

UTB ve Zlíně, Fakulta technologická

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

AUTOMATIZOVANÝ POSTUP SLEDOVÁNÍ BIOLOGICKÉHO
ROZKLADU POLYMERŮ (APLIKACE MIKRORESPIROMETRU)

Diplomová práce

Autor práce:

Bc. Martin Družbík

Vedoucí práce:

doc. Ing. Jaromír Hoffmann, CSc.

2006

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martin DRUŽBÍK**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Automatizovaný postup sledování biologického rozkladu polymerů (aplikace mikrorespirometru)**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracujte, resp. doplňte literární rešerši zaměřenou na: a) biologickou rozložitelnost plastových směsí na bázi PVAL, proteinů a polysacharidů v půdním prostředí, b) možnosti sledování biologické rozložitelnosti v aerobním prostředí pomocí analyzátoru plyných komponent.
2. Na základě literárních poznatků navrhnete modifikaci testu biorozložitelnosti s využitím respirometru Micro Oximax a jeho verifikaci.
3. Aplikujte při testech biologické rozložitelnosti plastových směsí a jejich komponent. Proveďte i alternativní testy biorozložitelnosti s analytickou koncovkou plynově-chromatografickou, zahrnující rovněž analýzu spotřebovaného kyslíku (vedle produkovaného oxidu uhličitého).
4. Výsledky statisticky zpracujte pomocí vhodného SW (na pracovišti k dispozici Statistica, doporučeno).
5. Zpracujte podle zvyklostí písemnou formou (viz instrukce UTB pro zpracování DP) s využitím MS Word a Excel.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Dle pokynů vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Jaromír Hoffmann, CSc.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

20. února 2006

Termín odevzdání diplomové práce:

26. května 2006

Ve Zlíně dne 20. února 2006


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan




doc. Ing. Jaromír Hoffmann, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Abstrakt česky

Práce se zabývá nalezením optimálních podmínek pro testy v půdním prostředí, zejména půd „ředěných“ inertním materiálem. Jako hodnotící podmínky byly aktuální koncentrace kyslíku, kumulativní produkce oxidu uhličitého a procento odstranění substrátu z hlediska produkce oxidu uhličitého. Podmínky byly testovány zejména na modelových látkách jako karboxymethyl celulóza, xanthan, Avicel a PHB. Jako analytické koncovky posloužily plynová chromatografie ke stanovení CO₂ a O₂, titrační analýza ke stanovení CO₂ a automatický přístroj MicroOxymax s infračerveným detektorem ke stanovení CO₂ a paramagnetickým detektorem ke stanovení O₂.

Abstrakt ve světovém jazyce

This work deal with assessment optimum conditions for tests in soil environment, namely soils „ diluted" with inert material. As assessing conditions were actual concentration oxygen, cumulative production carbondioxyde and percentage remove substrate depending of production carbondioxyde. Conditions were tested namely on model materials as karboxymethyl cellulose, xanthan, Avicel and PHB. As a analytical termination helped gas chromatography to assessment CO₂ and O₂, titrating analysis to assesment CO₂ and automatic unit MicroOxymax with infra-red detector to assessment CO₂ and paramagnetic detector to assessment O₂.

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Jaromíru Hoffmannovi, CSc. a konzultantovi Ing. Pavlu Dřímaloovi za rady a pomoc při praktické části, které mi pomohly vypracovat tuto práci. Dále patří mé poděkování celému kolektivu ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za vytvoření výborných pracovních podmínek, rodině a přátelům za všestrannou pomoc při studiu.

Souhlasím s tím, že s výsledky mé práce může být naloženo dle uvážení vedoucího diplomové práce a ředitele ústavu. V případě publikací budu uvedena jako spoluautor.

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval.

Ve Zlíně dne 26. května

.....

Martin Družbík

OBSAH

ÚVOD	8
1 LITERÁRNÍ ČÁST	9
1.1 BIODEGRADACE POLYMERŮ V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ ZA AEROBNÍCH PODMÍNEK	9
1.2 MECHANISMY DEGRADACE POLYMERŮ [9].....	10
1.2.1 Chemodegradace	11
1.2.2 Fotodegradace	11
1.2.3 Termická degradace	12
1.2.4 Biodegradace.....	12
1.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ČINNOST MIKROORGANISMŮ	13
1.3.1 Vlatnosti polymeru.....	13
1.3.2 Teplota půdy.....	16
1.3.3 Obsah živin.....	16
1.3.4 pH půdy	17
1.3.5 Dostatek kyslíku.....	17
1.3.6 Přítomnost vody	17
1.3.7 Typ a počet mikroorganismů schopných biodegradace	17
1.4 BIOLOGICKY ROZLOŽITELNÉ POLYMERY	18
1.4.1 Syntetické biorozložitelné polymery	18
1.4.2 Přírodní biorozložitelné polymery	19
1.5 CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH POLYMERŮ.....	19
1.5.1 Polyvinylalkohol	19
1.5.2 Xanthan	21
1.5.3 Gellan	23
1.5.4 PHB	24
1.5.5 Škrob	25
1.6 METODY TESTOVÁNÍ BIODEGRADABILITY POLYMERŮ.....	26
1.6.1 Zahn-Wellens test (ČSN EN 29888, OECD 302B)	27
1.6.2 Půdní pohřbívací (burial) test.....	27
1.6.3 Sturmův test (ISO 17556, OECD 301B, ASTM D 5209).....	29
1.7 METODY STANOVENÍ UHLÍKU A RESPIRAČNÍCH PLYNŮ (CO ₂ , O ₂ , CH ₄).....	31
1.7.1 Plynově chromatografická analýza (GC)	32
1.7.2 Použití přístroje Micro-Oxymax	32
1.8 STŘEDISKA INFORMACÍ O BIOLOGICKÉ DEGRADACI.....	33
1.9 NÁVAZNOST A CÍLE DIPLOMOVÉ PRACE.....	34

2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
2.1	CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	35
2.2	TESTOVANÉ VZORKY	36
2.3	BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	37
2.4	MATERIÁL K „ŘEDĚNÍ“ PŮD	38
2.5	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	38
2.6	MĚŘÍCÍ APARATURY	39
2.6.1	Lahvová aparatura.....	39
2.6.2	Automatický analyzátor MicroOxymax.....	40
2.7	METODY HODNOCENÍ PRŮBĚHU BIOLOGICKÉHO ROZKLADU DLE SLOŽENÍ PLYNNÉ FÁZE.....	41
2.7.1	Analýza CO ₂ plynovou chromatografií.....	42
2.7.2	Analýza obsahu CO ₂ titrační metodou	43
2.7.3	Analýza CO ₂ IR spektroskopii	44
2.7.4	Analýza O ₂ plynovou chromatografií	44
2.7.5	Analýza O ₂ paramagnetickou rezonancí	44
2.8	OSTATNÍ LABORATORNÍ POSTUPY A ANALÝZY	44
2.9	PŘIPRAVA POKUSŮ	46
2.9.1	Testy s půdními extrakty	47
2.9.2	Testy v půdě	48
2.10	ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	54
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	57
4	ZÁVĚR.....	73
	POUŽITÁ LITERATURA	75
	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	83
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	84
	SEZNAM TABULEK	86

ÚVOD

V současném světě je při vývoji nových materiálů a technologií potřebné zohledňovat jejich vlivy na prostředí po celou dobu jejich životního cyklu. Jeden z problémů je i aktuální odpadové hospodářství polymerních materiálů, protože většina polymerních materiálů, založená na neobnovitelných surovinách, končí na skládce odpadů a nezapojí se do recyklačního programu. Tyto problémy se snaží řešit výzkumní pracovníci řadu let. Nejnovější trend na celém světě se obrací ke sledování a vývoji polymerních materiálů na bázi obnovitelných surovin, které by byly v životním prostředí rozložitelné.

Ústav IOŽP se věnuje problematice biologické rozložitelnosti průmyslových produktů a odpadů několik let. V současné době je zájem o otázky biorozložitelnosti polymerních materiálů a jejich směsí v životním prostředí. Zejména se jedná o rozklad ve vodním a půdním prostředí polymerních folií na bázi polyvinylalkoholu (PVAL) modifikovaného biopolymery (proteinový hydrolyzát - HYCOL, polysacharidy – Gellan, Xanthan, apod.).

Diplomová práce navazuje na dosavadní činnosti ústavu a je zaměřena na sledování rozložitelnosti biopolymerů v půdním prostředí za aerobních podmínek. Pozornost je zaměřena na možnosti sledování průběhů biologického rozkladu analýzou plynné fáze v biologických reaktorech pomocí titrační analýzy, plynové chromatografie a infračervené analýzy na automatickém analyzátoru MicroOxymax.

1 LITERÁRNÍ ČÁST

1.1 Biodegradace polymerů v půdním prostředí za aerobních podmínek

Biodegradace polymerů v půdním prostředí patří mezi zkoušky u kterých je použito mikrobiální kultury pro zjištění zda-li je polymer odolný nebo podléhá biologickému rozkladu tzv. enzymovému působení. Výsledky takovéto zjištění mohou určit použitelnost materiálu v mnoha odvětví.

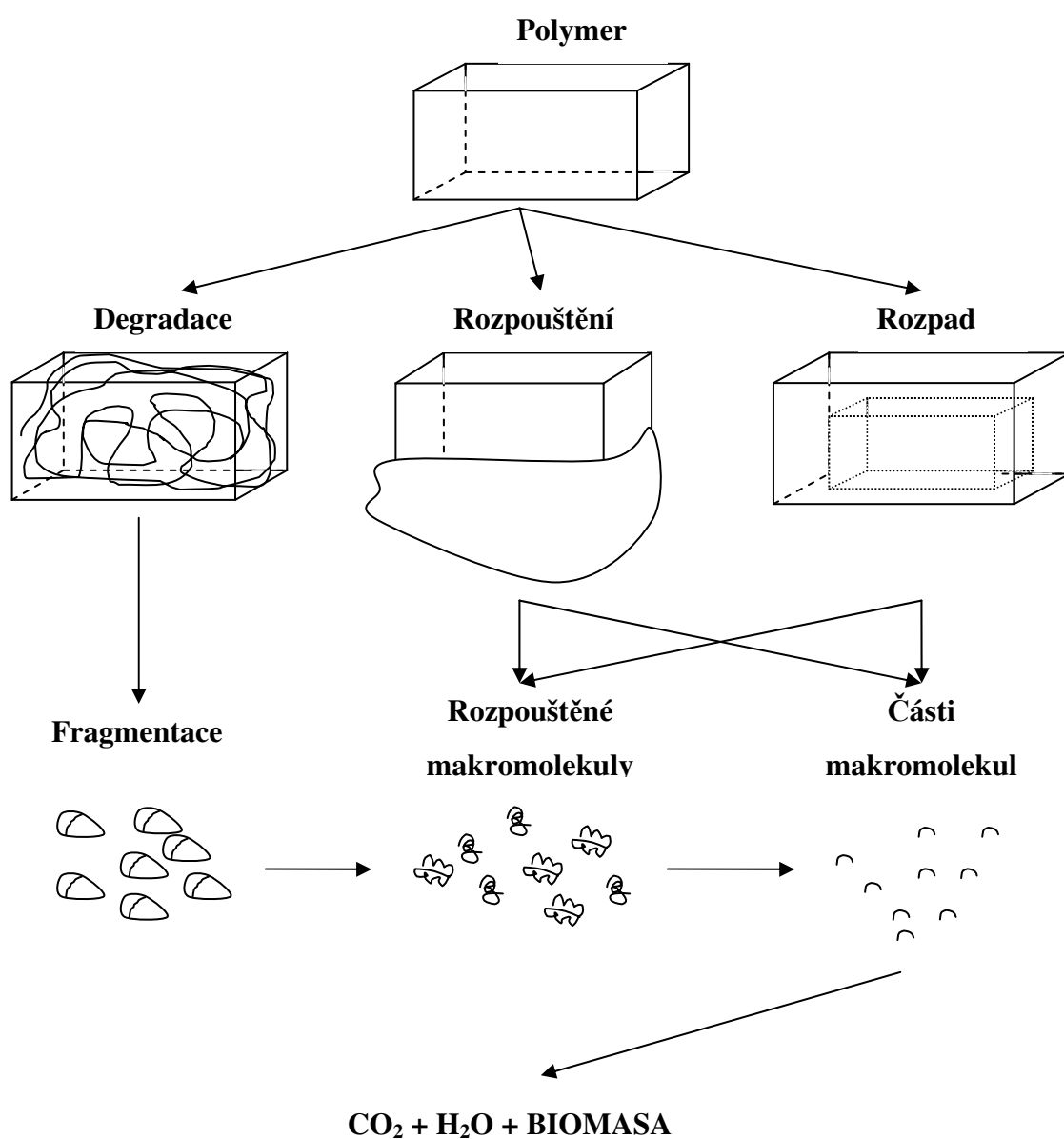
Z hlediska odpadového hospodářství a ekologických důvodů je žádoucí, aby použitý a dále nevyužitelný odpad byl co nejšetrněji odstraněn bez vzniku škodlivých látek v daném prostředí. V současné době je dostupné už značné množství takovýchto materiálů pro komerční využití, například v knize [1] jsou popsány materiály používané v obalech na jídlo nebo v práci [2] je přehlené rozdělení biorozložitelných polymerů od přírodních (polysacharidy – škrob, celulóza; polypeptidy - želatina) přes hydrolyzovatelné (polyestery, polyamidy, polyuretany aj.) až po polymery s uhlíkovým hlavním řetězcem (poly (vinyl alkohol), poly (vinyl acetát), polyakryláty). V této práci je také obecně řečeno o biorozložitelnosti těchto materiálů v půdě.

Překážka pro široké uplatnění takovýchto polymerů je cena a tím i snížená konkurenceschopnost vůči běžným plastům jako jsou PE, PP, PVC a jiné. Zatím nachází uplatnění jako vodorozpustné fólie, kompostovatelné nádoby aj.. Tyto materiály se vyznačují podstatnými důvody proč by se měly využívat ve větším měřítku. První důvod je ten, že pochází z obnovitelných zdrojů např. škroby, celulóza, proteiny, polysacharidy, aj. a druhý důvod je, že jsou z větší části nebo zcela biologicky rozložitelné. To je způsobené specifickými enzymy, které přizpůsobovaly evolucí mikroorganismů. Od roku 1970 Watanabe a jeho pracovní skupina [3-5] uskutečnila jednu klíčovou studii zaměřenou na objasnění enzymatických reakcí v biodegradaci vysokomolekulárního PVAL. Zaměřili svou činnost na extracelulární degradaci PVAL enzymy, které použili z čisté kultury *Pseudomonas* izolované z půdy. Nalezený protein, označovaný jako sekundární alkoholoxidáza (SAO) redukoval viskozitu PVAL. Schopnost odbourávat nízkomolekulární sekundární alkoholy spočívá na spotřebě O₂ a produkce H₂O₂ během reakce [5]. Další reakce jsou enzymatické štěpení PVAL pomocí SAO a β-diketon hydrolázou (BDH), dále biodegradační cesta PVAL zprostředkovaná specifickou PVAL-

oxidázou a β -diketon hydrolázou [6] a biodegradace zprostředkovaná PVAL-dehydrogenásou z bakterie *Alcaligenes faecalis* KK314 a typickou aldolázou reakcí [7]. Reakce jsou podrobněji popsány v práci [8].

1.2 Mechanismy degradace polymerů [9]

Neméně důležitou úlohu mají i mechanismy degradace, protože záleží na prostředí (půdní nebo vodní) a v jaké formě se polymer dostane do blízkosti mikroorganismu, který jej napadne svým enzymovým systémem.



Obr. 1. Stupně degradace polymeru od počátku přes mineralizaci až ke vzniku biomasy

Na obrázku 1 [10] jsou vyznačené různé stupně degradace polymeru od počátečního neporušeného stavu až po úplnou mineralizaci a vzniku biomasy. Tento proces prochází ovlivňován chemickými, fyzikálními (termo- a fotodegradace) a biologickými procesy jako jsou např.:

- expozice povrchu polymeru světelnému záření, teplotě, chladu, chemickým sloučeninám nebo mikroorganismům
- narušení povrchu polymeru a difúze prostředí dovnitř polymeru
- reakce prostředí a polymeru
- difúze reakčních produktů na povrch polymeru
- uvolňování reakčních produktů z povrchu polymeru do prostředí

1.2.1 Chemodegradace

Chemodegradace je proces, který využívá prostředí jako zdroj chemicky účinných látek indukujících degradaci plastu, většinou v kombinaci s nějakým dalším vlivem (fyzikálním, biologickým). Chemodegradace je účinná především u plastických hmot, které mají ve svém řetězci zavedeny funkční skupiny. Zatímco polyetylén je díky svojí jednoduché stavbě z etylénových jednotek relativně odolný vůči chemickým vlivům, je v případě přítomnosti hydroxylových skupin odolnost plastické hmoty s těmito skupinami snížena. Polyvinylalkohol, který obsahuje tyto funkční skupiny reaguje dokonce s vodou a rozpouští se v ní. Podobně jsou méně chemicky odolné plasty u kterých jsou vodíky etylénové jednotky nahrazeny acetátovými funkčními skupinami jako například polyvinylacetát nebo polyakrylové kyseliny. Obecně lze říci, že čím více je na molekule polymeru funkčních skupin tím snadněji u nich může probíhat degradace. Vyjímkou je například polytetrafluoretylen, který přestože má nahrazeny vodíky reaktivním fluorem odolává takřka všem chemickým činidlům.

1.2.2 Fotodegradace

Fotodegradace je skupinou fyzikálních procesů uplatňujících se při degradaci plastů se zkrácenou životností. Zdrojem světelného záření majícího vliv na degradační procesy je sluneční svit. Světelné záření dopadající na ozařovaný plast může být jeho povrchem odraženo, rozptýleno, propuštěno nebo absorbováno. Fotochemické změny probíhají tehdy

je-li absorbováno světelné záření o určité vlnové délce. Například karbonylová skupina C=O absorbuje záření o vlnové délce 187 nm a v rozmezí délek od 280 nm do 320 nm. Vazba C-C pak absorbuje záření o vlnové délce 195 nm a 230 nm až 250 nm. V polymerech, které obsahují výše uvedené skupiny budou při ozařování těmito vlnovými délkami indukovány fotochemické reakce. Absorpcí světelného záření se zvětší obsah energie makromolekuly, která se dostává do vyššího energetického stavu. Největší část absorbované energie se spotřebuje na převod elektronového systému do vyššího kvantového stavu. Zbytek této energie je využit na tvorbu volných radikálů v makromolekulách indukujících rozklad některých plastů.

1.2.3 Termická degradace

Teplota má na polymery vliv chemický a fyzikální. Tyto vlivy se podílejí na rozrušování chemických vazeb a na změně konformace molekul. Obecně platí, že k roztržení molekuly dojde v místě nejslabší vazby. Se zvyšujícím se stupněm teploty se zvyšuje stupeň desintegrace molekuly plastu se zkrácenou životností. Sloučeniny obsahující aktivní skupiny odštěpují při zahřívání nízkomolekulární produkty.

