup>, A. Grenčíková<sup>c</sup>, N. Belišová<sup>c</sup>, D. Bondarev<sup>d</sup>, P. Horký<sup>a</sup>, and T. Mackuľák<sup>c</sup>**  
 (<sup>a</sup>Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Science Prague, Czech Republic, <sup>b</sup>Institute of Natural and Synthetic Polymers, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia, <sup>c</sup>Department of Environmental Engineering, Institute of Chemical and Environmental Engineering, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia, <sup>d</sup>Polymer Institute of Slovak Academy of Science, Bratislava, Slovakia): **Identification and Analysis of Microplastics from Aqueous Media**

The current research confirmed the presence of microplastics in the environment and also in living organisms. Collection, separation and identification of microplastics from environment are very desirable activities, important for monitoring these undesirable materials. In order to determine the real risk brought about by plastic fragments, it is necessary to implement a standard protocol for their sampling, quantification and identification. In this study, analytical techniques, such as SEM, py-GC-MS, FTIR, NMR and Raman spectroscopy, often used for the identification of microplastics, are discussed, together with novel methods used to identify the pollutants adsorbed on them, e.g., pharmaceuticals and metals.

**Keywords:** microplastics, SEM, FTIR, Raman spectroscopy, identification

#### *Acknowledgements*

*This work was supported by European Regional Development Fund-Project „Centre for the investigation of synthesis and transformation of nutritional substances in the food chain in interaction with potentially harmful substances of anthropogenic origin: comprehensive assessment of soil contamination risks for the quality of agricultural products“ (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000845). The authors would like to thank for financial contribution from the STU Grant scheme for Support of Young Researchers: Microplastics - risk for environment on Slovak Republic, and from the STU Grant scheme for Support of excellent teams of young researchers: Microplastics in waters of Slovakia - monitoring and possibilities of use innovative processes for their removal.*