



Česká zemědělská
univerzita v Praze



Analýza mikroplastů ve sladkých vodách a hodnocení jejich toxicity pro vodní organismy

Lenka Wimmerová¹, Martin Lexa², Marie Válová¹

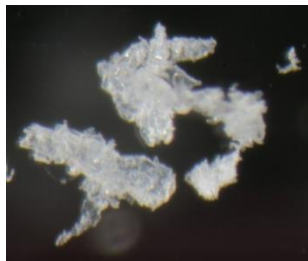
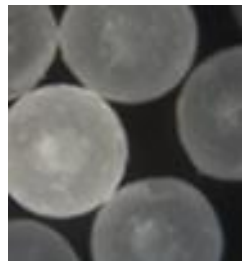
¹Fakulta životního prostředí, ²Fakulta lesnická a dřevařská, ČZU v Praze

Vodárenská biologie 2021, Praha, 10. 2. 2021

Mikroplasty v životním prostředí

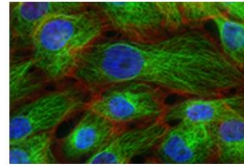
- Potvrzená realita – výskyt mikroplastů ve vodách, jak v mořských, tak sladkých, včetně vod balených
- Potvrzen přestup mikroplastových částic do vodních organismů, od drobných korýšů po větší ryby
- Otevřená otázka – vypovídající schopnost uváděných počtů mikroplastů
 - Používány různé analytické koncovky
 - Chybí standardní operační postup odběru a předúpravy/přípravy vzorku
- Otevřená otázka – reálný dopad mikroplastových částic na vodní organismy
 - Většina ekotoxikologických studií prováděna se standardními částicemi
 - Dopad mikropolutantů nesorbovaných na povrchu mikroplastových částic

Mikroplasty = „hot topics“



MP – vlevo standard, vpravo reálný plast

Hot topics



Preventing cancer



Skin sensitising chemicals



Perfluoroalkyl chemicals (PFAS)



Lead in shot, bullets and fishing weights



Microplastics



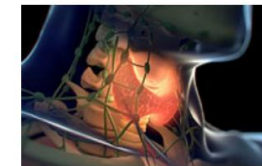
Granules and mulches on pitches



Tattoo inks and permanent make-up



Glyphosate



Endocrine disruptors



Bisphenol A

<https://echa.europa.eu/hot-topics>



Microplastics are very small solid plastic particles. They are released into the environment, for example, when car tyres wear out or when we use products that contain them.



Where can you find them?

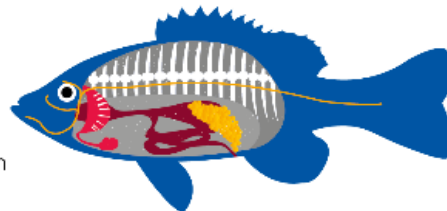
Microplastics are intentionally added to products to give them certain textures or make them function in a specific way.

Examples of these products are the soft infill used on artificial turf pitches, fertilisers, cleaning and laundry products and cosmetics.

What is the concern?

When products are used, microplastics are released to the environment where they stay for a very long time – they do not biodegrade. This leads to irreversible pollution of our ecosystems and food chains.

It is estimated that 42 000 tonnes of microplastics end up in our environment each year because of the use of products where they are intentionally added.



What is the EU doing?

The European Chemicals Agency is proposing to restrict microplastics in products in the EU/EEA.

The proposal would prevent 500 000 tonnes of microplastic releases into our environment over 20 years.

The costs for companies are estimated to be up to €19.1 billion over 20 years.



Planned timetable for proposed restriction of intentionally added microplastics

Future timings are tentative

	Timing
Intention to prepare restriction dossier	17 January 2018
Call for evidence	1 March - 1 May 2018
Stakeholder workshop	30 - 31 May 2018
Submission of restriction dossier	11 January 2019
Public consultation of the Annex XV dossier	20 March 2019 – 20 September 2019
RAC opinion	June 2020
Draft SEAC opinion	June 2020
Consultation on draft SEAC opinion	1 July - 1 September 2020
Combined final opinion submitted to the Commission	February 2021
Draft amendment to the Annex XVII (draft restriction) by Commission	Within 3 months of receipt of opinions
Discussions with Member State authorities and vote	2021
Scrutiny by Council and European Parliament	Before adoption (3 months)
Restriction adopted (if agreed)	2021 or 2022 (transition periods are proposed for certain applications)

„Omezení použití záměrně přidaných mikroplastových částic na výrobky jakéhokoli druhu pro spotřebitelské nebo profesionální použití.“

„Omezení použití záměrně přidaných mikroplastových částic na výrobky jakéhokoli druhu pro spotřebitelské nebo profesionální použití.“

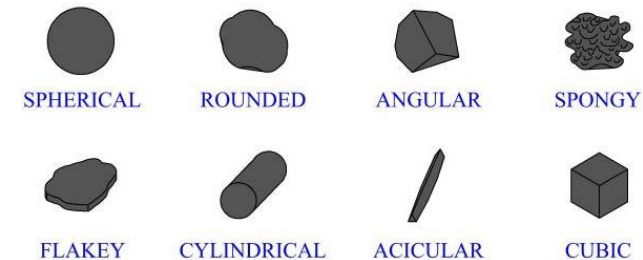
2. For the purposes of this entry:

- a. 'microplastic' means a material consisting of solid polymer-containing particles, to which additives or other substances may have been added, and where $\geq 1\%$ w/w of particles have (i) all dimensions $1\text{nm} \leq x \leq 5\text{mm}$, or (ii), for fibres, a length of $3\text{nm} \leq x \leq 15\text{mm}$ and length to diameter ratio of >3 .