1.2.4 Biodegradace

Biodegradace je speciálním případem degradace, při níž dochází k rozkladu polymerů působením biologických činitelů. Známa je biodegradace mikroorganismy, hlodavci a hmyzem. Nejčastěji se na biodegradaci plastů podílejí plísně. Podmínkou jejich růstu je vysoká vzdušná vlhkost. Kromě výše uvedených podmínek hrají důležitou roli i další faktory, jako jsou kombinace materiálů, stupeň stáří plastů, mikroklima a podobně. Metabolity produkované plísněmi a bakteriemi způsobují degradaci samotného polymeru. Enzymy jako je například peptidáza mohou štěpit polyamidovou vazbu a dokonce i vazbu esterovou. Při mikrobiální degradaci plastů dochází k těmto chemickým pochodům:

- dehydrogenace polymerů a adice vody, vznik alkoholů, které jsou oxidovány na mastné kyseliny
- adice volného kyslíku za vzniku hydroxyperoxidu, který se rozpadá a produkty reagují za vzniku alkoholů a dalších sloučenin, které jsou odbourávány až na octovou nebo propionovou kyselinu,

- celulóza a některé termoplasty jsou přes pyruvát a acetylkoenzym-A převáděny do trikarboxylového cyklu. Vznikají tak kyselina citronová, jantarová, fumarová, jablečná atd.
- redukci dvojně vazby mohou vyvolat aktinomycety a některé bakterie štěpení amidové i esterové vazby

1.3 Faktory ovlivňující činnost mikroorganismů

Rychlost biodegradace v půdách je závislá na následujících faktorech, jako jsou:

- Vlastnosti polymeru
- Teplota půdy
- Obsah živin
- pH půdy
- Dostatek kyslíku
- Přítomnost vody
- Typ a počet mikroorganismů schopných biodegradace

Biodegradace je dále závislá na těchto podmínkách jako jsou:

- Adsorpce polymeru na půdních částicích
- Rozpustnost polymeru v půdách vodou
- Pohyb znečišťující látky v půdě

1.3.1 Vlastnosti polymeru

Struktura polymeru

Přírodní makromolekuly, například protein, celulóza, a škrob jsou obecně degradovatelné v biologických systémech hydrolýzou a následně oxidací. Toto tvrzení není překvapující, jestliže většina zveřejněných syntetických polymerů podléhajících rozkladu obsahuje hydrolyzující skupiny v hlavním řetězci, například amidové, esterové, močovinové, hydroxilové, karboxylové a urethanové skupiny, které jsou náchylné k biodegradaci mikroorganismy a na hydrolytické enzymy [2]. Mnoho proteolytických enzymů specificky katalyzuje hydrolýzu peptidů obsažených v proteinu, které jsou substituovány těmito skupinami: benzylové, hydroxylové, karboxylové, methylové a fenylové skupiny. Proto

byly připravené polymery v naději, že vložením těchto skupin do polymeru se zvýší jeho biologická rozložitelnost [11].

Naopak přítomnost nefysiologických substituentů tzv. xenoforů může negativně ovlivnit degradovatelnost jinak jednoduché látky. Za xenofory považujeme např. skupiny -Cl, -NO₂, -SO₃H, -Br, -CN, -CF₃, mohou též -CH₃, -NH₂, -OH, -OCH₃.

Morfologie polymeru

Jeden ze zásadních rozdílů mezi proteiny a syntetický polymery je ten, že proteiny nemají stejné opakování jednotek v polypeptidovém řetězci. Tato nepravidelnost má za následek, bílkovinný polymer méně přechází do krystalinické formy. Tato vlastnost přispívá k biodegradaci proteinů. Na druhé straně syntetické polymery mají obecně krátké opakování jednotek, a tato pravidelnost zvyšuje jeho krystalinitu, tvořenou hydrolyzujícími skupinami nepřístupnými enzymům. Toto tvrzení bylo ověřeno u syntetických polymerů, když polymer měl v řetězci dlouhé opakování jednotek, tak aby dosahoval menší krystalinitu a mohl tak být biologicky rozložen. Ověření bylo prováděno na sérii kopolymeru amid-uretan, kde se zjistilo, že je degradován mikroorganismy [11].

Effekt morfologie na mikrobiální a enzymatické degradaci PCL, byly studované v pracích [12-15]. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) ukázala, degradace částečně krystalinických polycaprolactonových filmů vláknitými houbami, že byly přednostně degradované amorfní části polymeru před degradací krystalinické části. Tato selekce může být přisuzována málo uspořádané amorfní částí, která povolí snadnější přístup pro enzym k polymernímu řetězci. Velikost, tvar a množství krystalinity dosahuje výrazný účinek na pohyblivost řetězců amorfní části a tak ovlivňuje poměr degradace. Toto demonstrovala studie efektů změny orientace řetězců na degradaci [13-15].

Z prací také vyplývá, že enzymový systém je působí selektivně na krystalinické částim které jsou degradované na koncích řetězců pomocí enzymům uvlňovaných do prostředí. Velikost postranní krystalinity má silný účinek na degradaci, protože okraj krystalu je ten, na kterém dochází k degradaci, kvůli krystalickému uspořádání. Množství enzymů, které se poutají na aktivní místa je závislá na daném substrátu. Proto menší krystalinita má za následek vyšší degradace.

Dále bylo zjištěno, že kopolymery s nízkou teplotou tavení jsou nejvíce náchylné na degradaci [16] a nejnižší zbalení řetězců koresponduje s nejrychlejší degradací polymeru.

Molekulová váha

Existuje mnoho studií účinků molekulové váhy na biodegradční procesy. Nejvíce z pozorovaných rozdílů mohou být připsány detekčních změn během degradace, nebo časteji rozdílů mezi morfologií a hydrofóbitou polymerních vzorků s proměnou molekulovou vahou. Mikroorganismy produkují dva enzymy, které endoenzymy uvolňující do prostředí, tyto enzymy degradují polymery vnitř řetězce a endoenzymy, degradující polymery náhodně podél řetězce. Mohlo by se předpokládat, že řetězce o velké molekulové hmotnosti se budou lépe degradovat enzymy uvolňovaných do prostředí a relativně malé molekulové hmotnosti v případě endoenzymů. Ale plasty zůstanou relativně odolní vůči mikrobiálnímu útoku dokud jejich molekulární váha zůstane vysoká. Proto mnoho plastů, jako PE, PP a PS nepodporují mikrobiální růst. Nicméně nízká molekulová váha uhlovodíku může být degradována mikroby, protože jsou pojmuty mikrobiální buňkou a převedeny na buněčné metabolity uvnitř mikrobiální buňky. Nicméně, tyto procesy nefungují dobře v extracelulárním prostředí, protože molekuly plastu jsou příliš velké pro vstup do buňky. Takovýto problém nenastane s přirozenými molekulami, jako škrob a celulóza, protože rozklad polymeru na nižší molekulovou váhu enzymy nastane už vně buňky [2].

Fotodegradace nebo chemická degradace může snižovat molekulovou váhu a potom může nastat mikrobiální útok. Horní hranice molekulové váhy, do které ještě pojmu buňky polymer a nastane vnitrobuněčná degradace, není ještě ustanovena pro všechny materiály na bázi alkanů. Velmi pomalá degradace nastává u látek jako jsou parafin, PE glykoly, a lineární alkyl benzen sulfonáty, kdy délka polymerního řetězce převyšuje 24–30 atomů uhlíku [17-19].

Závěrem lze říci z výsledků, že plasty založené na alkanech s molekulovými váhami 400–500 Dalton (to jest větší než 30 atomů uhlíku) musí být degradovány na menší molekuly např. fotodegradací, chemickou nebo dalšími biologickými činiteli před samotnou biodegradací. LDPE s průměrnou molekulovou vahou $M_w = 150\ 000$ obsahuje asi 11 000 atomů uhlíku. Molekuly této velikosti pro biologicky přijatelné rozměry vyžadují rozsáhlý rozklad PE matrice. Tento rozklad může být částečně proveden přípravou směsí PE a přírodního polymeru schopného rozkladu pomocí organismů, např. členovci, stonožkama a hlemýždi.

Vložení skupiny C=O do řetězce polymeru způsobí rozštěpení řetězce tzv. typ Norrishovy reakce ve fotochemickém procesu [20]. To bylo zjištěné, že E/CO polymery s 2.5% C=O spojením ztratili asi 98% z jejich původní délky po 40 hodinovém ozařování slunečními paprsky. Nicméně, po 650 h expozice, vzorky měly původně $M_w = 618\,700$ a $M_n = 45\,000$ a po fotolýze měly produkty $M_w = 15\,000$ a $M_n = 7300$.

1.3.2 Teplota půdy

Teplota ovlivňuje jednak fyzikální stav uhlovodíku a také stav mikroorganismu, které látku rozkládají. Při nízkých teplotách se viskozita zvyšuje a tím se sníží také vypařování krátkých toxických alkanů, dále se zmenší jejich rozpustnost ve vodě, tento efekt zabrání zahájení biodegradace [21]. Navíc mikrobiální rychlosti růstu jsou funkce teploty [22] a schopnost degradace se snižuje s klesající teplotou. Toto je následek zejména snížení výskytu aktivních enzymů, často popisovaný jako " Q_{10} " jev. Za teplotní maximum při rozkladu uhlovodíků se označuje teplota v intervalu od 30 do 40 °C. Nad touto teplotou se aktivita enzymů snižuje a přes buněčnou membránu se dostávají dovnitř buňky toxické uhlovodíky [21]. Jako optimální teplota při biodegradaci se uvádí teplota mezi 21°C do 31 °C [23].

1.3.3 Obsah živin

Zatímco uhlovodíky jsou vynikající zdroj uhlíku a energie, pro MO jsou neúplná potrava, protože neobsahují významné koncentrace dalších živin jako jsou dusík a fosfor požadovaný pro mikrobiální růst [24]. Pokud je v půdě velké množství organických uhlovodíkových zdrojů, mají MO sklony k rychlému vyčerpání přístupných anorganických živin [25], který vede k omezení stупeň biodegradace. Tak pokud podpoříme MO dodáním potřebných nutrientů může nastat zvýšená účinnost biodegradace [26].

Pokud se vloží uhlovodík do ekosystému, který obsahuje nízké koncentrace anorganických živin vzniká tak často nadměrně vysoký poměr mezi uhlík-dusík nebo uhlík-fosfor, nebo kombinace, které jsou nepříznivé pro mikrobiální růst. Poměr uhlíku-dusík-fosfor-draslík se může upravit přidáním např. močoviny, fosforečnanu, N-P-K hnojiva [21]. Nicméně přidáním živin ve vysokých koncentracích má za následek toxickou vlastnost na MO.

1.3.4 pH půdy

Nejlepší pro půdní MO je interval pH = 6 až 8 [27], ve kterém prospívají. Extrémny v pH, pozorovány v některých půdách, mohly zpomalit schopnost mikrobiální populace odbourávat uhlovodíky. V jednom studiu, úprava pH z 4,5 na 7,4 mělo za následek téměř zdvojnásobení biodegradace ropných látek. Degradace se významně snížila, když pH bylo zvětšeno až na pH = 8,5 [21].

1.3.5 Dostatek kyslíku

Aerobní cesta je nejefektivnější strategie pro biodegradaci [26]. Počáteční reakce v katabolismu alifatických, cyklických a aromatických uhlovodíků bakteriemi a houbami zahrnují oxidace oxygenázami, pro které je potřebný kyslík. Aerobní podmínky jsou proto nutné pro mikrobiální oxidaci uhlovodíků v prostředí. Dostupnost kyslíku v zemích je závislá na mikrobiální spotřebě kyslíku, typu půdy, vlhkosti půdy a přítomnost použitelných substrátů vedoucích k vyčerpání kyslíku [21].

1.3.6 Přítomnost vody

Biodegradace uhlovodíků v půdních ekosystémech může být omezena dostupností vody, která je důležitá pro mikrobiální růst a metabolismus [21]. Půdní mikroorganismy potřebují vodu, která podporuje jejich metabolizační procesy. V důsledku toho se očekává, že mikroorganismy budou reagovat na změny v půdní vlhkosti závislé na pohybu živin v prostředí, teplotě půdy, velikostech částic ovlivňující pórovitost půdy a půdní atmosférické změny [27]. Práce [28] uvedla vztah mezi půdní mikrobiální aktivitou a obsahem vlhkosti. Snížením obsahu vlhkosti má za následek snížení mikrobiální aktivity, a pokud se znovu půda zvlhčí, nastává velké a rychlé zvýšení aktivity MO. Předchozí výzkum také navrhl lineární vztah mezi mikrobiální produkcí CO₂ a obsahem vlhkosti, závislý také na typu půdy [29]. Na druhou stranu extrémně vlhká půda je také nepříznivá pro mikrobiální růst a výměnu látek.

1.3.7 Typ a počet mikroorganismů schopných biodegradace

Mikrobi jsou primární činitelé pro degradaci organických znečišťujících látek v půdě. Rostoucí mikrobiální hustota a aktivita může urychlovat degradaci látek znečišťujících [31]. Rychlost degradace se zvýší pokud je větší počet mikroorganismů v půdě schopných

rozkladu kontaminantu. Schopnost odbourávat uhlovodíky není omezený na několik mikrobiálních rodů. Existuje různorodá skupina bakterií, které mají tuto schopnost [31]. Nejdůležitější rody v půdním prostředí jsou *Achromobacter*, *Actinobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, a *Pseudomonas* spp. Bakterie schopné rozkládat uhlovodíky, *Aspergillus* a *Penicillium* spp. byly často izolovány z mořských a půdních prostředí. Jednotlivé organismy mohou obvykle metabolizovat jen omezenou řadu uhlovodíkových substrátů. Proto je požadované bohaté společenství s širokými enzymatickými kapacitami, aby se odbourávaly komplexní směsi z uhlovodíků [21].

V Petrobas Research centru v Rio de Janeiru, Brazílii, zkoumali biodegradaci mikroorganismy. Nejlepší biodegradace byla získána používáním 10^8 CFU/g půdy, násada obsahovala bakterie *Norcardia nova* (M29) a *Rhodoorula glutinis* (M36) [26].

1.4 Biologicky rozložitelné polymery

Biologicky rozložitelné polymery je možno rozdělit do dvou základních skupin:

- Syntetické polymery
- Přírodní polymery tzv. biopolymery

1.4.1 Syntetické biorozložitelné polymery

Mezi materiály vyráběné ze syntetických surovin je možno zařadit dle [32] převážně estery. Rozšiřování výroby syntetických a přírodních biologicky degradovatelných polymerů úzce souvisí i s vývojem mezinárodní legislativy a s cenovými relacemi na trhu v porovnání s cenami ropy a zemního plynu [2]. V současné době vyráběné polymery lze rozdělit na bázi:

- Kopolyesteru: Ecoflex (BASF), Estar Bio (Chemical)
- Polykaprolaktonu: CAPA (Solvay), Tone polymer (Union Carbide)
- Polybutylensukcinátu: Bionole (Showa Highpolymer)
- Polyesteramidu: BAK (Bayer)
- Polyesteruretanu: MHP 9029 (Bayer)
- Polyesterkopolymeru: Degranil (Bayer)

- Syntetické kyseliny polymléčné: (Fortum)
- Polyesteru: Biomas (Dupoint)
- Polyanhydridů
- Polyvinylalkoholu
- Polyvinylacetátu

1.4.2 Přírodní biorozložitelné polymery

Biopolymery jsou polymery uspořádané v přírodě během vývoje a růstu všech organismů.

Proto jsou také označovány jako přírodní polymery. Jejich syntéza obecně zahrnuje

katalyzovaný systém enzymy, které aktivují monomery. Tyto monomery mohou dále řetězovou reakcí růst do polymerů, které jsou typicky uspořádané uvnitř buněk. Vzniklé polymery můžeme dále dělit podle vzniku na [2]:

- živočišné
- rostlinné
- mikrobiální (bakterie, plísně)

A dále podle chemického složení:

- polysacharidy (celulóza a její deriváty, algináty, dextran, chitosan, kys. hyaluronová)
- bakteriální polyestery (polyhydroxi máselná kys, polyhydroxi alkoholát)
- bílkoviny (kolagen, fibrin)

1.5 Charakteristika použitých polymerů

1.5.1 Polyvinylalkohol

Charakteristika PVAL

Polyvinylalkohol je sypká hmota krystalického charakteru. Patří mezi ve vodě rozpustné a biologicky dobře rozložitelné polymery. Za určitých výrobních podmínek má

termoplastický charakter. Používá se jako zahušťovadlo a stabilizátor suspenzí a na výrobu chirurgických nití.

V práci [33] se zabývali adsorpčními a desorpčními vlastnosti PVAL. A zejména adsorpcí na křemenném písku, huminových kyselinách a půdě. A jeho následnou desorpcí vodou, methanolem, NaOH, CH₃COOH, HCl, H₃PO₄, HF. Všechny analýzy byly sledovány pomocí NMR spektrální analýzy.

Výroba PVAL

Průmyslově se připravuje hydrolyzou alkoholického roztoku polyvinylacetátu v kyselém nebo zásaditém prostředí. Přímá syntéza není možná, protože monomer vinylalkoholu přechází ve stabilnější formu acetaldehyd. Na jeho rozpustnost má vliv obsah acetátových skupin, kde běžný obsah skupin je asi 15 % a rozpouští se v teplé i studené vodě.

Biodegradace PVAL

Prvním zjištěným druhem schopným asimilovat PVAL byl rod *Pseudomonas* izolovaný z půdních vzorků. [3, 4, 34]. Bakteriální rod *Pseudomonas* využívá k degradaci PVAL sekundární alkoholové peroxidázy [3, 5, 6]. Tyto zkoušky byly uzavřeny tím, že počáteční biodegradace probíhá stupňovitě a zahrnuje enzymatickou oxidaci sekundární alkoholové skupiny v PVAL na skupinu ketonu. Následuje dále hydrolyza ketonové skupiny, která má za následek štěpení řetězce.

Dalšími bakteriálními druhy s podobnými vlastnostmi izolované z kontaminovaného prostředí jsou rody *Flavobacterium* [3] a *Acinetobacter* [35], *Alcaligenes*, *Bacillus* [36] a aktivita druhu *Phanerochaete caryosporium* [37].

Degradace PVA houbami a plísněmi byla popsána v práci [Nord FF. Dehydrogenation activity of *Fusarium lini* B. Naturwiss 1936;24:763.], kdy zjistili, že působením *Fusarium lini* a *Phytopathogenic fungus* se produkuje CO₂ a voda následkem extracelulárního útoku dehydratázy.

Jako mikrobiální zdroj posloužila směs půdy, zejména směs zemědělské půdy a lesní půdy. Úpravu půdy obsahuje práce [15]. Bylo zjištěno, že se PVAL rozkládá půdními MO, ale pokud šlo o izolaci těchto bakterií v čisté kultuře tak ztratila tuto schopnost rozkládat PVAL. To se přisuzuje přísným symbiotickým podmínkám. V práci se zmiňují, že se v půdním pohřbívacím testu dosáhlo nízkých stupňů biodegradace PVAL, které byly

způsobeny buďto nedostatkem degradujících MO nebo v pevný vzorek odolával svými vodíkovými vazbami, které překážejí enzymatickému útoku v polymeru [36].

Modifikace PVAL

Neméně důležité jsou i jeho směsi, které nachází čím dál tím více uplatnění v praxi. Například na Katedře plastů a kaučuku na FCHPT, STU Bratislava v spolupráci s UTB Zlín, fakultou technologickou vyvinuli a úspěšně aplikovali do praxe degradovatelný, vodorozpustný polymer PVA/CH. Je to směs na Slovensku vyráběného polyvinylalkoholu (PVA) s hydrolyzátem kolagenu (CH), který se speciální technologií získává z odpadu kožařského průmyslu [38]. Důležitou vlastností PVA/CH je jeho vysoká pevnost za sucha a výborná rozpustnost ve vodě. Tím našel uplatnění v obalovém hospodářství. Výsledky testů biologické degradace PVA ukazují na velmi slabou schopnost degradovat takovýto materiál půdními mikroorganismy a mikroorganismy běžných v komunálních čistírnách odpadních vod. Proto se hledá vhodná mikroflóra schopná degradace na bázi PVA [39].

Další zemí, která se zabývá vývojem a testováním těchto směsí je Maďarsko. Výzkumný ústav potravinářský v Budapešti vyvinul plast na bázi škrobu s přísadou PVA v různém obsahovém poměru od 20 do 47%. Zdroj škrobu posloužily zemědělské plodiny jako kukuřice, brambory a pšenice. Po proběhnutí testů na degradabilitu prošly nejlépe vzorky vyrobené na bázi bramborového škrobu [40].

Další směsi jsou podrobně popsány v práci [8], kde jsou např. zmíněny směsi PVAL/-celulóza, -škrob, -chitin, -želatina, -PHB aj.

1.5.2 Xanthan

Charakteristika Xanthanu

Jedná se o pentasacharid, kde se v řetězci opakují pentasacharidové jednotky sestávající se z β [1-4] řetězce D-glykosylu (celulózozy) a s α [1-3] trisacharidů umístěných na postranním řetězci (D-manóza- β [1-2]-D-glukuronová kys.- β [1-4]-monóza)). Xanthan je vysoce molekulární látka ($2 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^7$) a obsahuje D-glukózu (2,8 mol), D-manózu (3,0 mol), D-glukuronovou kyselinu (2,0 mol), kys. octovou (přibližně 4,7%), kys. pyrohroznovou (přibližně 3%).

V přirozeném prostředí se jedná o rostlinný patogen, protože ucpává cévy rostlin polymerem a znemožňuje tím transport vody. V průmyslu se polymer získává při submerzní kultivaci, kdy dochází k extracelulární produkci tohoto sacharidu.

Vlastností je důležité zmínit jeho vhodné rheologické vlastnosti, protože ředěný roztok je vysoce viskózní a jeho viskozita je nezávislá na teplotě a pH.

Využívá se v potravinářském průmyslu jako stabilizátor ovocného aroma, pивní pěny, při výrobě sirupů, jako přísada pekařských náplní, adhesivum, abrasivum, gelatinizační činidlo, emulgátor v salátových dresingách a při inhibici růstu ledových krystalů ve zmrzlině [10].

Výroba Xanthanu

Za producenta se považuje *Xanthomonas campestris*. Pro jeho syntézu je třeba 12 specifických enzymů.

Proces produkce polymeru probíhá při 28°C a pH = 7,0. Jako zdroj uhlíku se přidává škrob, hydrolyzát škrobu, 1% glukosa nebo 3% sacharosa. Při vyšší koncentraci glukosy se efektivnost snižuje. Kultivace trvá 48-72h. Následná extrakce polymeru se provádí ethanolem. Roční produkce činí 10-20.000 tun [10].

Biodegradace Xanthanu

Cellulomonas sp. LX, který byl nedávno izolovaný z půdních vzorků může odbourávat extracelulární polysacharidy jako je xanthan. Xanthan degraduje aktivní enzym zmíněné kultury, který byl získán z prostředí supernatanu, kde byly pěstované bakterie s přísadkou xanthanu jako jediného zdroje uhlíku. Optimální pH a teplota pro degradaci xanthanu jsou pH = 6.0 a teplota 40°C [41]. Další bakterie pěstované v přítomnosti xanthanu je *Paenibacillus alginolyticus* XL- 1, izolovaná z půdy, která odbourává přibližně 28% xanthanu při pH 6,0 a 55°C [42].

1.5.3 Gellan

Charakteristika Gellanu

Jedná se o lineární anion-heteropolysacharid složený ze čtyř sacharidů β -D-glukózy, β -D-kyseliny glukuronové, β -D-glukózy a β -L-rhamnosy. Opakování jednotek v řetězci je způsobeno karboxylovou postranní skupinou.

Gellan je široce užívaný v potravinářském průmyslu díky jeho schopnostem tvořit průhledné gely, které jsou odolné vůči teplotě a kyselinám v porovnání s dalšími polysacharidickými gely. Gel se utváří prostorovým uspořádáním tepelně reversibilního přechodu ze stavu jednotlivě náhodných makromolekul k více uspořádanému stavu, tak že se makromolekuly párují mezi sebou a tvoří dvojšroubovice. Jednotlivé makromolekuly mohou být zapojeny i do více než jedné spirály. Takovýmto způsobem jsou tvořeny přechody mezi spirálami a následně je získáný gel [43, 44].

Výroba Gellanu

Za zdroj se považuje bakterie rodu *Pseudomonas elodea* [45] a *Sphingomonas paucimobilis* NK2000 [46].

Modifikace Gellanu

Byly vytvořeny směsi s PVAL (gellan/PVAL) s různými váhovými podíly. Dané filmy byly tvořené odléváním při pokojové teplotě [47]. Následná stabilita filmů byla zvětšena chemickou glutaraldehydickou vazbou mezi řetězci. Pro zjištění termických, mechanických a morfologických vlastností bylo použito mnoho metod jako jsou diferenční scanning calorimetrie (DSC), dynamicko mechanická termální analýza (DMTA), scannovací elektronová mikroskopie (SEM), X-ray spektroskopie a termogravimetrická analýza (TGA). Navíc byly provedeny testy za účelem zhodnotit směsi gellan/PVAL na biorozložitelnost [48].

Termální analýza směsi gellan/PVAL filmů ukázala, že rozpouštěcí teplota PVAL zůstává stálá zatímco PVAL rozpouštějící entalpie se snižuje se zvyšováním obsahu gellanu ve filmu. Směsi s obsahem gellanu vyšší než 50% se rozpouštění PVAL neukázalo být velké. To naznačuje, že stupeň krytalinity PVAL se snižuje v přítomnosti gellanu, zatímco krystalinická struktura zůstane změněná. Hodnota T_g PVAL se lineárně zvyšovala se

stoupající obsahem gellanu z hodnoty 67°C (čistý PVA) na 83°C (gellan/PVAL v podílech 60/40). Za to analýza z termogramů ukázala snížení T_m PVAL se stoupajícím obsahem gellanu. Toto by mohlo být způsobeno vyšší pohyblivostí makromolekul v rozpuštěném stavu a vzájemným ovlivňováním oběma polymery [48]. Termogravimetrická analýza ukázala, že tepelná odolnost mezi čistými látkami a směsí nezávisí na složení [49]. Výsledky z této analýzy ukazovaly vzájemné ovlivňování mezi látkami. Pokud byl gellan obsažen v 50%, směs gellan/PVAL se rozdělila a vznikly dvě oddělené fáze. Výsledky DMTA analýzy ukazovaly u směsi gellan/PVA filmů a čistými složkami stejné přechody.

Pomocí povrchové analýze XPS bylo zjištěno, že povrchové chemické složení nebylo různé s ohledem na složení směsi ve smyslu, že žádný homopolymer nemá sklony přesunovat se směrem k povrchu filmu. SEM obrazy ukázaly husté a stejnorodé uspořádání bez známky přechodu fází na složení filmů [48].

1.5.4 PHB

Charakteristika PHB

Mikrobiální syntetizovaný polyester polyhydroxybutyrát (PHB), termoplast, produkující mnohými bakteriemi jako intracelulární uhlík a jako zdroj energie, např. *Azotobacter chroococcum* 23 [50], *Bacillus megaterium* [51].

Výroba PHB

Ve výrobním průmyslu může sušina bakterií obsahovat od 70 do 90 váhových procent PHB [50]. Průmyslově se vyrábí fermentací glukózy např. za přítomnosti bakterie *Azotobacter chroococcum* 23 [52-54]. Obsah PHB v biomase se obsažen ze 75 váhových procent. Obsažený polymer se dále extrahuje z biomasy pomocí chloroformu. Roztok se dále filtruje a vysráží isopropanolem.

Biodegradace PHB

V práci [55] uveřejnili, že PHB je velmi dobře biologicky odbouratelný, mikroorganismy z kontaminované půdy tímto polymerem, během 20 dnů.

Modifikace PHB

U modifikace s PEG byly dosaženy nejlepší výsledky úplné biodegradace u váhového poměru PHB/PEG 10%, a u poměrů PHB/PEG do 10-30%, byly zjištěné nerozložitelné zbytky PEG [56].

1.5.5 Škrob

Charakteristika škrobu

Škroby jsou makromolekuly tvořené glukosou vázanou α -glykosidicky, přičemž tato glukosová jednotka se opakuje tisíckrát až desettisíckrát. Kromě těchto polysacharidických látek obsahují jednotlivé škroby i lipidy a proteiny a zhruba 10 až 20 % vody. Škroby jsou tvořené pomocí dvou různých polysacharidů - amylosy a amylopektinu. Amylosa je lineárním řetězcem, obsahujícím jednotky D-glukosy, navzájem vázané vazbou $\alpha(1,4)$, přičemž tento řetězec má strukturu šroubovice. Amylopektin obsahuje také D-glukosu vázanou vazbou $\alpha(1,4)$, na rozdíl od amylosy však připadá na každých 20 až 25 glukosových jednotek jedno rozvětvení, kdy se nový řetězec váže způsobem $\alpha(1,6)$. Škroby obsahují asi 15 až 25 % amylosy. Amylosa s vodou vytváří koloidní roztok, který na rozdíl od roztoku amylopektinu nepřechází do gelového stavu. Amylopektin se ve studené vodě nerozpouští, jen silně bobtná. Při vyšší teplotě se koloidně rozpouští. Když se takto připravený roztok ochladí, přemění se na gel. Amylopektin i amylosa spolu vytvářejí micelární strukturu škrobových zrn.

Škrob je široce využívaná surovina pro výrobu filmů kvůli rostoucím cenám a klesající dostupnosti tradičních filmů z pryskyřic [57]. Tyto filmy mají nízkou propustnost a jsou tak atraktivní pro výrobu obalových materiálů a výrobě plastů v zemědělství, které jsou pomocí půdním mikroorganismům degradovatelné.

Výroba škrobu

Biodegradace škrobu

Škrob byl po mnoho let používán jako přísada v plastech pro různé účely. Byl přidáván jako plnivo [58] k různým pryskyřicím k tvorbě filmů, které bránily pronikání vody a vodní páry. Dále byl zkoumán jako biodegradovatelná složka v LDPE [59, 60].

Byl připraven škrobem plněný PE film [61], který se stal pórovitý po extrakci škrobu. Tento pórovitý materiál může být napadený mikroorganismy a rychle sycen kyslíkem, tím se zvýší degradace biologickými a oxidačními cestami. Ve studii [62] bylo objeveno, že škrob/PVAL by mohl být použit jako vodě odolný, rozložitelný mulčovací film v zemědělství.

Modifikace škrobu

Pro použití v technických oborech se škroby částečně chemicky upravují - hydrolyzují, esterifikují a podobně. Vytvořením směsí se zlepší jeho vlastnosti [63]. Používá se buďto jako směs granulí nebo se rozpouští ve vodě a smísí se s vhodným polymerem na molekulární úrovni. Ve struktuře polymeru je pak obsažen škrob, který je přístupný enzymům jako je amyláza nebo glykosidáza.

Škrob může být modifikován s nepolárními skupinami, estery tuků [64] už vyvinutou metodou [65]. Nebo ve studii [66] přidali škrob k uretanovému systému pro zvýšení tlumení nárazů pěny. Tyto metody ukazují, že škrobové produkty změni odolnost pěn vůči plamenu a rychleji jsou napadené půdními mikroorganismy.

1.6 Metody testování biodegradability polymerů

Biodegradabilita prvních biodegradovatelných plastů byla testována metodami vyvinutými pro studium schopnosti plastů odolávat mikrobiálnímu napadení [67]. Tyto testy byly posléze nahrazeny metodami, které stanovují koncové produkty mikrobiálního metabolismu. Aby bylo vyhověno všem požadavkům na testování biorozložitelnosti plastů, byla vyvinuta řada metodik pokrývajících téměř celé spektrum prostředí ve kterých plasty po jejich upotřebení končí.

Biodegradace je většinou zapříčiněna enzymy produkovanými mikroorganismy, ale podporují ji i další procesy, které už byly popsány v odstavci 1.3. Mikrobiální aktivita mění zároveň strukturu látek kultivačního média. V anaerobních podmínkách dochází většinou ke snížení pH vlivem organických kyselin produkovaných mikroorganismy. Naproti tomu v aerobním prostředí může pH i vzrůst (při kompostování dochází obvykle ke zvýšení pH na 8-9) [68]. Vlivem ohromných rozdílů v přírodních podmínkách biodegradabilita polymerů silně kolísá jak v globálních měřítcích, tak i v rámci malého ekosystému. To je mimo jiné zapříčiněno i druhy mikroorganismů vyskytujících se v dané

lokalitě. Při testování by podmínky prostředí měly být udržovány co možná nejstandartnější a nejkonstantnější, aby byla zajištěna spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků. Testy můžeme rozdělit na:

Testy s půdním inokulem:

- Zahn-Wellens/EMPA test (ČSN EN 29888, OECD 302B)

Testy s navázkou půdy:

- Půdní pohřbivací (burial) test

Testy, kde je možné použít jak vodní výluh tak i navážku půdy:

- Sturmův test (ISO 17556, OECD 301B, ASTM D 5209)
- Head-space test: CO₂ v plynotěsných lahvích (ISO/DIS 14593)

Nebo se také používají dodatečné analytické metody ke sledování degradability a změny vlastností polymerů a to zejména:

- Scannovací elektronová mikroskopie (SEM Analysis) [69]
- Mechanické zkoušky (zkouška tahem) [69]
- Termogravimetrická analýza (TGA) [70, 71]
- Fourierova infračervená spektroskopie (FTIR) [71, 72]

1.6.1 Zahn-Wellens test (ČSN EN 29888, OECD 302B)

Jde o zkoušku podle normy ČSN EN 29888 z roku 1999, která umožňuje jen testy u rozpuštěných vzorků. Z toho vyplývá, že testovací prostředí je kapalné a úbytek substrátu je sledován pomocí analyzátoru uhlíku. Odběry vzorků jsou přímo z kapalné fáze ve stanovených časových intervalech a je zaznamenáván úbytek organického uhlíku, včetně korekce na blank, čase.

1.6.2 Půdní pohřbivací (burial) test

Jedná se o jednu z normalizovaných metod na stanovení biodegradace, kde se vyšetřuje vzorek materiálu zahrabaný (pohřbený) v chráněných venkovních lokalitách nebo v laboratorním prostředí, kde je lepší kontrola nad teplotou a vlhkostí během procesu [73]. Nevýhodou venkovního půdního burial testu je to, že dochází k nekontrolovatelným

faktorům jako jsou lidský nebo zvířecí faktor a změny podnebí. Pomocí těchto faktorů dochází k nereprodukovatelnosti pokusu. Nicméně, mnozí autoři i přes tyto problémy provádějí burial testy ve venkovních podmínkách v různých ročních obdobích [74, 75].

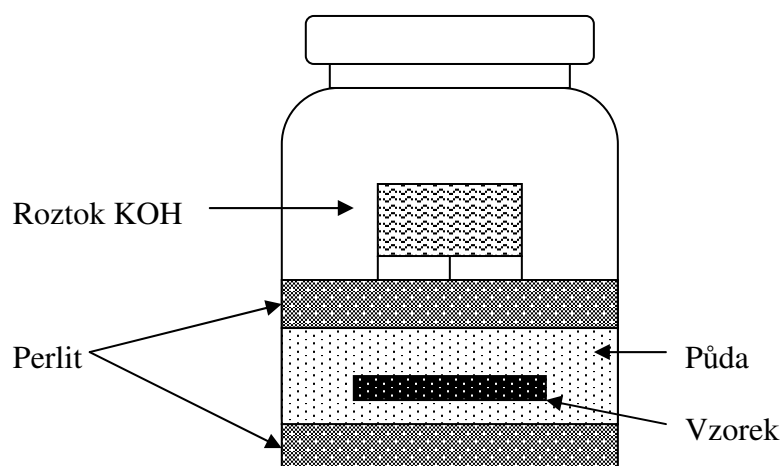
Laboratorní půdní burial testy trpí také nevýhodou a to nedostatek kontroly nad půdními MO. Mnozí autoři chtěli obejít tento problém tím, že naočkovali půdu známými zkušebními MO, nebo provedli sterilizaci půdy a poté ji naočkovali [76]. Nicméně, oba příklady ošetření půdy nevedlo k uspokojivým výsledkům, protože došlo k porušení symbiotických vztahů mezi původními MO.

Půdní mikrobiální společenstvo se skládá z velkého množství jednotlivých MO (bakterie, aktinomycety, houby, kvasinky, řasy, a prvoci) obvykle v rozsahu od $500 \cdot 10^3$ do $500 \cdot 10^6$ na gram půdy [77].

Například laboratorní půdní pohřbívací test je prováděn v práci [69] zahrabáním 350 mg suchého filmu 10g lesní půdy. Vyvinutý CO_2 rozkladem vzorku byl zachycen do roztoku KOH (0,05N) a titrován následně roztokem HCl (1N), s přidávkem BaCl_2 . Výsledek byl dále korigován na slepý pokus a zaznamenán jako procento odstranění substrátu na teoretickou produkci CO_2 .

Nebo lze pokud provést tak, že se vzorek fólie (500 mg) rozstříhá na malé kousky o rozměru (2x2 mm) a smíchá se s 25g kompostovací půdou v láhvi a uzavře a připojí na uzavřený cyklus respirátoru Micro-Oximax (Columbus Instruments, Columbus OH). Teplotní podmínky pro degradaci byly 25°C a záznam produkce CO_2 byl každých 6 hodin po dobu 55 dnů [70].

Alternativu půdních pohřbívacích testů provedli v pokusu [78], kde vytvořili alternativu respirometrické láhve s využitím perlitu, který odděluje půdu se zahrabaným vzorkem zobrazeným na obrázku 2.