<https://echa.europa.eu/registry-of-restriction-intentions/-/dislist/details/0b0236e18244cd73>

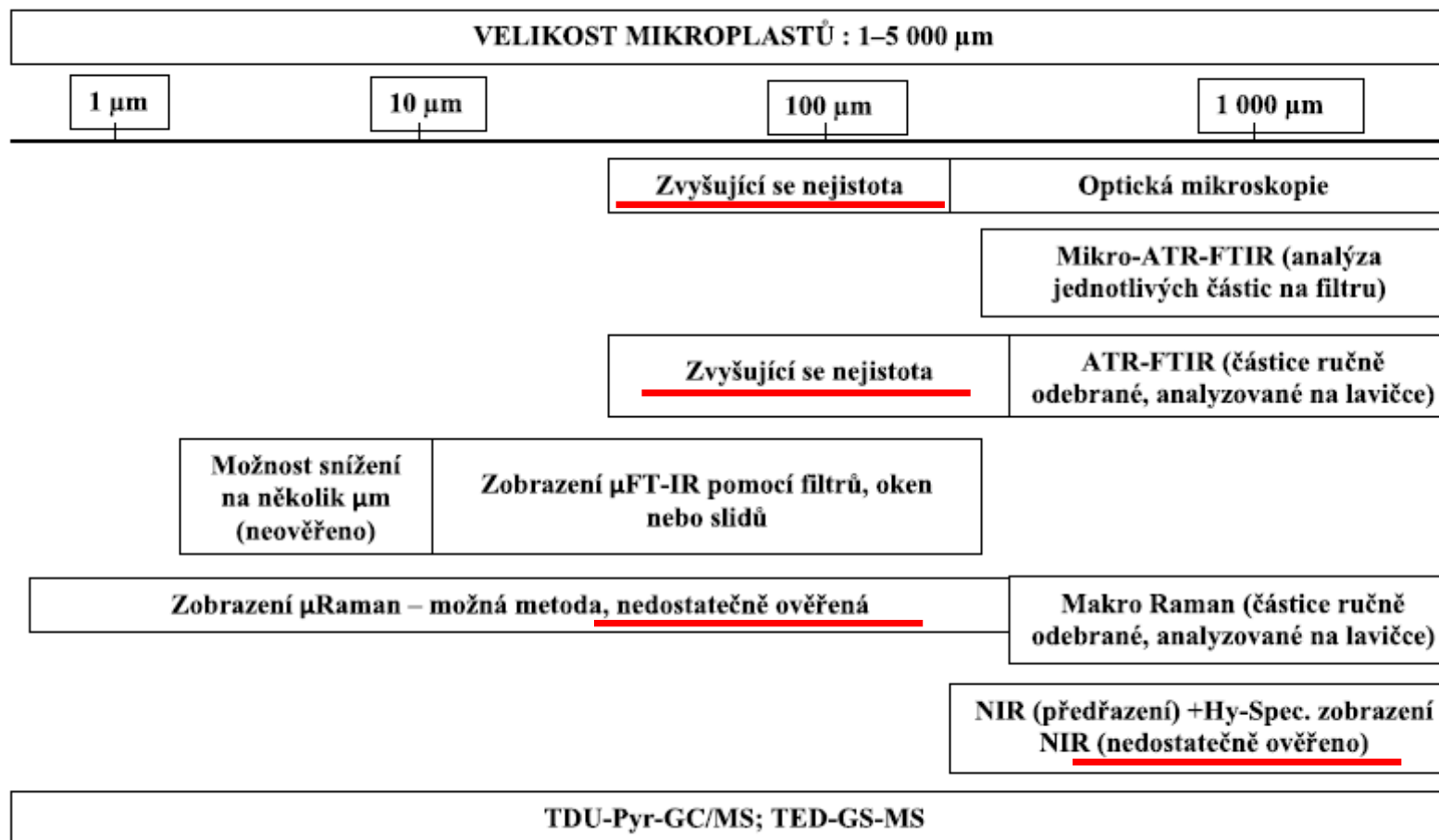
Klasická (obecně akceptovaná) definice MP:

- částice, fragmenty, fólie... o rozměrech $1\ \mu\text{m}$ až $1\ \text{mm}$ ($5\ \text{mm}$)
- vlákna – délka $<1\ \text{mm}$, průměr $<100\ \mu\text{m}$ (poměr max. 10)



Vollertsen, J. Overview of methods and challenges for microplastic analysis. Prezentace projektu BASEMAN, Aalborg University. ©2016–2020.