Obr. 2. Alternativa respirometrické láhve s využitím buriál testu

1.6.3 Sturmův test (ISO 17556, OECD 301B, ASTM D 5209)

Princip široce užívaného CO₂ evolučního testu, také známého jako Sturmův test, slouží ke stanovení biodegradace organických směsí aerobními MO, za použití vodných testovacích systémů a sledování produkce CO₂. Testovací láhev obsahuje substrát jako jediný zdroj uhlíku, anorganické médium a obvykle aktivovaný kal, získaný z odpadní vody čistírny odpadních vod nebo z jiného zdroje jako je extrakt z půdy nebo je možné použít navážku půdy jako zdroj MO.

Vodní testy jsou kompromisem a řeší problémy, které jsou popsány téměř ve všech kapitolách. Zejména pomalejší a málo efektivní biodegradaci polymerů v samotném půdním prostředí. Tyto testy jsou přechodem mezi testy v půdním a vodním prostředí. Nekopírují sice přesně podmínky probíhající v půdě, ale informují o biodegradacím mechanismu, rychlosti rozkladu, atd. Ve zkratce se o těchto testech dá říci, že nedávají přesný pohled na biodegradaci v půdě, ale jsou z mnoha ohledů výhodnější (např. rychlost biodegradace).

Principem pokusu je, že testovací láhve jsou provzdušňovány vzduchem zbaveného CO₂ a jsou uskladněny při 20 ± 2°C obvykle 28 dnů za neustálého míchání magnetickým míchadlem. CO₂ vyprodukovaný během mikrobiální degradace je jímán ve dvou externích nádobách obsahující vodný roztok NaOH. Vzorky jsou odebírány v pravidelných časových intervalech a je z nich počítán stupeň biodegradace.

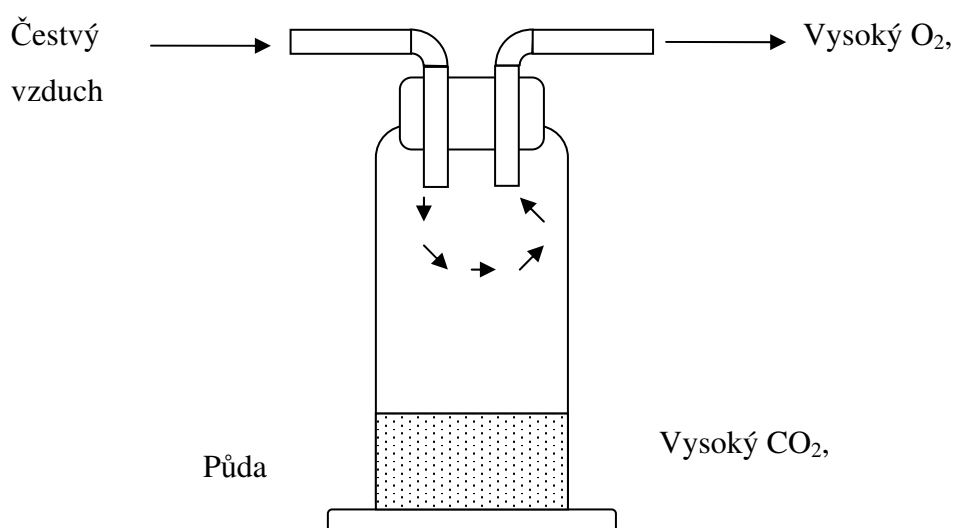
Je možné také použít alternativu jako automatický CO₂ evoluční test. Kdy do roztoku NaOH je ponořena nakalibrována elektroda a měří se vodivost roztoku. Tento roztok musí být neustále míchán. Přeměna je zjišťována z vodivosti vztažená na koncentraci CO₂ (mg.l⁻¹) a po odečtení blanku je vypočítán stupeň biodegradace [79].

ISO 17556 – Měření úplné aerobní biodegradace polymeru v půdách

V práci [41] byla zkoumána vhodnost zkušební metody ISO/DIS 17556 pro plasty: stanovení konečných produktů aerobního rozkladu v půdě - měřením spotřeby kyslíku nebo produkce oxidu uhličitého.

Z naměřených výsledků při používání komerční rašeliny se zjistilo, že má vysokou endogenní respiraci. Je to z toho důvodu, že rašeliny jsou velmi bohaté na organický uhlík (23%). Pro překonání tohoto problému se dávkovalo menší množství půdy (20g) i zkoušeného materiálu (100 mg) což podporuje ISO normě.

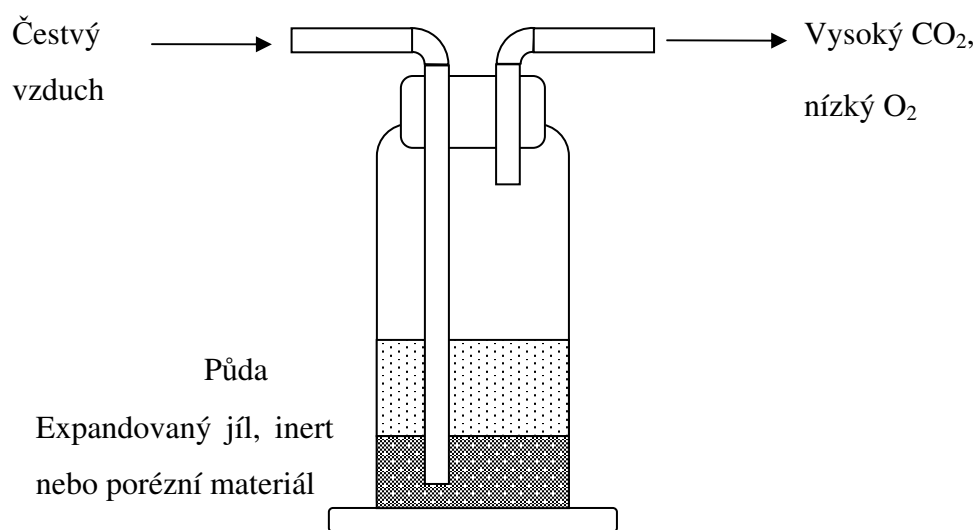
Pomocí takových nízkých množství dosáhla celulóza konečné biodegradace asi 80%. Ale na druhé straně, materiály, které mají vysokou schopnost biodegradace dosáhly rozkladu jen mezi 35 - 45 %. Problém by mohl být následkem náčrtku reaktoru navrhovaného v ISO normě. Podle ISO/DIS 17556 by mělo provzdušnění atmosféry vypadat následovně:



Obr. 3. Reaktor dle ISO/DIS 17556

Problém je u provzdušňování, protože průtokové rychlosti jsou nízké. Díky tomu dochází k nedokonalé výměně plynu v láhvi a tím i ke ztrátám vyprodukovaného plynu CO₂ a

špatnému okysličení půdy. Aby se vyvarovali tohoto problému byla použita aparatura na následujícím obrázku.



Obr. 4. Upravený měřící systém pro degradaci v půdách

Vzduch je vháněn skrz půdu, do inertní pórovité matrice (kousky cihel, perlit aj.). Použitím nově sestaveného reaktoru byly dosaženy vyšší koncentrace CO_2 a tím pádem větší úroveň degradace materiálu.

1.7 Metody stanovení uhlíku a respiračních plynů (CO_2 , O_2 , CH_4)

Pro stanovení spotřeby substrátu existuje mnoho metod, které jsou detailně popsány ve vědeckých pracech. Ale pro naše potřeby poslouží jen metoda založená na stanovení TOC u vodných testů. Podrobnější popis metod je uveden v experimentální části.

Pro stanovení respiračních plynů v testech používáme známé metody zmíněné v předcházejících kapitolách, jako jsou pro stanovení produkce oxidu uhličitého (CO_2):

- Plynová chromatografie
- IR-spektroskopie
- Titrační analýza

Dále pro stanovení úbytků kyslíku (O_2) v aerobním prostředí:

- Plynová chromatografie
- Analyzátoru magnetické rezonance

1.7.1 Plynově chromatografická analýza (GC)

Plynově chromatografická analýza se používá dle normy ISO 6974 a je zde uveden příklad z práce [80] měření hlavních plynných složek (CH_4 , CO_2 , O_2 , N_2 a Ne), které byly analyzované na mobilním CP-2002P Chrompack-Micro GC (Chrompack International BV, Nizozemí). Plynový chromatograf byl vybavený tepelně vodivostním detektorem (TCD) a dvěma kolonami. O_2 a N_2 byl rozdělován na koloně dlouhé 4 metry (Molsieve 5A) a CH_4 , CO_2 na 10 metrové koloně (Poraplot Q). Jako nosný plyn se používalo hélium a teplota termostatu (kolon) byla 40°C . Pro kalibraci byl použit standardní plyn od fy. MicroLab (Aarhus, Dánsko).

1.7.2 Použití přístroje Micro-Oxymax

Použití respiračního přístroje Micro-Oximax (Columbus Instruments, Columbus Ohio) již zmíněného v pohřbívacích testech kapitola 1.7.2 je velmi výhodné [70]. Výhody jsou, že přístroj pracuje sám dle nastavených parametrů v programu a záleží jen na přídavných detektorech co se bude měřit. V našem případě jde o měření respiračních plynů CO_2 , O_2 , CH_4 . Nevýhodou je jen cena měřicího systému a absence přístroje, jako alternativu měření, v normách ISO či ČSN.

Tento přístroj verzi 6,0 a se softwarem verze 6,06d upgradovaný na 6,09 používali v práci [81]. Přístroj měřil množství vyprodukovaného CO_2 pomocí IR-detektoru. Měřené vzorky byly udržované za aerobních podmínek. Vzorky v množství 25 - 100 mg byly umístěné v 250 ml láhvích. Předchozí výzkumy v Cal Poly ukázal optimální teplotu půdy mezi 25 a 30°C [82], v závislosti na podnebí, kde se půda vyskytovala, byly lahve umístěné ve vodní lázni (Precision 180 Series) při teplotě 30°C . Přístroj byl nastavený analyzovat CO_2 každé tři hodiny a refreš (obnovení plynné atmosféry) lahví každých šest hodin. Výsledky vyjadřovali jako $\text{ml CO}_2\cdot\text{g}^{-1}$ půdy za hodinu. Použité nastavení přístroje v programu je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1. Nastavitelné proměnné v respiračním experimentu

Sample interval for experiment (HHH:MM:SS):	003:00:00
Duration of experiment in minutes:	4320-8640
Purge sensors between measurements:	YES
Refresh threshold (% O ₂ or CO ₂):	0
Refresh experiment after this many samples (2-99):	2
Refresh window (seconds):	45
Starting chamber to use auxiliary temperature probe:	0
Automatically measure chamber volumes in this experiment:	NO
Sensor Volume re-measurement interval (0=Do not use):	0
Gas Measurement units (1=ul, 2=ml, 3=mg, 4=um, 5=um):	1
Time units (1=minutes, 2=hours):	2
Normalize units (0=No normalize, 1=gm, 2=kg, 2=ml, 4=l):	1
Measure O ₂ consumption as a positive number:	NO
Calculate % of Theoretical Maximum Yield:	NO
Starting Channel used for control, 0 = not used:	0
Number of channels to use for control (0-4):	0

1.8 Střediska informací o biologické degradaci

Zde je uvedeno několik zahraničních center a agentur, které se zabývají biologickou rozložitelností.

- Biodegradation Information Centre (The University of Aston, Anglie)
- Information Service of Toxicity and Biodegradability - INSTAB (Water Pollution Research)
- Laboratory Stevenage, Anglie
- US Environmental Protection Agency (databanka OCPDB)
- Institut für Wasserforschung - Dortmund (databanka DABAWAS)

- Henkel - Düsseldorf (databanka SUSANA)
- Institut für Wasserwirtschaft, Berlin

U nás jsou od šedesátých let shromažďovány údaje o biologické rozložitelnosti na:

- Ústavu technologie vody a prostředí VŠCHT v Praze.

1.9 Návaznost a cíle diplomové práce

Práce navazuje na předcházející diplomové práce zabývající se sledování biologické rozložitelnosti v půdním prostředí pomocí acidimetrickým a plynově chromatografickým stanovení produkovaného oxidu uhličitého.

Práce Sedláře J. [83] se zaměřovala na půdní prostředí, kde byl sledován rozklad PVAL. Bylo potvrzeno, že rozklad PVAL v půdním prostředí je omezen z následujících příčin: kyselá povaha půdního substrátu, nižší dostupnost polymeru mikroorganismům, z důvodu dávkování ve formě prášku, a nevhodně zvolená vyšší teplota biodegradace.

Cílem práce Dvořákové M. [84] bylo ověření použitelnosti plynově-chromatografické koncovky jako jediného kritéria biodegradace polymerů. Pro testování byly použity směsné plastové fólie v půdním prostředí a ve vodném prostředí s půdním výluhem jako inokulem. Při hodnocení biologické rozložitelnosti byly prováděny testy sledující produkci oxidu uhličitého a úbytek organického uhlíku.

Poslední diplomová práce Malaníka P. [85] byla zaměřena na sledování biologické rozložitelnosti v půdním prostředí pomocí acidimetrického a plynově chromatografického stanovení produkovaného oxidu uhličitého a porovnání těchto analytických metod. V testech byly aplikovány ve vodě nerozpustné polymery jako jsou polyhydroxybutyrát, poly- ϵ -kaprolakton (PCL) a jejich směsi. V některých testech byly jako modelové substráty použity také hydrolyzát kolagenu (HYKOL) a polyvinylalcohol.

Tato diplomová práce je zaměřená na sledování rozložitelnosti biopolymerů v půdním prostředí za aerobních podmínek a nalezení vhodných podmínek pro biologickou rozložitelnost v půdních testech. Pro sledování biologických procesů byly použity analýzy plynné fáze v biologických reaktorech pomocí titrační analýzy, plynové chromatografie, infračervené analýzy a paramagnetické rezonance na automatickém analyzátoru MicroOxymax.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie a roztoky

Při laboratorních pokusech byly použity chemikálie čistoty p. a. od fy. Lachema a. s., Česká republika. Byla použita kys. chlorovodíková, hydroxid sodný, chlorid barnatý, chlorid sodný, 0,5% roztok fenolftaleinu, methyloranž, hydrogen uhličitán draselný, síran amonný, hydrogen fosforečnan sodný, minerální médium, He jako nosný plyn pro GC čistoty 4.6, směsný syntetický plyn obsahující CH₄ (4,05 obj.%), CO₂ (0,798 obj.%), N₂ (95,152 obj.%).

Roztok minerálního média

Složení minerálního média bylo v souladu s příslušnou normou ČSN EN 29408 [86] týkající se hodnocení biologické rozložitelnosti látek ve vodném prostředí. K přípravě bylo použito zásobních roztoků připravených rozpuštěných následujících solí v 1 litru destil. vody. Fosfátový pufr byl připraven neutralizací cca 1M H₃PO₄ roztoku cca 3M NaOH na konečné pH = 7,05. Roztoky jsou následující:

- A. Fosfátový pufr pH = 7,05
- B. 10,0g (NH₄)₂SO₄ - síran amonný
- C. 27,5g CaCl₂ - chlorid vápenatý
- D. 0,25g FeCl₃ · 6 H₂O - chlorid železitý hexahydrát
- E. 22,5g MgSO₄ · 7 H₂O - síran hořečnatý heptahydrát
- F. Roztok stopových prvků:
 - 0,75g H₃BO₃ - kyselina boritá;
 - 0,05g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O - molybdenyn amonný tetrahydrát;
 - 0,18g CoSO₄ · 7 H₂O - síran kobaltnatý heptahydrát;
 - 0,5g MnSO₄ · 4 H₂O - síran manganatý tetrahydrát;
 - 0,05g CuSO₄ · 5 H₂O - síran měďnatý pentahydrát;
 - 0,1 g ZnSO₄ · 7 H₂O - síran zinečnatý heptahydrát;
 - 3g FeSO₄ · 7 H₂O - síran železnatý heptahydrát

Na přípravu 800 ml minerálního média v dest. vodě, která byla předem provzdušněná po dobu 24 hodin, bylo dávkováno po 1 ml zásobních roztoků C, D, E, F. Dále bylo přidáno 100 ml roztoku A a 5 ml zásobního roztoku B. Po nadávkování do 1 l odměrné baňky byl doplněn objem doplněn po rysku.

2.2 Testované vzorky

V testech byly použity následující materiály.

- PVAL (obchodní značení SLOVIOL P88-08, viskozita 4 % vodného roztoku při teplotě 20°C = 8 mPa.s, stupeň hydrolyzy 88 mol %, obsah acetátových skupin 12 %, výrobce Novácké chemické závody a. s. , SR)
- 88-08 (obchodního označení SLOVIOL, výrobce Novácké chemické závody, a. s., SR. byl dodán jako prášková forma)
- neupravený škrob (obchodní název Meritena 100, jednalo se o přírodní neupravený kukuřičný škrob v práškové formě)
- karboxymethyl celulóza (dodavatel Aldrich Chemical comp., molekulová hmotnost 250 000 g/mol, bod tání = 270°C, disociační stupeň = 0,9, stanovené TOC = 30,26 %)
- mikrokystalická celulóza (obchodní název AVICEL PH-101, výrobce Biochemika Fluka, forma bílého prášku o velikosti částic ~50µm)
- Xanthan (výrobce Biochemika Fluka, bílý přírodní prášek rozpustný ve vodě, stanovené TOC = 31,31 %)
- PHB (výrobce Biomer a.g., BRD, prášková forma, molekulová hmotnost 327 000g/mol, stanovené TOC = 54,95 %)
- směsné polymerní fólie na bázi PVAL: D97/234, D97/235, D97/236, které obsahovaly látky jako jsou: PVAL 205, škrob Meritena 100, plastifik. škrob GS 14/30, Hykol E, glycerín a Lignin 2, v daných procentuelních hmotnostních poměrech zastoupení uvedených v Tabulce 2. podrobnější popis a výroba jsou uvedené diplomové práci [84].

Tabulka 2. Složení směsných polymerních fólií na bázi PVAL

Typ fólie	POVAL 205		Škrob Meritena 100		Plastik. škrob GS 1A/30		Hykol E		glycerín		Lignin 2	
	g	% *	g	%*	g	%*	g	%*	g	%*	g	%*
D/97/234	207,3	70	30	10	0	0	0	0	45	15	15	5
D/97/235	207,3	70	0	0	45	15	0	0	30	10	15	5
D/97/236	207,3	70	30	10	0	0	15	5	45	15	0	0

2.3 Biologický materiál

Testy ve vodním prostředí

U testů biologické rozložitelnosti ve vodném prostředí bylo jako zdroj mikroorganismů použit vodný výluh mikroorganismů z půdy tzv. půdní výluh, připravený dle návodu v kapitole 2.8.

Půdní testy

V případě půdních testů byla použita směs 3 půd. Dvou komerčních půd zahradního substrátu a speciálního hrobového substrátu a jedné přírodní půdy (odběr Holešov) v poměrech 2 : 1 : 1.

Použité půdy měly následující vlastnosti uvedené, výrobcem nebo změřené, v Tabulce 3 a 4. Hodnoty označené *, byly naměřené, ostatní byly uváděny výrobcem.

Tabulka 3. Parametry půdních substrátů fy. Agro CS a.s. a přírodní půdy

Parametry	Substrát zahradní	Substrát na hroby	Přírodní půda
pH	5,0 – 7,0	5,0 – 6,5	---
Ztráta žíháním* [%]	90,36	91,16	16,32
N [mg/l]	150 – 400	100 – 300	---
P ₂ O ₅ [mg/l]	80 – 250	100 – 300	---
K ₂ O [mg/l]	250 – 600	100 – 300	---
Sušina* [%]	42,009	52,837	88,017

Tabulka 4. Parametry směsi půd v daném poměru

Parametry	Směs půd
pH*	6,557
Ztráta žíháním [%]*	79,52
N* [%]	0,5
P* [%]	0,11-0,22
TOC* [%]	32,9
Sušina*	49,74

2.4 Materiál k „ředění“ půd

U půdních testů ředěných perlitem byl používán Agroperlit fy. Semos cz. Jednalo se o expandovanou vulkanickou horninu, která se v běžné praxi používá jako materiál, který kypří, vylehčuje a provzdušňuje půdu, zadržuje vodu a v ní rozpuštěné živiny. V tabulce 5 jsou uvedeny chemické a fyzikální vlastnosti perlitu.

Tabulka 5. Parametry Agroperlitu udávané výrobcem

Vlastnosti	Hodnota
Vlhkost [%]	max. 2,0
pH	6,0-7,5
obsah částic pod 0,3 mm [%]	max. 15,0
obsah částic pod 1,0 mm [%]	max. 25,0
obsah částic pod 1,0-4,0 mm [%]	max. 75,0
sypná hmotnost [kg/m ³]	max. 200

2.5 Použité přístroje a pomůcky

- Analyzátor celkového organického uhlíku TOC-5000 A, Shimadzu Corp., Austrálie
- Plynový chromatograf CHROM 5, Laboratorní přístroje Praha s TCD detektorem a integrátorem Hewlett Packard HP 3396A
- Mikrorespirometr MicroOxymax, Columbus Instruments International Corp., USA
- Plynotěsné injekční stříkačky Hamilton o objemech 250 µl a 1 ml
- Tedlarův vak o objemu 0,6 l

Ostatní použité přístroje a pomůcky byly běžnou součástí chemické laboratoře.

2.6 Měřící aparatury

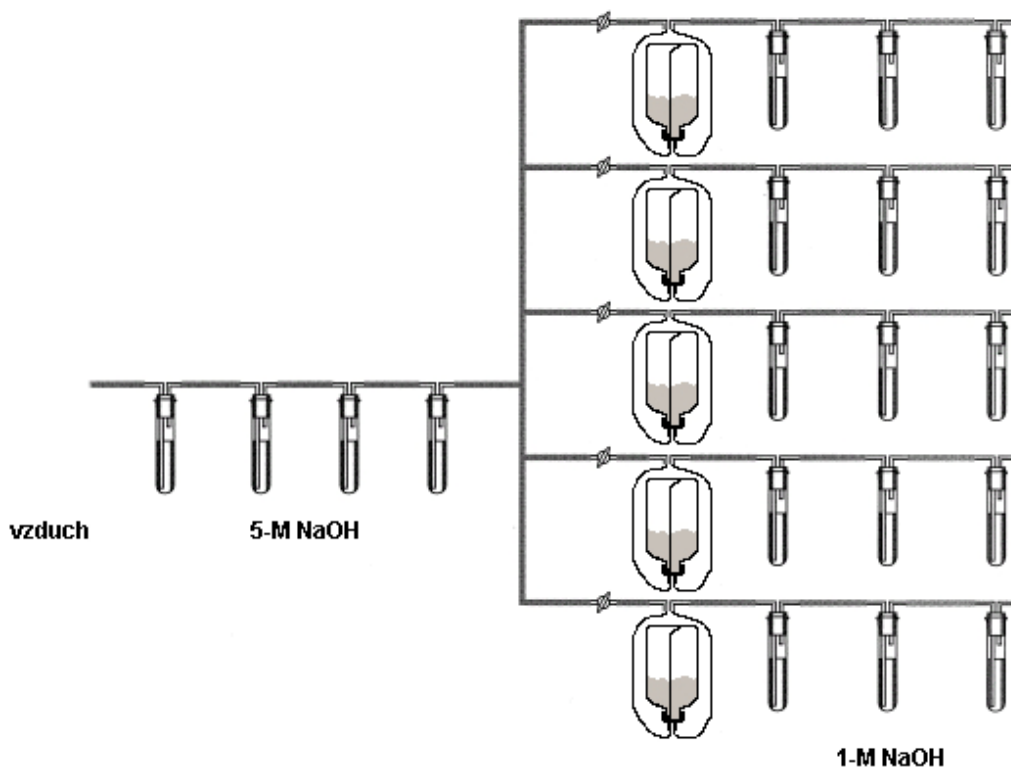
2.6.1 Lahvová aparatura

Popis testovacích lahví

Byly použity plynotěsně uzavřené lahve o celkovém objemu 1140ml. Lahve byly opatřeny uzávěrem, který obsahoval 3 otvory. První otvor opatřený pryžovým septem byl používán pro odběr plynné fáze k GC analýzám. Druhý tzv. jehlový otvor byl používán pro vstup čistícího vzduchu při provzdušňování testovacích lahví vzduchem prostým CO₂. Třetí otvor sloužil jako výstup plynné fáze do adsorbérů s NaOH. Schéma použitých lahví je obsažen v práci [84, 87].

Popis lahvové aparatury

Aparatura byla složena z čistící a absorpční větve. Čistící větev byla tvořena promývacími baňkami, z nichž dvě byly prázdné tedy pojistné a dvě byly čistící, které obsahovaly 200ml 5M-NaOH. Absorpční větev (detekční část) byla tvořena sadou tří adsorbérů. V prostřední řadě nastával záchyt vyprodukovaného CO₂ z vlastních bioreaktorů do 30 ml 1M-NaOH. Lahve, ve kterých probíhala biodegradace, byly připojeny pomocí silikonových hadiček na čistící a absorpční větev aparatury, obrázek 5. To umožňovalo diskontinuální provzdušňování lahví. Vzduch byl do aparatury nasáván pomocí čerpadla, jehož rychlost nasávání byla nastavena pomocí tlaček pro všechny lahve stejně.



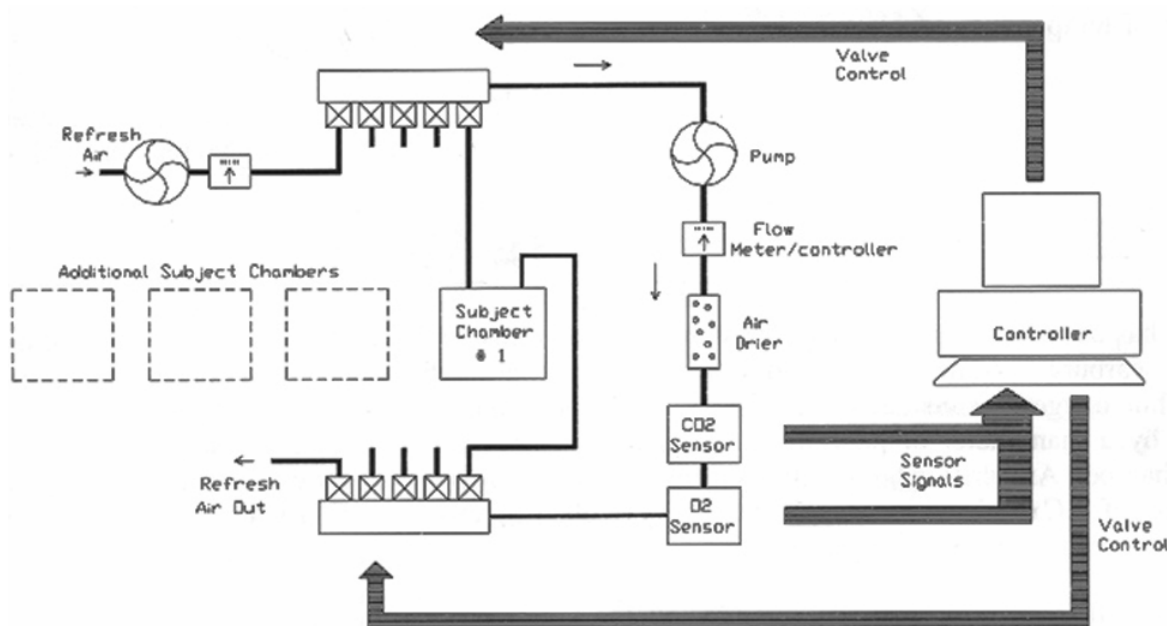
Obr. 5. Schéma aparatury sloužící k provzdušňování testovaných lahví

2.6.2 Automatický analyzátor MicroOxymax

Jedná se o automatizované, diskontinuální měření produkce CO_2 , CH_4 a spotřeby O_2 . Směs inokula, vzorku a biomédia se nachází v reakčních baňkách, které jsou umístěny v temperované vodní lázni. Přístrojové vybavení poskytuje 30 měřících pozic. Do reakčních baňek je ve zvolených časových intervalech, pomocí čerpadel, vháněn vzduch zbavený atmosférického CO_2 , přičemž původní plyn v reakčních baňkách je analyzován. MicroOxymax obsahuje tři detektory: CH_4 detektor, CO_2 detektor a O_2 detektor. Detektory pro analýzu CH_4 a CO_2 pracují na principu infračervené spektroskopie (IR) a detektor pro analýzu O_2 na principu paramagnetické rezonance (PMR). Měřící rozsah detektorů je pro IR-detektor 0 až 1 obj.% CO_2 a pro PRM-detektor 19,8 až 21 obj.% O_2 . Pokud se dostane koncentrace mimo interval detekce tak přístroj není schopen změřit správnou koncentraci.

Naměřené údaje jsou odesílány do počítače, kde jsou zpracovány a vyhodnoceny ve formě dat, které jsou přímo přepočteny na hodnoty: rychlosti produkce CO_2 nebo rychlosti spotřeby O_2 , kumulativní produkce CO_2 nebo kumulativní spotřeby O_2 . Přístroj dále udává

čas měření, tlak a teplotu měřícího systému. Přístrojem lze také sledovat procesy probíhající v anaerobních podmínkách. Schéma aparatury je uvedena na Obrázku 6.



Obr. 6. Schéma mikrorespirometru MicroOxymax (Columbus Ins. International Corp., USA)

2.7 Metody hodnocení průběhu biologického rozkladu dle složení plynné fáze

Pro zjišťování a popisu vhodných podmínek v testech biodegradace se vycházelo z metod sledování produkce CO_2 mikroorganismy, které rozkládaly testované látky ve vodním nebo v půdním prostředí za aerobních podmínek. U všech testů byl průběh rozkladu hodnocen na základě produkce CO_2 v důsledku probíhajících mikrobiálních procesů. Jednalo se tedy o tzv. respirometrický test stanovení produkce CO_2 , který je v případě testů ve vodním prostředí upravován normou ISO 14852 a v případě půdních testů normou ISO 17556 [88]. Testovaný materiál byl v prostředí jako jediný zdroj uhlíku a energie pro mikrobiální kulturu. Hodnotícím kritériem v průběhu biologického rozkladu bylo sledování poměru skutečného vyprodukovaného množství CO_2 mikroorganismy při rozkladu vzhledem k jeho teoretickému množství CO_2 (ThCO_2) uvolněného případně úplnou oxidací testovací látky (DCO_2).

Množství vyprodukovaného CO₂ bylo stanovováno těmito různými metodami:

- plynová chromatografie
- titrační analýza
- IR analýza

Pro zjištění vhodných podmínek za kterých testy probíhají bylo nutné sledovat v plynné fázi také množství O₂, abychom věděli zda-li jsou zajištěné aerobní podmínky. Množství O₂ bylo stanovováno těmito metodami:

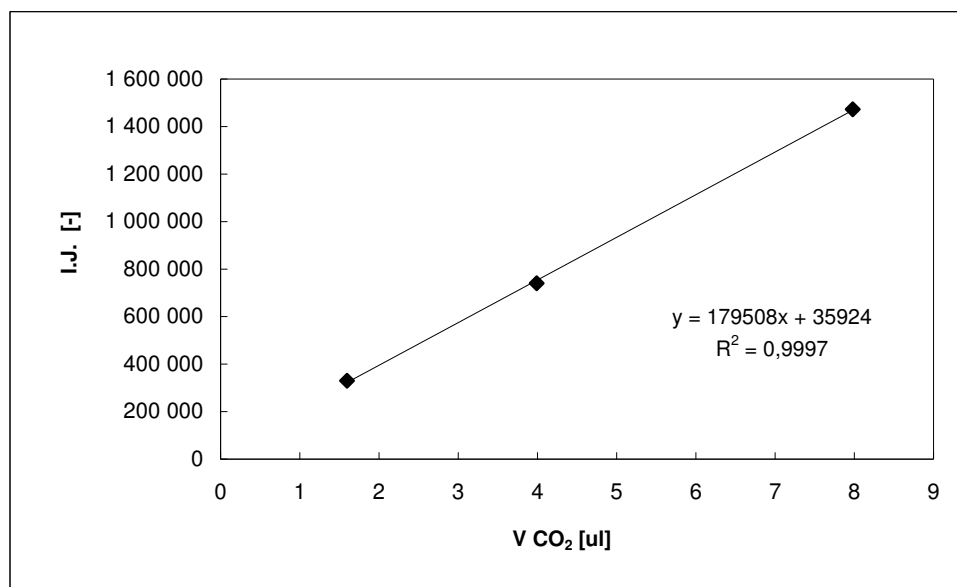
- plynová chromatografie
- paramagnetická rezonance

2.7.1 Analýza CO₂ plynovou chromatografií

K separaci a následnému zjištění koncentrace CO₂ byla použita plynová chromatografie (GC) s náplňovou kolonou o délce 3,6 m a vnitřního průměru 3 mm. Kolona byla plněna Porapakem R. K detekci plynů byl použit tepelně vodivostní detektor (TCD). K vyhodnocení signálu z detektoru byl použit integrátor HP 3396A. Jako nosný plyn bylo použit Helium čistoty 4.6. Pro stanovení CO₂ byla použita metoda kalibrační přímky na standardní plyn fy. LINDE. Kalibrační přímka je uvedena na Obrázku 7. Parametry nastavené na plynovém chromatografu CHROM 5 jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6. Nastavení přístroje CHROM 5 na měření CO₂

Kolona	náplňová s Porapakem R	
Teploty	Nástřík	100 °C
	Teplota termostatu	50 °C
	TCD	100 °C
Nosný plyn	He (čistota 4.6)	
	Průtok kolonou a TCD 30 ml/min	
Nastavení detektoru	Žhavicí proud	120 mA
	Výstupní citlivost	4



Obr. 7. Kalibrační přímka standardního plynu s CO₂

Měření obsahu CO₂ lahvích probíhalo v daných časových intervalech nebo dle potřeby v závislosti na produkci CO₂. Vzorkování plynu bylo prováděno plynotěsnou stříkačkou fy. Hamilton, kdy byl z lahví přes septum odebrán plynný vzorek. Objem odebraného plynu byl odebírán v takovém množství, aby byl v rozsahu kalibrační přímky. Výpočet množství vyprodukovaného CO₂ jsou uvedeny v kapitole věnované výpočtům. Výsledky byly vyjadřovány jednak jako kumulativní produkce CO₂ pro všechny láhve a pak jako DCO₂, graficky a tabelárně.

2.7.2 Analýza obsahu CO₂ titrační metodou

Ve zvolených časech testu byly všechny testovací láhve připojeny na soustavu, Obrázek 5, umožňující provzdušňovat vzduchem prostým atmosférického CO₂. Takto upravený plyn ředil plynnou fází a z láhve vytěsňoval vyprodukovaný CO₂, který byl jímán do 30 ml cca 1M-NaOH po dobu 2 hodin a následně stanovován titrační metodou pomocí cca 1M-HCl na fenolftalein. Pro titrační analýzu se pipetovalo 5 ml z adsorbčního roztoku NaOH, ke kterému se přidalo 5,5 ml 0,5M-BaCl za účelem vysrážení uhličitánů, které by ovlivňovaly titraci zbylého hydroxidu. Přesné koncentrace HCl byla stanovena standardizací na 1M-KHCO₃ na indikátor methyloranž, a koncentrace NaOH byla následně stanovena HCl o přesné koncentraci na indikátor fenolftalein.

2.7.3 Analýza CO₂ IR spektroskopii

Ke zjištění koncentrace CO₂ v testech provedených na přístroji MicroOxymax byla použita IR spektroskopie, popsána v kapitole 2.6.2.

2.7.4 Analýza O₂ plynovou chromatografií

Stanovení O₂ sloužilo jako doplňující analýza ke stanovení CO₂. Obsah O₂ byl analyzován plynovou chromatografií (GC) s náplňovou kolonou, obsahují molekulové síto typu 13X, o délce 3,6 m a vnitřního průměru 3 mm. K vyhodnocení signálu z detektoru byl použit integrátor HP 3396A. Nosný plyn bylo použito Helium čistoty 4.6. Pro stanovení O₂ byla použita metoda kalibrační přímky na atmosférický kyslík a v den měření se ověřoval jeden kalibrační bod, na který se přepočítavala aktuální konc. O₂ v testovaných lahvích. Parametry nastavené na plynovém chromatografu CHROM 5 jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7. Nastavení GC přístroje na měření O₂

Kolona	náplňová s molekulovým sítem 13X	
Teploty	Nástřik	30 °C
	Teplota termostatu	21 °C
	TCD	100 °C
Nosný plyn	He (čistota 4.6)	
	Průtok kolonou a TCD 30 ml/min	
Nastavení detektoru	Žhavicí proud	100 mA
	Výstupní citlivost	4

Měření koncentrace O₂ bylo prováděno současně s odběry plynů na stanovení CO₂. Vzorkování bylo prováděno plynotěsnou stříkačkou fy. Hamilton.

2.7.5 Analýza O₂ paramagnetickou rezonancí

Ke zjištění koncentrace O₂ v testech provedených na přístroji MicroOxymax byla použita paramagnetická rezonance, popsána v kapitole 2.6.2.

2.8 Ostatní laboratorní postupy a analýzy

Příprava směsi půd

Půd byly zbaveny hrubých nečistot např. kameny, kousky větví, listy aj. a byly zjištěny aktuální sušiny jednotlivých typů půd. Pomocí sušin byly vypočítány navážky půd pro přípravu směsi o hmotnosti 60g a 100%-ní sušině v daných poměrech. Dále bylo nutné

připočíst ke každé navážce cca 5% z hmotnosti půd navíc, z důvodu ztrát a korekce na obsah organických nečistot. Půdy před použitím byly uchovávány při 5°C v temnu.

Příprava půdního výluhu

60 g půdy o vlhkosti 50 % bylo smícháno se 300 ml vytřepávacího roztoku. Na 100 ml vytřepávacího roztoku bylo použito 0,5 g NaCl a 0,4 g Na₂HPO₄ a 100 ml minerálního média. Ke směsi bylo přidáno malé množství skleněných kuliček a třepáno na třepačce asi 120 minut. Poté byla suspenze přefiltrována přes předem promytý filtrační papír.