Závislost velikosti mikročastic a použité analytické metody

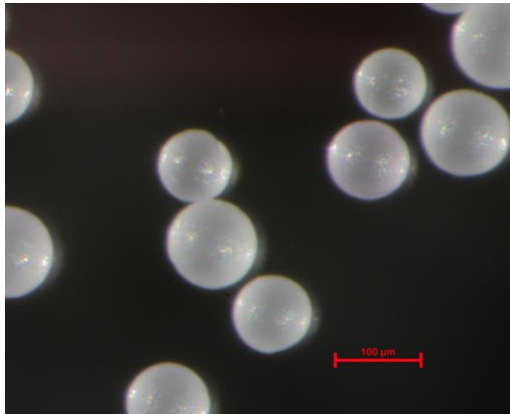


<https://simple-plastics.eu/>

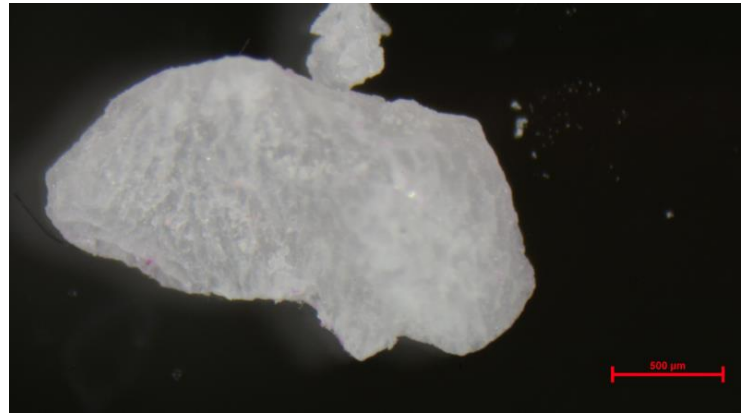
Optická analýza mikroplastů

- KVANTITA – množství a typ mikroplastů (částice, fragmenty, úlomky, vlákna...)
- Výhody metody:
 - Dostupnost potřebného vybavení a materiálu (filtry, barviva – bengálská červeň, Nile Red)
 - Robustnost metody (dobrá opakovatelnost, procesní kontrola pitných vod >100 μm)
- Nevýhody metody:
 - Časová náročnost a potřeba zkušeného pracovníka
 - Významný vliv organického znečištění, nutná předúprava vzorku
 - Nutné zvažovat návaznost prací, nutné volit barvivo s ohledem na předpokládaný druh plastu

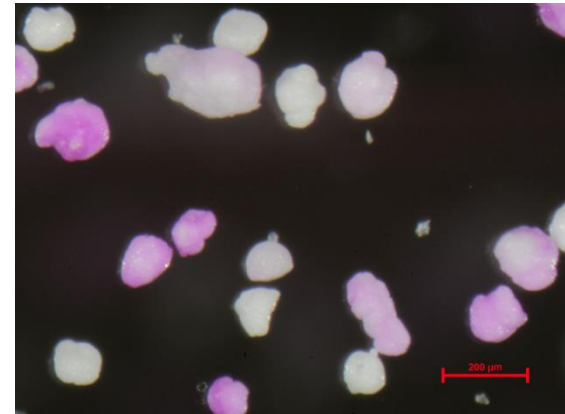
Ukázka optické analýzy – barveno bengálskou červení