Takto připravený půdní výluh byl před použitím 24 hod. provzdušňován ve vhodné nádobě. A to z důvodu minimalizace organického a anorganického podílu ve výluhu.

Příprava perlitu

Přibližně 2 litry perlitu bylo promýváno 4 litry destilované vody. Tento postup byl opakován do té doby až byl perlit zbavený prachových a hrubých částic (kamínky).

Stanovení TOC na analyzátoru uhlíku

Princip stanovení TOC byl založen na oxidaci veškerého organického uhlíku ve vzorku ve spalovací trubici s platinovým katalyzátorem při 670 °C v proudu kyslíku. Vzniklý CO₂ byl veden do NDIR detektoru (Non-Disperse Infrared Detector), kde signál vznikající absorpcí příslušné vlnové délky byl registrován jako plocha píku přímo úměrná koncentraci TOC ve vzorku. Množství uhlíku se vypočítalo pomocí kalibrační přímky [89].

Stanovení sušiny

Do předem vysušených a zvážených petriho misek s přesností na 0,0001g byl přidán vzorek půdy, směsi půd nebo ředěné směsi půd perlitem. Petriho misky byly sušeny při teplotě 105°C po dobu 3 hodin do konstantní hmotnosti. Po ochlazení v exikátoru byly zváženy s přesností na 0,0001g. S rozdíly hmotnosti vzorku před a po sušení se vypočítala sušina vzorku v procentech [90].

Stanovení pH půdních vzorků

Měření vycházelo z normy ČSN ISO 10390. Podstata zkoušky byla připravit suspenzi půda-destilovaná voda v poměru (1:5 v/v). Objem kapaliny byla 5 násobkem měřeného

objemu půdy. Takto připravená suspenze v láhvi byla důkladně ručně protřepána a dána na třepací stroj, kde byla po dobu 6 hodin mírně třepána. Po té bylo změřeno pH roztoku.

Stanovení veškerého dusíku a fosforu

Stanovení veškerého dusíku dle Kjeldahla (stanovena bez redukce NO_2^- a NO_3^-) a stanovení veškerého fosforu byla prováděna dle příslušných postupů [91].

2.9 Příprava pokusů

Ve spolupráci byly prováděny dvě analogické série Testů č. 1 a č. 2 v prostředí půdních výluhů, lišících se testovanými modelovými látkami. Výsledky Testu č.1 jsou popsány v diplomové práci Ivy Kotasové [87]. Výsledky Testu č. 2 jsou uvedeny v této práci.

V práci byly provedeny následující testy:

- Testy s půdními extrakty
 - Test č.1 - Biologická rozložitelnost polymerů s půdními extrakty
 - Test č.2 - Biologická rozložitelnost polymerů s půdními extrakty
- Testy v půdě
 - Test č.3 - Respirace půd
 - Test č.4 - Biologická rozložitelnost v neředěných půdách
 - Test č.5 - Respirace ředěných půd inertním materiálem
 - Test č.6 - Biologická rozložitelnost v půdách ředěných perlitem
 - Test č.7 - Biologická rozložitelnost v půdách ředěných perlitem na přístroji MicoOxymax

V následující Tabulce 8. jsou obecně popsány všechny provedené Testy č.1-7.

Tabulka 8. Přehled provedených testů

Test č.	Mikrobiální inokulum	Prostředí	Ředění perlitem	Provedené analýzy				
				GC		TA	IR	PRM
				CO ₂	O ₂	CO ₂	CO ₂	O ₂
1	půdní extrakt	kapalné	x	A	x	x	x	x
2								
3	půda	pevné	x	A	A	A	x	x
4								
5			A	x	x	x	A	A
6								
7								

Pozn. A – bylo provedeno, x – nebylo provedeno, GC – plynová chromatografie, TA – titrační analýza, IR – infračervená analýza, PRM – paramagnetická rezonance.

2.9.1 Testy s půdními extrakty

Testy s půdními extrakty navazovaly na práci P. Malánka a sloužily jako praktická výuka provedení testů a analýz.

V tomto testu byla sledována produkce oxidu uhličitého pomocí plynové chromatografie. Biodegradace probíhala v láhvích o objemu 1000 ml a v každé z nich bylo 100 ml kultivačního roztoku. Plyná fáze měla objem 1040 ml. V testu byly použity vzorky směsných polymerních fólií na bázi PVAL: D97/234, D97/235, D97/236 a škrob. Polymery a slepé pokusy byly nasazeny do lahví dvakrát vedle sebe. Navážky testovaných fólií a škrobu byly dávkovány přímo do lahví tak, aby výsledná koncentrace byla cca 300 mg/l. Jako vodné prostředí bylo biomédium, ve kterém byly testované látky rozpuštěny. K inokulaci bylo použito inokulum (půdní extrakt) připravené podle popisu uvedeného v kapitole 2.8.

Účelem testu bylo provedení biodegradace reálných polymerů ve vodném prostředí a použití chromatografické koncovky jako jediného kritéria biorozkladu. Inokulum bylo dávkováno v množství odpovídající množství KTJ 10⁵ buněk v 1 ml roztoku [85].

Test č.2

Test byl prováděn na 10 pozicích. Vzorky v testu byly dávkovány ve formě navážky fólie nebo prášku (škrob), které byly rozpustěné v přidaném biomédium. Jako poslední bylo přidáno mikrobiální inokulum. Vodné prostředí tvořilo 100 ml kultivačního roztoku.

Plynná atmosféra měla objem 1040 ml. Počáteční pH vodní fáze v testovaných láhvích bylo v rozmezí 7,17 - 7,19. Poměr objemu kapalná ku objemu plynné fáze (V_l/V_g) = 0,10.

Tabulka 9. Rozložení pozic v testu č.2

pozice	vzorek [-]	substrát [mg]	biomédium [ml]	inokulum [ml]
1	slepý pokus	---	90	10
2	slepý pokus	---	90	10
3	D 97/234	34,15	90	10
4	D 97/234	29,36	90	10
5	D 97/235	29,33	90	10
6	D 97/235	33,39	90	10
7	D 97/236	28,19	90	10
8	D 97/236	33,45	90	10
9	Škrob	29,19	90	10
10	Škrob	29,29	90	10

2.9.2 Testy v půdě

Testy v půdním prostředí navazovaly na práci P. Malanika. Cílem této práce bylo naléz a vyhodnotit podmínky biodegradace v půdách a provést praktické měření.

V testech s půdním prostředí byla sledována produkce CO₂ pomocí plynové chromatografie, titrační analýzy, IR analýzy a aktuální koncentrace O₂ sledována pomocí plynovou chromatografií a paramagnetickou rezonancí.

Testech byly použity aparatury Obr. 5 a Obr. 6. Testované látky použité v láhvoém testu byly karboxymethyl celulóza a Xanthan. V testu na automatickém analyzátoru MicroOxymax byly použity modelové látky Xanthan, Avicel a PHB. Pro testy byly použity bioreaktory o objemu 500 a 1000 ml.

Půdní prostředí bylo tvořeno definovaným množstvím 2 typů komerčních půd a 1 typem přírodní půdy, o celkové sušině cca 50 %. Poměr substrátů a půdy byl následující: zahradní substrát : speciální hrobový substrát : přírodní půda (odběr Holešov) byl roven 2 : 1 : 1. Směs půd (dále jen půda) ve všech bioreaktorech byla obohacena o biogenní prvky a to tak, aby byl zachován doporučený poměr [92] C : N : P = 100 : 10 : 1. Jako zdroj dusíku byl použit síran amonný a jako zdroj fosforu byl použit dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného. Oba biogenní prvky byly dávkovány jako roztoky, rozpuštěny v malém množství destilované vody. Po dokonalém promíchání nutričních komponent s půdním prostředím a vzorkem, byly půdy umístěny do temperované místnosti při teplotě 25°C v temnu nebo popřípadě přístroje MicroOxymax v temperované lázni.

Test č.3

Záměr testu č.3 bylo sledování respirace půdního inokula. Současně byla sledována změna koncentrace O₂, podle které byla volena frekvence provzdušňování.

Test byl prováděn na 5 pozicích. V testu byla produkce CO₂ v testovaných lahvích sledována pomocí GC a metodou TA doporučenou v normě ISO 17556. Současně byla sledována aktuální koncentrace O₂ v lahvích během testu. Test byl nasazen v lahvích o objemu 1000 ml. Půdní prostředí bylo tvořeno 60 g půdy o sušíně 50 % a pH uvedené v tabulce 4. V navážce půd byla následně upravena hodnota dusíku a fosforu. Přídavky jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10. Rozložení pozic s přídavkem N a P v testu č.3

pozice	vzorek [-]	(NH ₄)SO ₄ [mg]	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O [mg]
1	slepý pokus	30,3	26,0
2	slepý pokus	30,5	25,7
3	slepý pokus	31,4	26,1
4	slepý pokus	31,8	26,0
5	slepý pokus	29,2	25,2

Test č.4

Záměrem testu byl obdobný jako v testu č.3 je s tím rozdílem, že v testu č.4 byly použity modelové látky.

Test byl prováděn na 4 pozicích, které byly použity z testu č.3. V testu byla produkce CO₂ a kontrola koncentrace O₂ v testovaných lahvích sledována stejně jako v testu č.3. Ke sledování byly použity vzorky KMC a Xanthanu. Vzorek KMC byl dávkován ve formě navážky prášku přímo do testovací láhve a Xanthan jako 1% roztok v dest. vodě. Plynná atmosféra měla objem 1021 ml. V případě přidané KMC byl poměr V/P = 0,67% a případě přidaného Xanthanu do lahví s KMC byl poměr V/P = 1,33 %. V půdě byla po dávkování vzorku následně upravena hodnota dusíku a fosforu vzhledem k substrátu.

K půdě z testu č.3 byla přidána KMC s navážkami uvedenými v tabulce 11., ale produkce CO₂ byla srovnatelná se slepými pokusy. Z tohoto důvodu byl přidán roztok Xanthanu o množství uvedené v tabulce 12.

Tabulka 11. Rozložení pozic s doplňujícími údaji v testu č.4

Pozice [-]	Typ půdy [-]	hmotnost v roztoku [mg]	TOC vzorku [%]
1	Směs půdy	---	---
2	Směs půdy	---	---
3	KMC	200	30,26
4	KMC	200	

Tabulka 12. Rozložení pozic s doplňujícími údaji v testu č.4

Pozice [-]	Typ půdy [-]	hmotnost v roztoku [mg]	TOC vzorku [%]
1	Směs půdy	---	---
2	Směs půdy	---	---
3	Xanthan	200	31,31
4	Xanthan	200	

Test č.5

Záměr testu č.5 bylo sledování respirace půdního inokula ředěného v daném poměru s perlitem. Současně byl sledována změna koncentrace O₂, podle které byla volena frekvence provzdušňování.

Test byl prováděn na 4 pozicích. V testu byla produkce CO₂ a kontrola koncentrace O₂ v testovaných lahvích sledována stejně jako v testu č.3. Test byl nasazen v lahvích o objemu 1000 ml. Použitá půda o sušině 50 % byla "naředěna" perlitem a byl upraven poměr dusíku a fosforu. Tabulce 13. je rozloženo rozdělení pozic.

Tabulka 13. Rozložení pozic v testu č.5

Pozice [-]	Ředění [-]	Navážka půdy [g]	Navážka perlitu [g]	(NH ₄)SO ₄ [mg]	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O [mg]
(5-1)	(1:1)	20	20	~30	~25
(5-2)	(1:1)	20	20		
(5-3)	(1:2,25)	13,4	33,3		
(5-4)	(1:2,25)	13,4	33,3		

Test č.6

Záměrem testu byl obdobný jako v testu č.5 jen stím rozdílem, že v testu č.6 byly použity modelové látky.

Test byl prováděn na 4 pozicích, které byly použity z testu č.5. V testu byla produkce CO₂ a kontrola koncentrace O₂ v testovaných lahvích sledována stejně jako v testu č.3. Ke sledování byly použity vzorky KMC a Xanthanu. Dávkování vzorek bylo stejné jako v testu č.4. V případě přidané KMC byl poměr V/P = 1% a případě přidaného Xanthanu do lahví s KMC byl poměr V/P = 3 %. V navážce půd byla následně upravena hodnota dusíku a fosforu vzhledem k substrátu.

K půdě z testu č.5 byla přidána KMC s navážkami uvedenými v tabulce 14., ale produkce CO₂ nebyla o mnoho větší jako produkce CO₂ u slepých pokusů. Z tohoto důvodu byl přidán roztok Xanthanu v množství uvedené v tabulce 15.

Tabulka 14. Rozložení pozic v testu č.6

Pozice [-]	Typ půdy [-]	hmotnost v roztoku [mg]	TOC vzorku [%]
(5-1)	ředění (1:1)	---	---
(5-2)	ředění (1:1) - KMC	201	30,26
(5-3)	ředění (1:2)	---	---
(5-4)	ředění (1:2) - KMC	200,5	30,26

Tabulka 15. Rozložení pozic v testu č.6

Pozice [-]	Typ půdy [-]	hmotnost v roztoku [mg]	TOC vzorku [%]
(5-1)	ředění (1:1)	---	---
(5-2)	ředění (1:1) - Xanthan	200	31,31
(5-3)	ředění (1:2)	---	---
(5-4)	ředění (1:2) - Xanthan	200	31,31

Test č.7

Na základě výsledků z předchozích testů 3-6 byly vytipovány podmínky pro biorozložitelnost látek v půdním prostředí za aerobních podmínek. Na jejich základě byl realizován test na automatickém analyzátoru MicroOxymax.

Záměrem testu bylo sledování a následné vyhodnocení biologické degradace půd ředěných perlitem v poměru 1:1. A ověřit zda-li má vliv použití promývacích nádob v měření

plynného CO₂, který byl promýván ze spod láhve a ne s vrchní části jako je tomu v případě infusních lahví.

Test byl prováděn na 23 pozicích. V testu byla produkce CO₂ v testovaných lahvích sledována pomocí IR analýzou. Současně byla sledována aktuální koncentrace O₂ v lahvích během testu pomocí PRM detektoru [93]. Test byl nasazen v lahvích o objemu 500ml (promývací nádoby) a 1000 ml (infusní láhve). Půdní prostředí v promývacích nádobách bylo tvořeno 15 g půdy o sušině 50 % smíchané s perlitem 1:1 a pro infusní láhve byla navážka půdy 30g a ředěna s perlitem v poměru 1:1. V navážce půd byla následně upravena hodnota dusíku a fosforu a sušiny pomocí dest. vody.

V testu byly použity následující modelové látky: Xanthan, mikrokrytalická celulóza (Avicel) a PHB. V Tabulce 16. jsou uvedeny pozice příslušných lahví s navážkami substrátu a přísávkem zdroje N a P, které byly rozpuštěny v malém množství dest. vody.

Na prvních dvou pozicích byly umístěny prázdné láhve z důvodu sledování stability kalibračních plynů v průběhu testu.

Po připojení testovacích lahví byl přístroj pomocí obslužného softwaru nastavený dle manuálu k přístroji a to tak, že měřicí interval byl každých 6 hodin a po každém měření nastala obnova plynné atmosféry tzv. refresh.

Tabulka 16. Rozložení pozic s doplňujícími údaji

No.	V _{láhve}	látka	substrát [mg]	půda [g]	perlit [g]	V/P	NH ₄ ⁺ [mg]	HPO ₄ ²⁻ [mg]	pH _{start} [-]	sušina _{start} [%]
1	1000	prázdna	---	---	---	---	---	---	---	---
2	1000	prázdna	---	---	---	---	---	---	---	---
3	promývací nádob (500ml)	slepý pokus	---	15	15	---	10	3	6,67	57,3
4		slepý pokus	---	15	15	---	10	3		
5		Xanthan	71,0	15	15	0,47	10	3		
6		Xanthan	69,6	15	15	0,47	10	3		
7		Xanthan	69,7	15	15	0,47	10	3		
8	1 000	slepý pokus	---	30	30	---	29	7	6,66	58,9
9	1 000	slepý pokus	---	30	30	---	29	7		
10	1 000	slepý pokus	---	30	30	---	29	7		
11	1 000	slepý pokus	---	30	30	---	29	7		
12	1 000	slepý pokus	---	30	30	---	29	7		
13	1 000	slepý pokus	---	30	30	---	29	7		
14	1 000	Xanthan	152,7	30	30	0,50	22	5		
15	1 000	Xanthan	152,0	30	30	0,50	22	5		
16	1 000	Xanthan	151,9	30	30	0,50	22	5		
17	1 000	Xanthan	150,9	30	30	0,50	22	5		
18	1 000	Xanthan	156,4	30	30	0,50	22	5		
19	1 000	Xanthan	155,3	30	30	0,50	22	5		
20	1 000	Avicel	156,7	30	30	0,50	25	6		
21	1 000	Avicel	151,0	30	30	0,50	25	6		
22	1 000	Avicel	158,0	30	30	0,50	25	6		
23	1 000	Avicel	150,3	30	30	0,50	25	6		
24	1 000	Avicel	153,2	30	30	0,50	25	6		
25	1 000	PHB	153,4	30	30	0,50	39	10		
26	1 000	PHB	153,6	30	30	0,50	39	10		
27	1 000	PHB	151,4	30	30	0,50	39	10		
28	1 000	PHB	149,1	30	30	0,50	39	10		
29	1 000	PHB	153,8	30	30	0,50	39	10		
30	1 000	PHB	152,5	30	30	0,50	39	10		

2.10 Zpracování výsledků

- **Teoretická produkce CO₂:**

$$Th_{CO_2} = \frac{\left(m_{subst.} \cdot \frac{TOC}{100} \right)}{Mr_C} \quad /1/$$

Th_{CO_2} teoretické množství CO₂ [mmol]

$m_{subst.}$ navážka substrátu obsahující organický uhlík [mg]

TOC veškerý organický uhlík ve vzorku substrátu [%]

Mr_C atomární hmotnost uhlíku [g.mol⁻¹]

- **Skutečné vyprodukované množství CO₂:**

Aktuální množství CO₂ stanovené GC analýzou pro testy ve vodním prostředí [94]:

$$n_{CO_2g+l} = \left[V_g + V_l \cdot K_{lg} \cdot \left(1 + 10^{-pK_1'} \cdot 10^{pH} \right) \right] \cdot c_{CO_2g} \quad /2/$$

V_g objem plynné fáze

V_l objem kapalné fáze

K_{lg} rozdělovací koeficient CO₂ v kyselém prostředí, tj. při pH < 4, při 25°C je roven 0,83 (tabulková hodnota)

pK_1 disociační konstanta H₂CO₃ do prvního stupně, je rovna 6,35 (tabulková hodnota)

c_{CO_2g} koncentrace CO₂ v plynné fázi zjištěná z GC analýzy

Aktuální množství CO₂ stanovené GC analýzou u půdních testů:

$$n_{CO_2} = \frac{V_l \cdot V_k \cdot 0,001}{V_o \cdot V_m^0} \quad /3/$$

n_{CO_2}	množství vyprodukovaného CO ₂ [mmol]
V_l	plynný objem láhve [ml]
V_k	vypočítaný objem CO ₂ z kalibrační přímky [μl]
V_o	objem odebraného plynného vzorku z láhve [ml]
V_m^0	standardní molární objem ideálního plynu [22,41.10 ⁻³ m ³ .mol ⁻¹]

Množství CO₂ stanovené titrační metodou:

$$n_{CO_2} = \frac{1}{2} \cdot V_{NaOH}^1 \cdot \left(c_{NaOH} - \frac{c_{HCl} \cdot V_{HCl}}{V_{NaOH}^2} \right) \quad /4/$$

n_{CO_2}	látkové množství absorbovaného CO ₂ [mol]
V_{NaOH}^1	objem NaOH v absorbéru [ml]
V_{NaOH}^2	objem NaOH odebíraný k titraci [ml]
V_{HCl}	spotřeba odměrného roztoku HCl při titraci [ml]
c_{NaOH}	koncentrace NaOH v absorbéru [mol.l ⁻¹]
c_{HCl}	koncentrace odměrného roztoku HCl [mol.l ⁻¹]

Množství CO₂ stanovené IR analýzou: /5/

Měření IR detektorem probíhalo automaticky na přístroji MicroOxymax dle nastavených podmínek v softwaru přístroje.

- **Procento odtranění substrátu podle produkce CO₂:**

$$DCO_2 = \frac{n_{subst.}}{Th_{CO_2}} \cdot 100$$

/6/

DCO_2 procento odtranění substrátu podle produkce CO₂ [%]

- **Objemové procento O₂ obsaženého v láhvi**

$$\%_{O_2} = \frac{\frac{V_l}{V_o} \cdot V_k \cdot 0,001}{V_l} \cdot 100$$

/7/

$\%_{O_2}$ objemové procento O₂ obsaženého v láhvi [%]

V_l plynný objem láhve [ml]

V_k vypočítaný objem O₂ z kalibrační přímky [μl]

V_o objem odebraného plynného vzorku z láhve [ml]

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem práce bylo na základě poznatků navrhnout modifikaci testu biorozložitelnosti, plastových směsí a jejich komponent, s využitím respirometru MicroOxymax a jeho verifikaci. Dále provést i alternativní testy biorozložitelnosti s analytickou koncovkou GC, zahrnující také analýzu spotřebovaného O₂, vedle produkovaného CO₂. A výsledky statisticky zpracovat pomocí vhodného softwaru.

Testy byly prováděny na modelových látkách, jejichž biorozložitelnost je známa. Výsledková část obsahuje pouze vybrané části tabulek a grafy. Kompletní data jsou k dispozici v elektronické podobě v knihovně ÚŽP.

V práci byly provedeny následující testy:

- Testy s půdními extrakty
 - Test č.1 - Biologická rozložitelnost polymerů s půdními extrakty
 - Test č.2 - Biologická rozložitelnost polymerů s půdními extrakty
- Testy v půdě
 - Test č.3 - Respirace půd
 - Test č.4 - Biologická rozložitelnost v neředěných půdách
 - Test č.5 - Respirace ředěných půd inertním materiálem
 - Test č.6 - Biologická rozložitelnost v půdách ředěných perlitem
 - Test č.7 - Biologická rozložitelnost v půdách ředěných perlitem na přístroji MicoOxymax

V následující Tabulce 8. jsou obecně popsány všechny provedené Testy č.1-7.

Tabulka 8. Přehled provedených testů v práci

Test č.	Mikrobiální inokulum	Prostředí	Ředění perlitem	Provedené analýzy				
				GC		TA	IR	PRM
				CO ₂	O ₂	CO ₂	CO ₂	O ₂
1	půdní extrakt	kapalné	x	A	x	x	x	x
2								
3	půda	pevné	x	A	A	A	x	x
4								
5			A					
6								
7	x	x	x	A	A			

Pozn. A – bylo provedeno, x – nebylo provedeno, GC – plynová chromatografie, TA – titrační analýza, IR – infračervená analýza, PRM – paramagnetická rezonance.

Test č.1

Bližší informace k tomuto testu s půdním výluhem jsou uvedeny v práci [87].

Test č.2

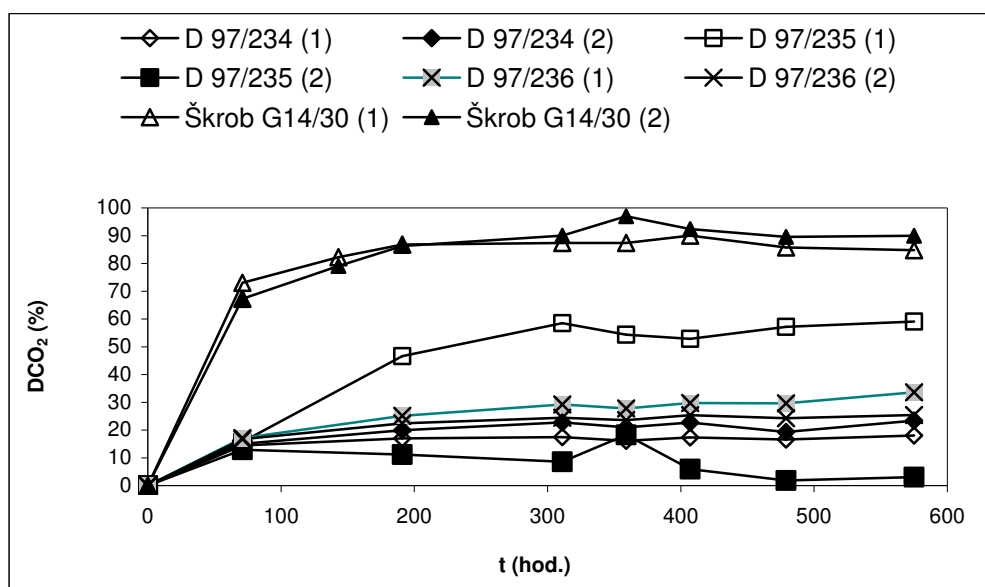
Biodegradace ve vodním prostředí byla hodnocena na základě měření produkce CO₂. Pro sledování biodegradace byla použita plynová chromatografie (GC). Jako hodnotící kritérium zde bylo množství vyprodukovaného CO₂ – rovnice /2/, procentuální vyjádření biodegradace (DCO₂) – rovnice /6/.

Produkce CO₂ GC-analýzou byly testovány směsné polymerní fólie a neupravovaný škrob, popsané v kapitole 2.2. Na Obrázku 8. je vyjádřeno procentuální odstranění substrátu z hlediska produkce CO₂ pomocí GC. Po 575 hodinách testu došlo k odstranění substrátů uvedených v Tabulce 17.

Tabulka 17. Odstranění substrátu DCO₂ v 575 hodině testu, doplňující údaje

pozice	vzorek	pH _{počáteční}	DCO ₂
	[-]	[-]	[%]
3	D 97/234	7,18	18,10
4	D 97/234		23,40
5	D 97/235	7,19	59,10
6	D 97/235		3,10
7	D 97/236	7,17	33,60
8	D 97/236		25,40
9	Škrob	7,18	84,80
10	Škrob		90,00

Výsledky souběžných testů byly srovnatelné s výjimkou testů na pozici 5 a 6 s fólií D97/235. Rozdíl mohl být způsoben výskytem bakterii, které rozkládaly matici fólie, ale jedná se jen o domnětku. Důvod poklesu DCO₂ u pozice 6 mohl být způsoben také netěsností láhve.



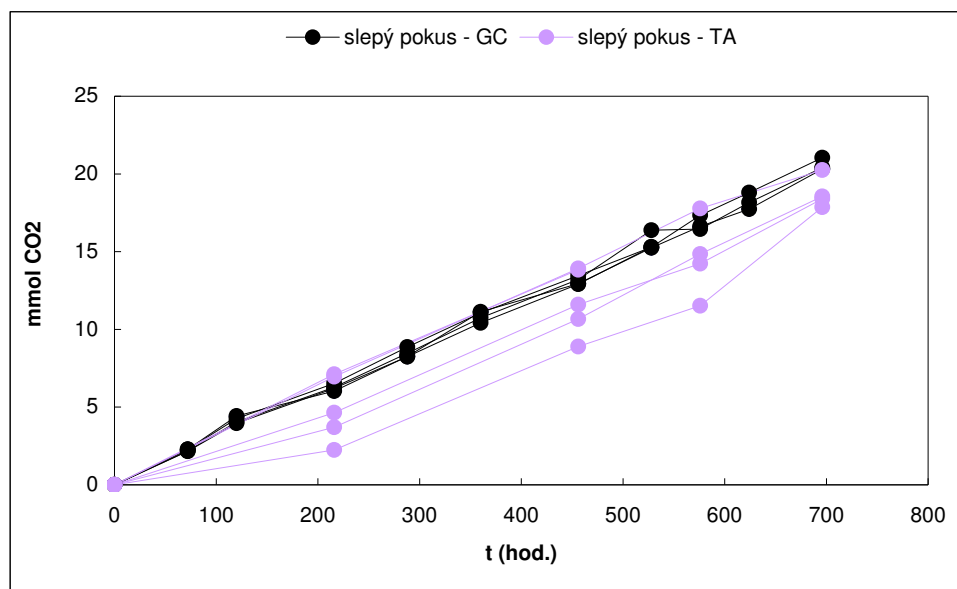
Obr. 8. Test č.2 – odstranění substrátu podle produkce CO₂ (GC-analýza)

Test č.3

Endogenní respirace půdního prostředí byla hodnocena na základě měření produkce CO₂. Pro sledování respirace byla použita plynová chromatografie (GC) a titrační analýza. Jako hodnotící kritérium zde bylo množství vyprodukovaného CO₂ – rovnice /3/, aktuální zastoupení O₂ – rovnice /7/ k sledování zda pokus probíhá v aerobních podmínkách.

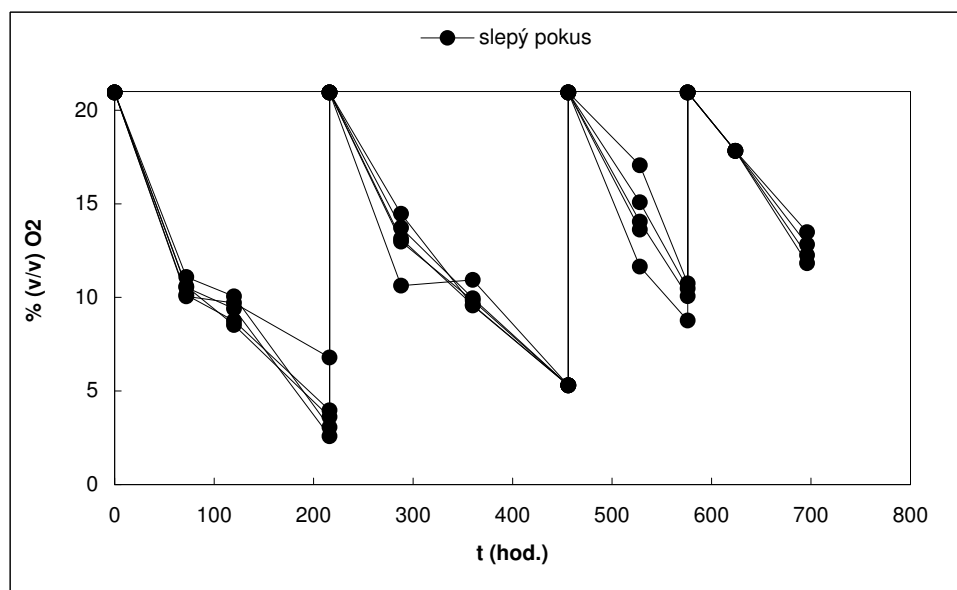
Produkce CO₂ nebo aktuální koncentrace O₂ GC-analýzou byla sledovaná endogenní respirace, z důvodu zjištění chování půdy bez přídavku substrátu.

Na Obrázku 9. je vyjádřena kumulativní produkce CO_2 pomocí GC-analýzy a titrační analýzy (TA). Po dobu 696 hodin. Z obrázku je patrné, že slepé pokusy (půdy bez přídavku substrátu) měly srovnatelné produkce CO_2 . To bylo výhodné pro další pokusy se substráty, ale spotřeba O_2 produkce byla tak velká, že se uvažovalo o ředění půdy inertem.



Obr. 9. Test č.3 – Kumulativní produkce CO_2 v půdách - GC a TA

Aby v pokusu byly kontrolovány aerobní podmínky, byl také vypočítávána aktuální $\% \text{O}_2$ v láhvích – rovnice /7/.



Obr. 10. Test č.3 – Aktuální koncentrace O_2 v půdách – GC

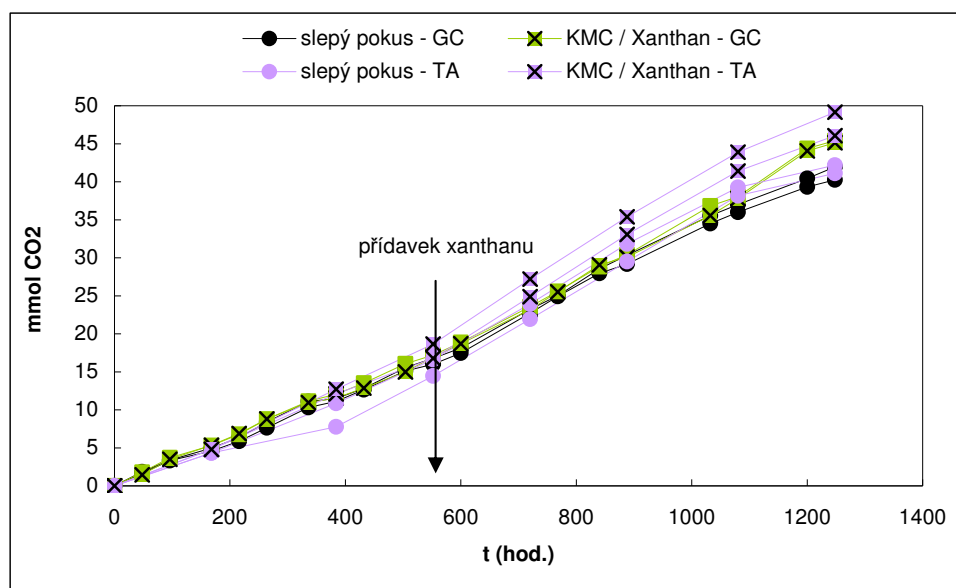
Pozn. náhlý vzestup koncentrace O_2 byl způsoben obnovou plynné atmosféry uvnitř láhví pomocí aparatury, Obrázek 5, za čerstvý vzduch zbavený atmosférického CO_2 .

Jak je vidět z Obrázku 10. koncentrace O_2 u půd byla nejniž u hodnoty 2,5%, norma ale přípouští hranici pro aerobní podmínky přibližně 6% O_2 . Bylo nutné hlídat hranici O_2 v lahvích, aby nedošlo k poklesu dané normou. Z toho vyplývalo, že bylo nutné provzdušňovat plynou atmosféru uvnitř lahví maximálně do 6 dnů, aby koncentrace O_2 nepřekročila hranici aerobních podmínek 6% O_2 .

Test č.4

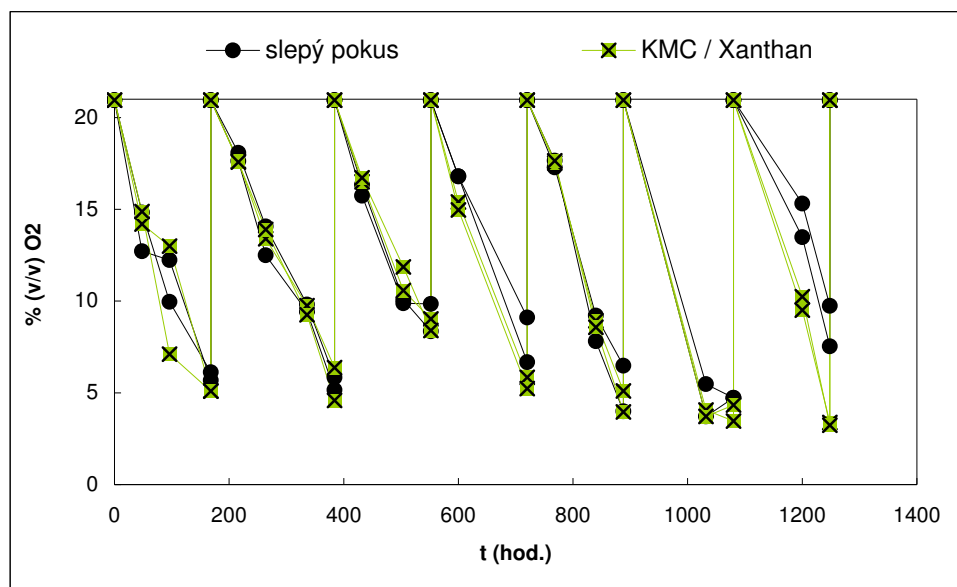
Test biologické degradace substrátu v prostředí půd byl hodnocen stejně jako Test č.3. V testu byla použita KMC jako modelová látka pro test aktivity půdního inokula. Ale pomocí této látky nebyly docíleny větší rozdíly produkce CO_2 oproti slepým pokusům. Z tohoto důvodu byl v čase 552 hodin přidán Xanthan.

Na Obrázku 11. je vyjádřena kumulativní produkce CO_2 stanovená pomocí GC-analýzy a titrační analýzy (TA) po dobu 1248 hodin, a přidavek xanthanu v 552 hodině.



Obr. 11. Test č.4 – Kumulativní produkce CO_2 v půdách - GC a TA

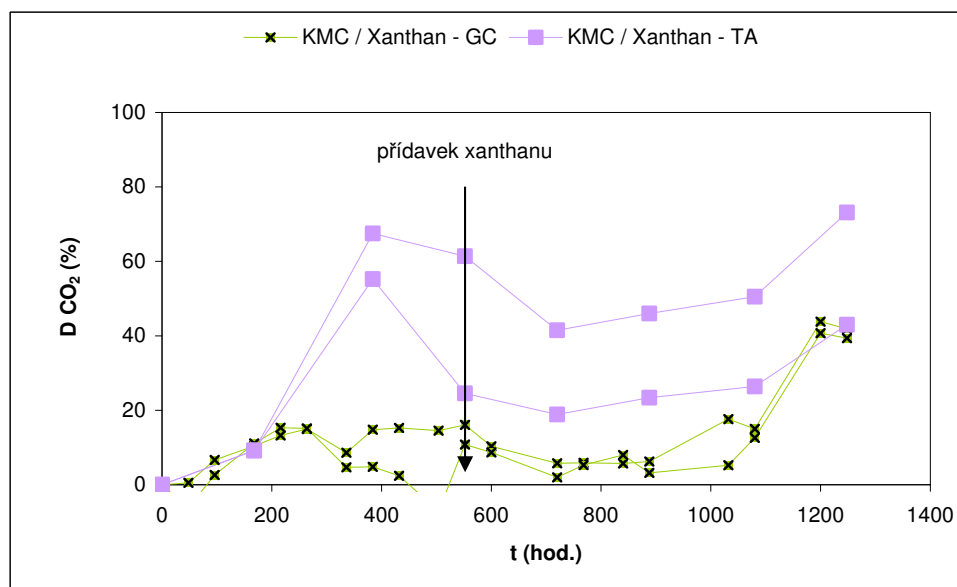
Aby v pokusu byly kontrolovány aerobní podmínky, byl také vypočítávána aktuální % O_2 v lahvích – rovnice /7/.