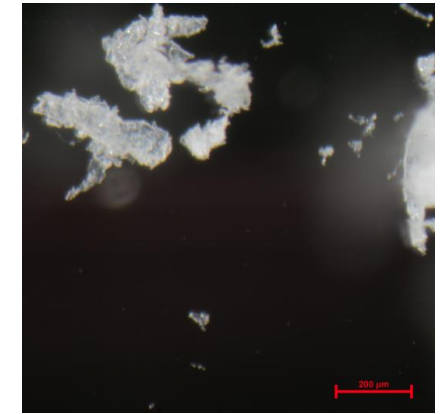
PE



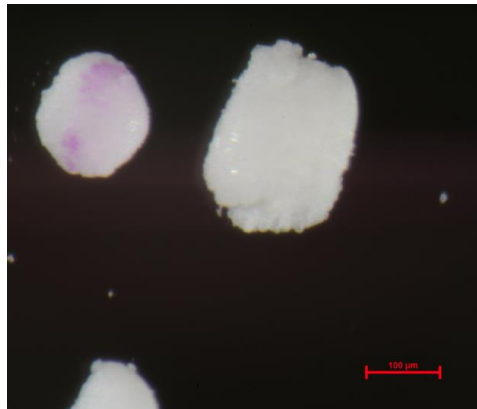
Poly ethylene succinate



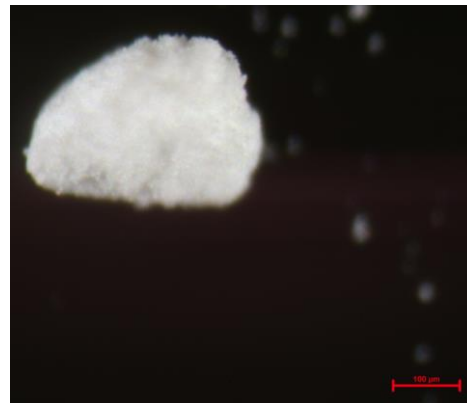
PVC



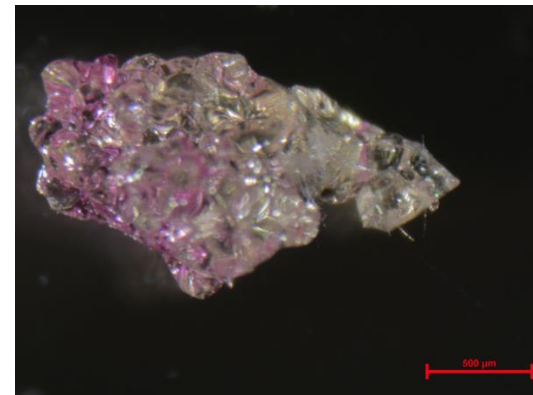
PTFE



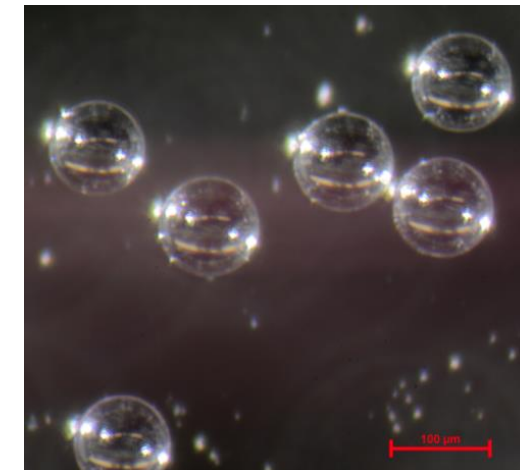
Poly izobutylene-alt-maleic anhydride



Poly methyl vinyl ether-alt-maleinanhidrid



Poly vinyl methyl ketone



PS

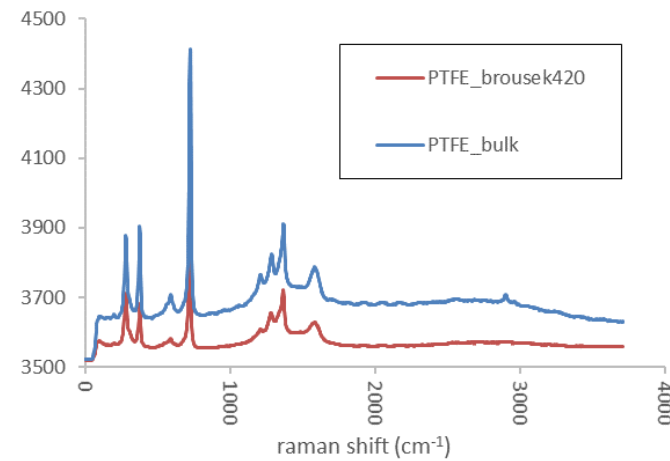
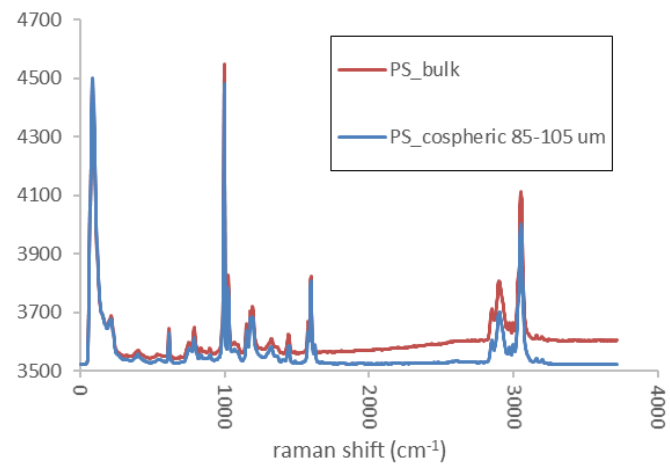
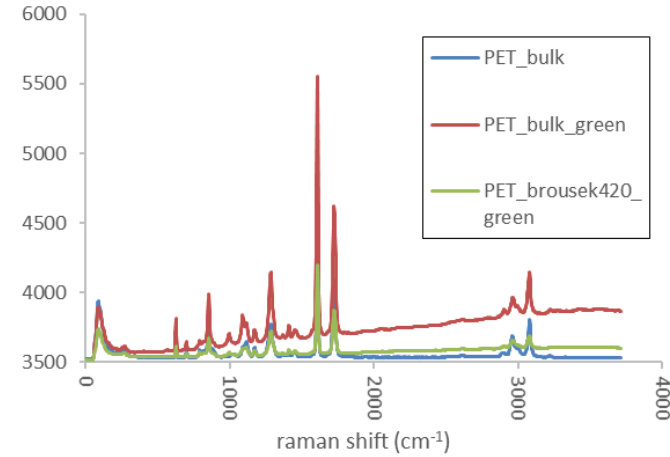
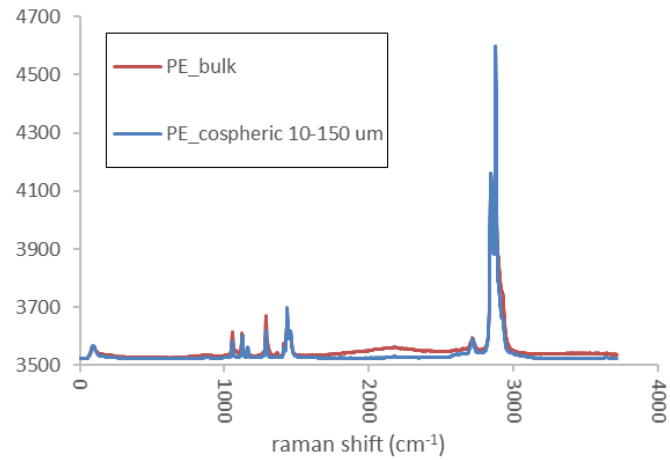
Ramanova spektrometrie

- KVALITA – druh mikroplastů (PE, PET, PP, PES...)
- Výhody metody:
 - Schopnost identifikace částic pod 10 μm
 - Dobrá opakovatelnost – zelený laser 532 nm (i u částečně degradovaných částic)
- Nevýhody metody:
 - Časová náročnost a potřeba zkušeného pracovníka
 - Významný vliv organického znečištění, nutná předúprava vzorku
 - Nutné zvažovat návaznost prací, nutné volit barvivo s ohledem na předpokládaný druh plastu

Ukázka analýzy – Ramanova spektrometrie

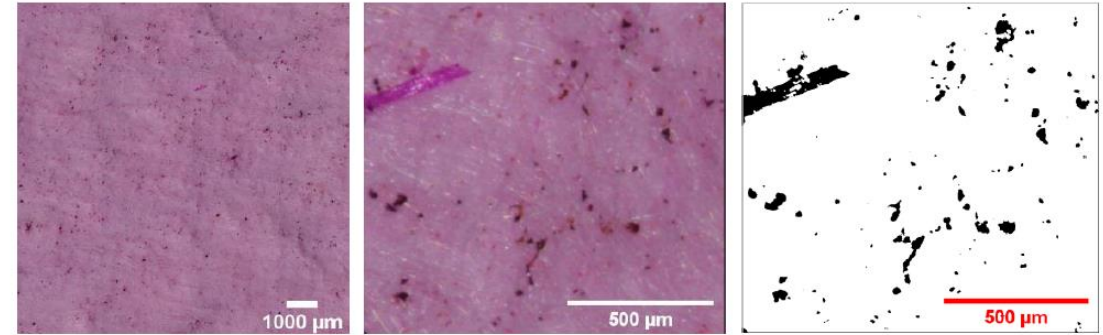
plast	forma	spektrum	plast	forma	spektrum	plast	forma	spektrum	plast	forma	spektrum
PET	bulk		PS	bulk		PVC	mikro		Poly (methyl vinyl ether-alt-malein anhydrid)	mikro	
PET	brousek hrubost 420, zelená		PS	cospheric 85-105 um		Poly phenyl sulfone	bulk		Poly (isobutylene-alt-maleic anhydride)	mikro	
PE	bulk		PTFE	bulk		Poly (vinyl methyl ketone)	makro		Poly (vinyl phenyl ketone)	bulk	
PE	cospheric 10-150 um		PTFE	brousek hrubost 420		Poly (1,4-phenylene ether-ether-sulfone)	bulk		Poly (ethylene succinate)	bulk	

Ukázka analýzy – Ramanova spektrometrie



Kritické body – stanovení mikroplastů

- ANALÝZA – časová náročnost, zkušenost, návaznost
- PŘEDÚPRAVA VZORKU
 - Oxidace – H_2O_2 , $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, NaClO
 - Hustotní flotace – NaCl , NaI , ZnCl_2
 - Filtrace – skleněné filtry, nitrát celulóza, PTFE...
- ODBĚR VZORKU
 - Předfiltrace přímo na lokalitě (>100 litrů)
 - Větší objem vzorku, pasivní odběr (2-3 litry)
 - Vzorkovnic sklo, přepravní boxy, oblečení pracovníci



Ukázka hodnocení mikroplastových částic s plochou $> 10^2 \mu\text{m}^2$. Vybraná čtvercová oblast filtru určená k analýze (vlevo); detail vybrané oblasti (střed); prahování na vybrané oblasti (vpravo)

*Optimalizace
postupu*

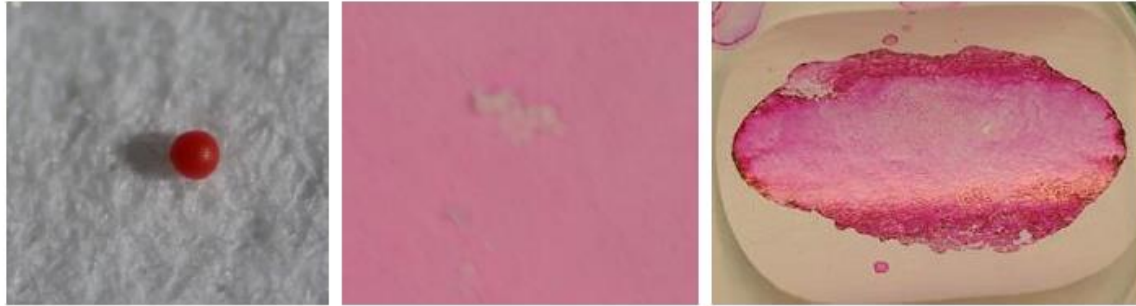
*PROCESNÍ VZORKY
= positive control*

*SLEPÉ VZORKY
= negative control*

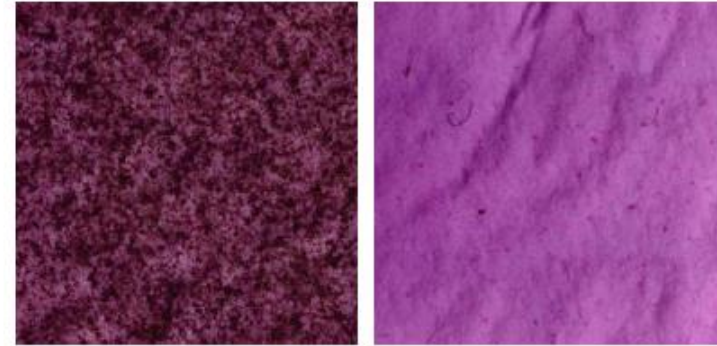


Kontrolní LDPE (Campo a kol., 2019)

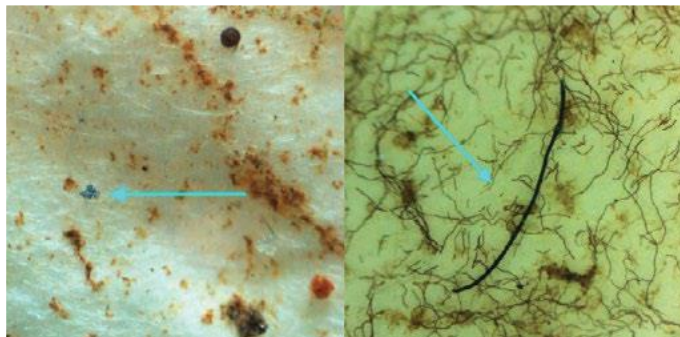
Ukázka zpracování filtrů



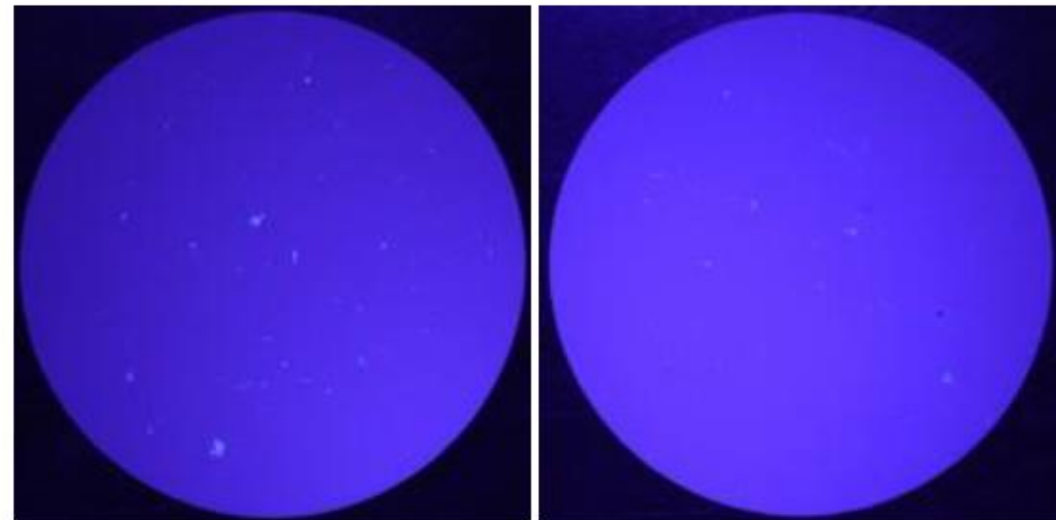
Skleněný filtr s PE kuličkou 250-300 μm (vlevo); filtr z alfa-celulózy obarvený bengálskou červení se shlukem PTFE částic 10-100 μm (střed); ukázka deformace filtru po obarvení roztokem bengálské červeně (u všech filtrů použit 10 % roztok Tween 80)



Ukázka velkého množství organického materiálu na filtru (vlevo) a defektů skleněného filtru způsobených oxidací peroxidem vodíku (vpravo)



Ukázka mikroplastového fragmentu (vlevo) a mikroplastového vlákna (vpravo), nebarveno, odpadní voda

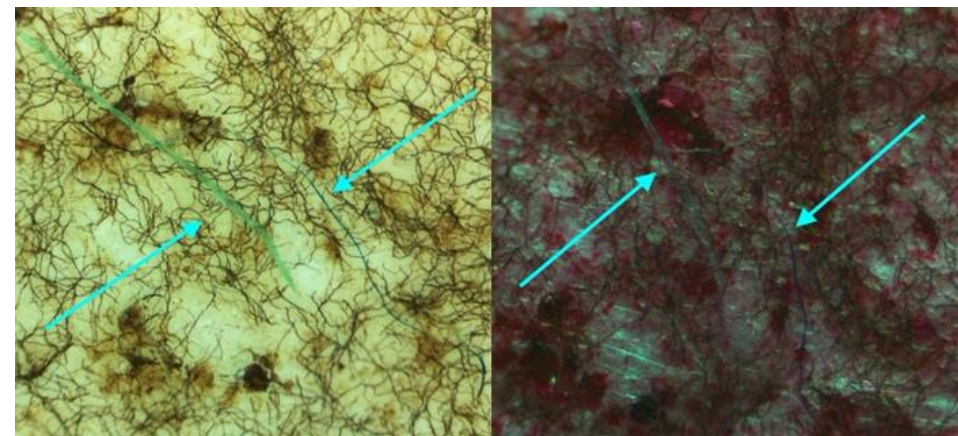


Filtr z nitrát celulózy s PES vlákny obarvenými fluorescenčním barvivem Nile Red (vlevo – bez předúpravy, vpravo – přídavek Tween 80)

Výsledky analýzy reálných vzorků

Zdroj vody	Počet vláken	Počet fragmentů	Celkový počet
Pitná voda	12	5	17
Odpadní voda (vstup do ČOV)	151	46	197
Odpadní voda (výstup z ČOV)	21	13	34
Povrchová voda (centrum města)	16	8	24
Povrchová voda (hranice města)	13	13	26
Slepý vzorek (ultračistá voda, průměr)	21	1	22

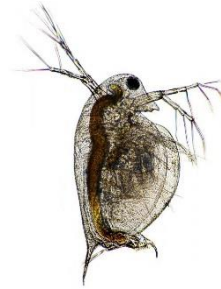
*Pozn. počet MPs
ve vzorcích
o objemu
1,5-1,7 litru*



Ukázka čitelnosti filtru bez obarvení (vpravo) a po obarvení bengálskou červení (vlevo) u vzorků s vyšším podílem organické hmoty, rozlišení 40x10 (oba vzorek povrchová voda centrum města)

Toxicita mikroplastů pro vodní organismy

- Výhoda – možnost použití standardizovaných ČSN postupů
 - *Daphnia magna* dle ČSN EN ISO 6341
 - *Thamnocephalus platyurus* dle ČSN ISO 14380
 - *Vibrio (Aliivibrio) fischeri* dle ČSN EN ISO 11348 ...



D. magna



D. pulex



T. platyurus

- Nevýhoda – praktická neproveditelnost sledování ekotoxicity reálných mikroplastů (limitní opět analytika – rozlišení vlivu mikroplast vs. mikropolutant)
- Obecné předpoklady, závěry předchozích studií
 - Přítomnost znečišťujících látek na povrchu mikroplastů ovlivňuje jejich toxicitu
 - Míra adsorpce znečištění souvisí s povrchovou aktivitou mikroplastových částic
 - Pro pohlcení mikroplastové částice hraje významnou roli její tvar a velikost

Ukázka výsledků – UV mikroskopie



***T. platyurus* s pozřenými mikroplastovými částicemi >10 μm (vlevo),
srovnání velikosti *D. magna* a mikroplastového vlákna o délce 1 mm (vpravo)**

Akutní testy – 48 hod.

- Neprokázan významný toxický efekt
- Sferické částice, PE, PS, PET, PES

- Vztah mezi tvarem mikroplastu trávicího ústrojí a tvarem MP nebyl prokázán
- Byla potvrzena preference fragmentů a šupinek mikroplastů, vlákna nebyla pozřena
- Prokázán vliv velikosti mikroplastové částice (preference částic <10 μm , max. 100 μm)

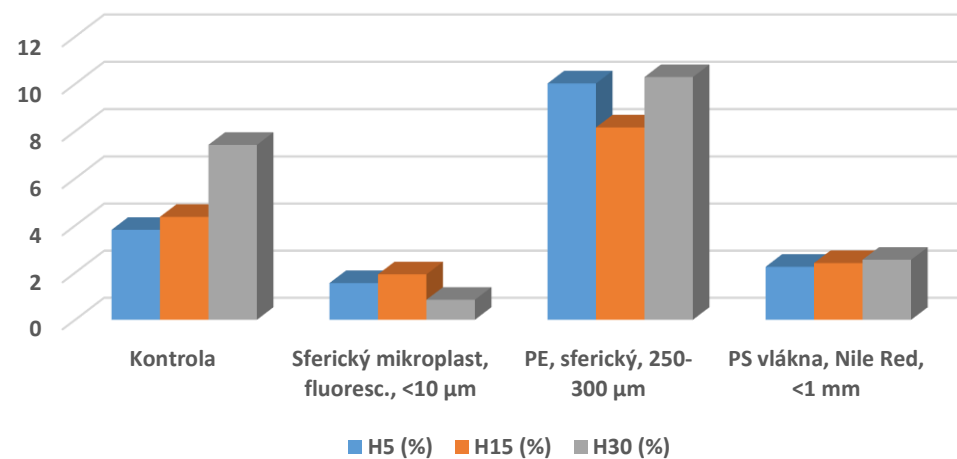
Ukázka výsledků – luminiscence

Typ vzorku	<i>V. fischeri</i> H ₅ (%)	<i>V. fischeri</i> H ₁₅ (%)	<i>V. fischeri</i> H ₃₀ (%)
Kontrola (živný roztok)	3,82	4,37	7,42
Fluorescenční mikroplast, <10 μm (Cospheric)	1,56	1,93	0,85
PE sferický mikroplast, 250-300 μm (Cospheric)	10,02	8,16	10,29
PS mikroplastová vlákna, obarvená Nile Red, <1 mm	2,25	2,41	2,55

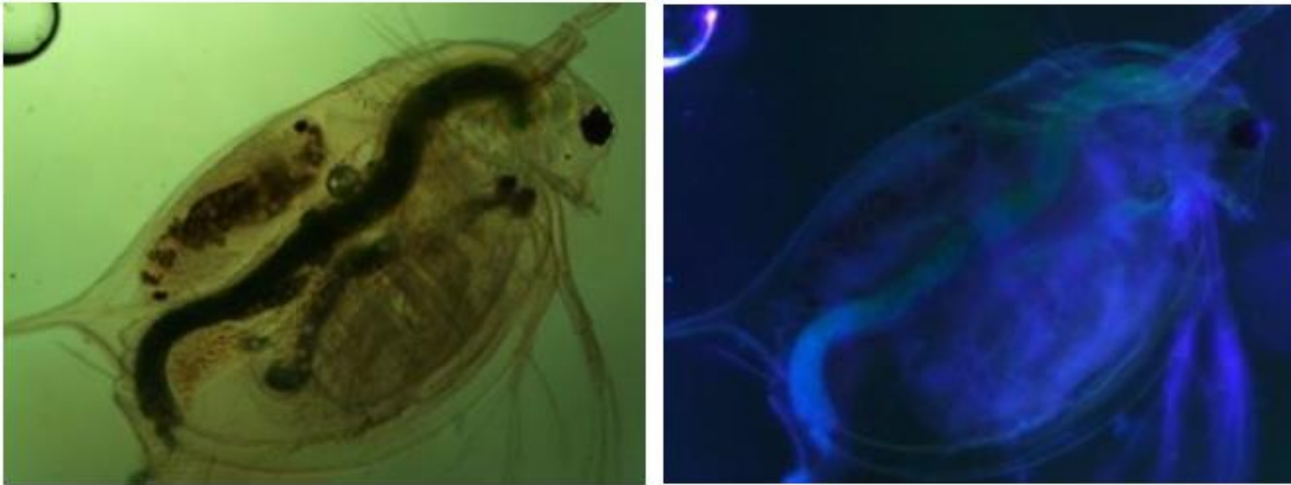
Akutní test – 5, 15 a 30 min.

- Neprokázan významný toxický efekt
- Sferické částice, PE, PES

Relativní inhibice *V. fischeri*



Ukázka výsledků – optická mikroskopie



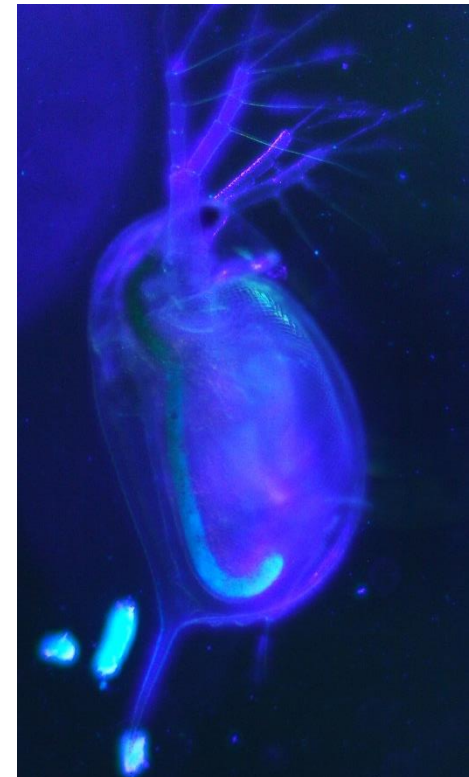
D. magna s mladým jedincem (vlevo), stejný případ pod UV světlem (vpravo)
- mikroplasty jsou patrné pouze ve střevě dospělého jedince

Chronické testy – 14-21 dnů

- Rozdílný nárůst populace dafnií v kontrolních vzorcích a vzorcích s mikroplastovými částicemi v porovnání se vzorky s MP vlákny
 - Sferické částice, PE, PS, PET, PES
-
- Byla potvrzena preference fragmentů a částic mikroplastů $<10\ \mu\text{m}$
 - Ve střevech u dospělých jedinců i jedinců čerstvě narozených jedinců (ne nenarození)
 - Pozorován zvýšený příjem mikroplastů v kombinaci řasami (možná spojitost...?)

Závěr

- Seznámení se základními poznatky z oblasti analytického hodnocení přítomnosti mikroplastových částic ve vodách
- Nastínění možných akutních a chronických toxických účinků mikroplastů na vodní organismy (bez mikropolutantů)
- Přítomnost mikroplastů je realita, i v českých vodách, nicméně detekované množství je relativně malé a koreluje s množstvím mikroplastů detekovaných ve slepých vzorcích
- Akutní toxicita mikroplastových částic (bez mikropolutantů) není významná, pravděpodobný chronický účinek (na růst)
- Lze předpokládat negativní vliv přítomnosti mikropolutantů nasorbovaných na povrchu mikroplastových částic



Poděkování:

Projekt FV40126 – Pokročilé sorbenty pro separaci mikroplastů a mikropolutantů z vod je řešen s finanční podporou MPO ČR.

Děkuji za Vaši pozornost



Kontakt: Lenka Wimmerová, Katedra aplikované ekologie, FŽP, ČZU v Praze – wimmerova@fzp.czu.cz