Obr. 12. Test č.4 – Aktuální koncentrace O_2 v půdách – GC

Jak je vidět z Obrázku 12. koncentrace O_2 u půd vlivem dlouhých intervalů provzdušňování klesala až na hodnotu 3,23%. Tento fakt byl důvodem proč bylo uvažováno s testy v prostředí půd „ředěných“ perlitem.

Jako hodnotící kritérium pro biodegradaci bylo procentuální vyjádření biodegradace (DCO_2) – rovnice /6/. Na Obrázku 13. je vyjádřeno odstranění substrátů dle kritéria DCO_2 .



Obr. 13. Test č.4 – Procento odstranění vzorku dle produkce CO_2 - DCO_2 v půdách

Nepravidelnost průběhů na obrázku 13. jsou způsobeny přidavkem dvou substrátů. Na počátku testu byla přidána KMC, která měla určitou lagovou fázi a poté byla rozkládaná

mikroorganismy. Výpočet DCO₂ byl vztahován pouze na ThCO₂ KMC. Ale v 552 hodině byl dávkován roztok Xanthanu a DCO₂ bylo počítáno na součet ThCO₂ KMC a Xanthanu. Xanthan měl také svou lagovou fází a proto nastal náhlý pokles DCO₂.

Hodnoty odstranění substrátu v prostředí neředěných půd podle kritéria DCO₂ (GC-analýzou a TA) jsou uvedeny v Tabulce 18. Naměřené rozdíly mezi DCO₂ stanovené GC a TA mohly být způsobeny tím, že po přidavku roztoku xanthanu se půda zhutnila a vznikla kompaktní hmota, která neposkytovala požadované vlastnosti půdy.

Tabulka 18. Odstranění substrátu podle DCO₂ v 1248 hodině testu pro neředěné půdy

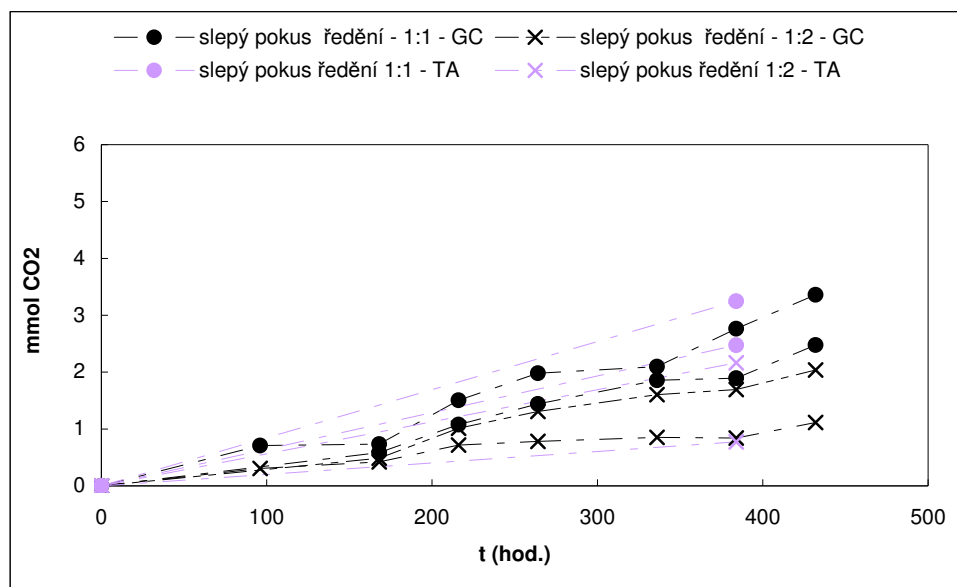
pozice	vzorek [-]	čas [hod.]	GC-analýza DCO ₂ [%]	TA-analýza DCO ₂ [%]
3	KMC/Xanthan	1248	41,9	43,0
4	KMC/Xanthan	1248	39,4	73,1

Test č.5

Endogenní respirace půdního prostředí ředěného perlitem byla hodnocena na stejném základě jako Test č.3.

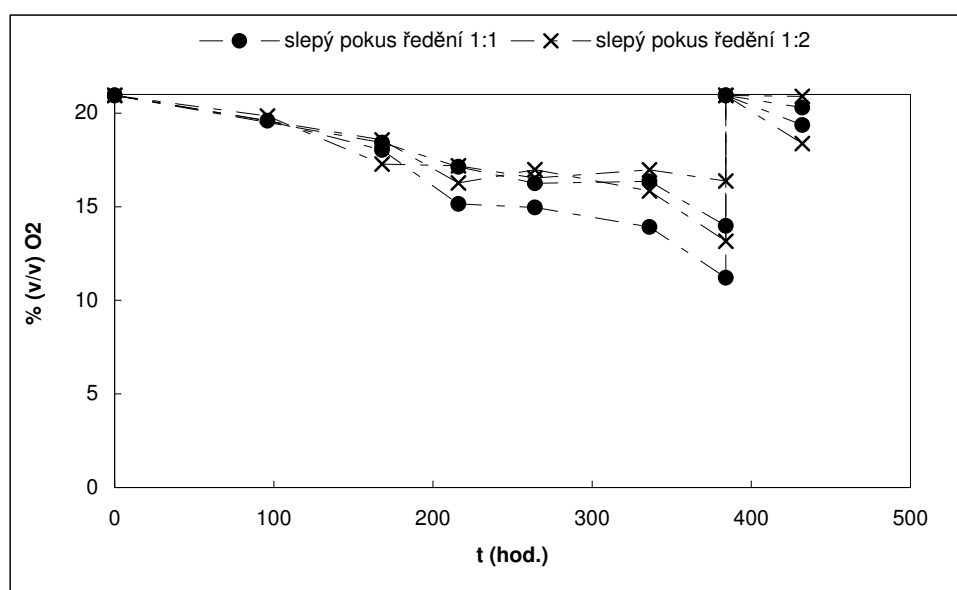
Produkce CO₂ nebo úbytek O₂ GC-analýzou byla sledovaná endogenní respirace, z důvodu zjištění chování půdy ředěné perlitem bez přidavku substrátu.

Na Obrázku 14. je vyjádřena kumulativní produkce CO₂ pomocí GC-analýzy a titrační analýzy (TA). Po dobu 432 hodin. Z obrázku je patrné, že půdy ředěné perlitem (bez přidavku substrátu) měly podobné průběhy bez výrazných výkyvů produkce CO₂ a také to, že se endogenní produkce CO₂ snížila 2x až 3x v závislosti na ředění.



Obr. 14. Test č.5 – Kumulativní produkce CO₂ v půdách ředěných perlitem - GC a TA

Aby v pokusu byly kontrolovány aerobní podmínky, byl také vypočítávána aktuální %O₂ v láhvích – rovnice /7/.



Obr. 15. Test č.5 – Aktuální koncentrace O₂ u půd ředěných perlitem – GC

Jak je vidět z Obrázku 15. koncentrace O₂ u půd ředěných perlitem neklesla pod 11% O₂, což splnilo požadavek normy pro udržení aerobních podmínek v testu.

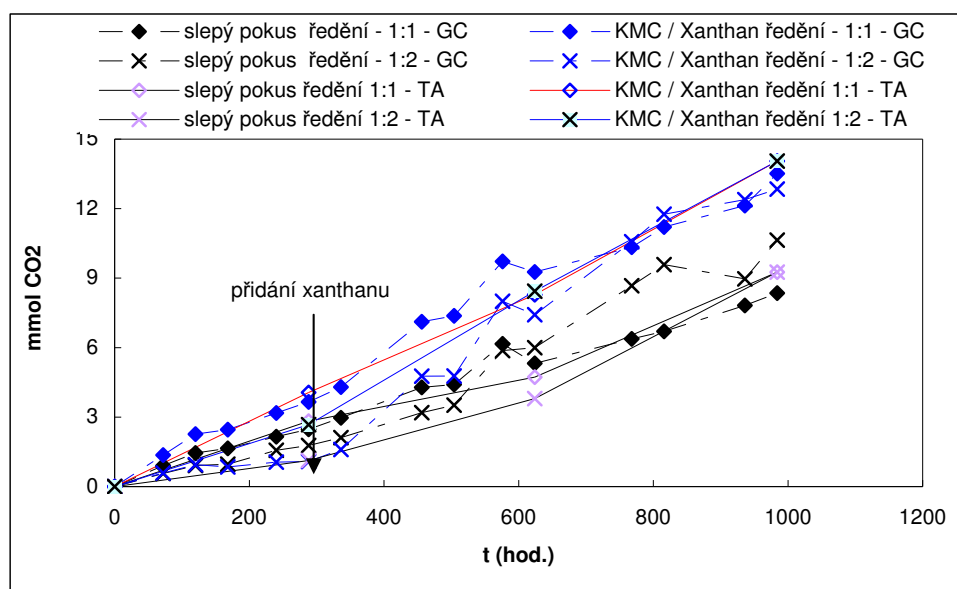
Z pokusu vyplývá závěr, že je výhodné používat ředění půd inertním materiálem, protože není nutné často obnovovat plynnou atmosféru uvnitř testovaných lahví. Atmosféru bylo možné neprovzdušňovat více jako 16 dnů, do té doby než dosáhne hranici 6%O₂.

Test č.6

Test biologické degradace substrátu v prostředí ředěných půd byl hodnocen stejně jako Test č.3.

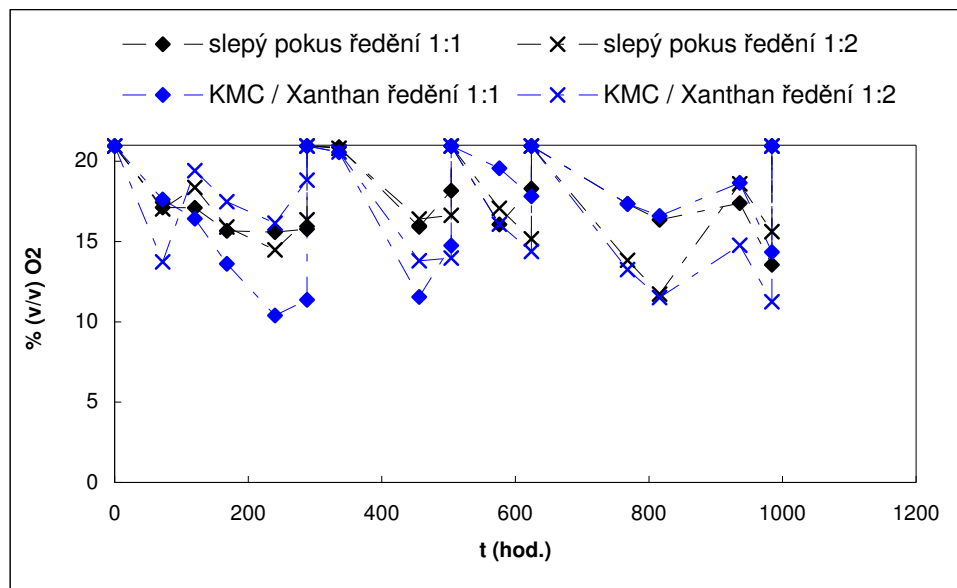
V testu byla použita KMC jako modelová látka pro test aktivity půdního inokula. Ale pomocí této látky nebyly docíleny větší rozdíly produkce CO₂ oproti slepým pokusům. Z tohoto důvodu byl v čase 288 hodin přidán Xanthan.

Na Obrázku 16. lze sledovat kumulativní produkci CO₂ pomocí GC-analýzy a titrační analýzy (TA) po dobu 984 hodin. Z obrázku je patrné, že se produkce CO₂ snížila vlivem ředění oproti neředěným půdám.



Obr. 16. Test č.6 – Kumulativní produkce CO₂ v ředěných půdách perlitem - GC a TA

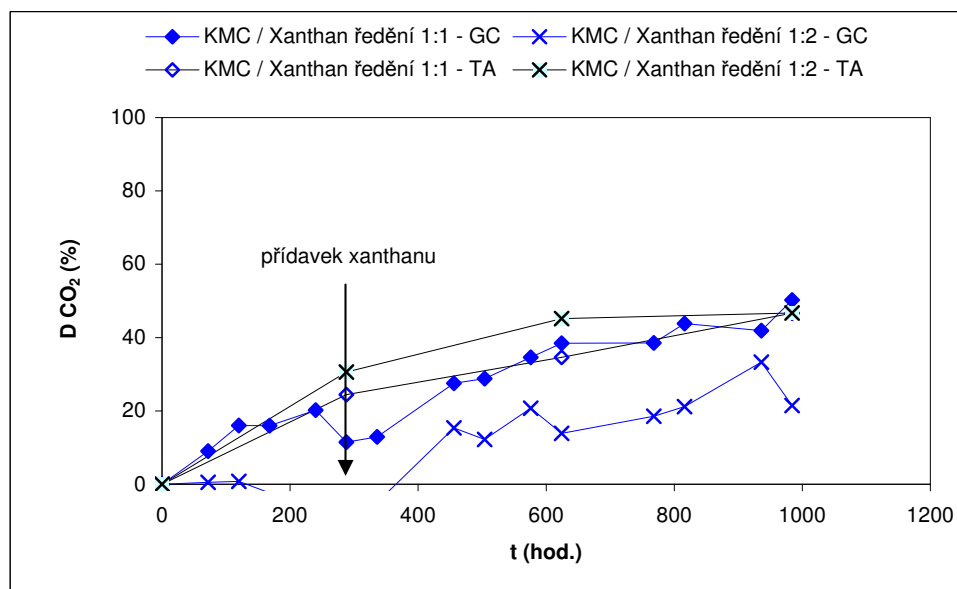
Aby v pokusu byly kontrolovány aerobní podmínky, byl také vypočítávána aktuální %O₂ v láhvích – rovnice /7/.



Obr. 17. Test č.6 – Aktuální koncentrace O_2 u půd ředěných perlitem – GC

Jak je vidět z Obrázku 17. koncentrace O_2 u půd byla udržována nejniž na hodnotu 10% při provzdušňovacích intervalech atmosféry 10 dnů.

Jako hodnotící kritérium pro biodegradaci bylo procentuální vyjádření biodegradace (DCO_2) – rovnice /6/. Na Obrázku 18. je vyjádřeno odstranění substrátů dle kritéria DCO_2 .



Obr. 18. Test č.6 – Procento odstranění vzorku dle produkce CO_2 - DCO_2 u půd ředěných perlitem

Hodnoty odstranění substrátu v prostředí ředěných půd podle kritéria DCO₂ (GC-analýzou a TA) jsou uvedeny v Tabulce 19. U tohoto pokusu je stejné vysvětlení chování křivek a výpočet konečného DCO₂ pro modelové látky jako v testu 4.

Tabulka 19. Odstranění substrátu podle DCO₂ v 984 hodině testu pro ředěné půdy

pozice	vzorek [-]	čas [hod.]	GC-analýza DCO ₂ [%]	TA-analýza DCO ₂ [%]
2	KMC/Xanthan	984	50,2	46,6
4	KMC/Xanthan	984	21,5	46,7

V závislosti na hodnotách a podmínkách, které byly získány v průběhu všech testů, byl založen test na přístroji Micro-Oxymax.

Hodnoty DCO₂ u ředěných půd perlitem nelze použít pro srovnání s DCO₂ na přístroji Micro-Oxymax, protože hodnoty byly částečně ovlivněny i rozkladem špatně rozložitelnou KMC, která zůstala v láhvi. Hodnoty DCO₂ byly nadhodnocené rozkladem KMC.

Test č.7

Z předcházejících testů byly vytipovány experimentální podmínky praktické realizace pro půdní testy, které byly použity na automatizovaném přístroji MicroOxymax.

Test biologické degradace modelových substrátů v prostředí půd ředěných perlitem v poměru 1:1 byl hodnocen na základě měření produkce CO₂ a úbytku O₂. Pro sledování byl použit automatický přístroj Micro-Oxymax popsán v kapitole 2.6.2.

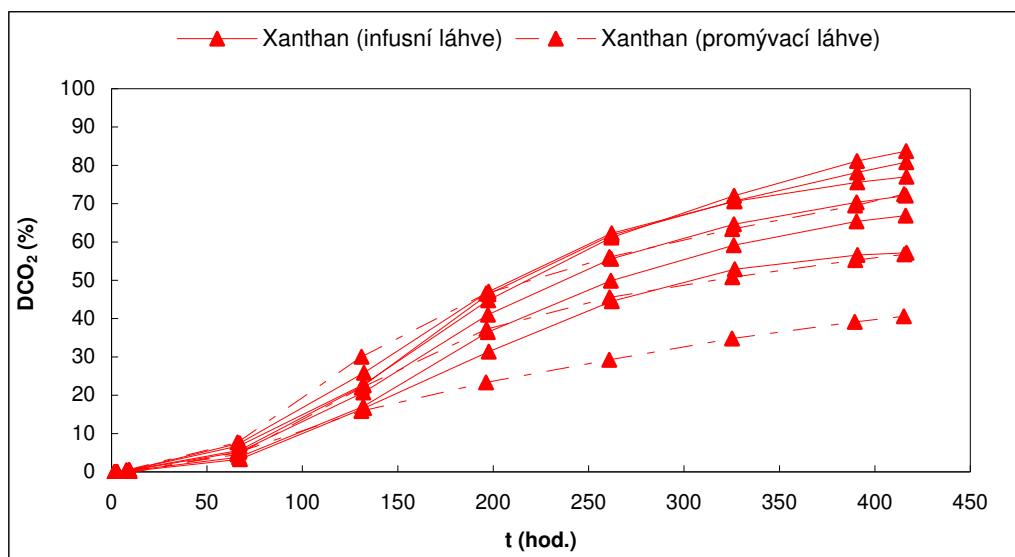
Jako hodnotící kritérium zde bylo množství vyprodukovaného CO₂, množství spotřebovaného O₂ a aktuální koncentrace O₂ k zjištění zda pokus probíhá v aerobních podmínkách. Naměřené hodnoty byly zpracovány softwarem k přístroji.

Pro test byly použity Avicel, Xanthan a PHB jako modelové látky pro test aktivity půdního inokula v ředěných půdách. Při dokončení této diplomové práce test stále probíhal a z tohoto důvodu byly odebrány průběžné výsledky biodegradace, a to ve 415 hodině testu.

V testu byly současně použity infusní láhve a promývací nádoby. Promývací nádoby byly použity z důvodu ověření vlivu konstrukce lahví mezi promývacími a infusními láhvemi v pokusech biodegradace. Výsledky lze pozorovat na Obrázku 19., kde jsou srovnávány DCO₂ pro Xanthan v obou typech nádob. Nízké hodnoty DCO₂ u jedné promývací nádoby

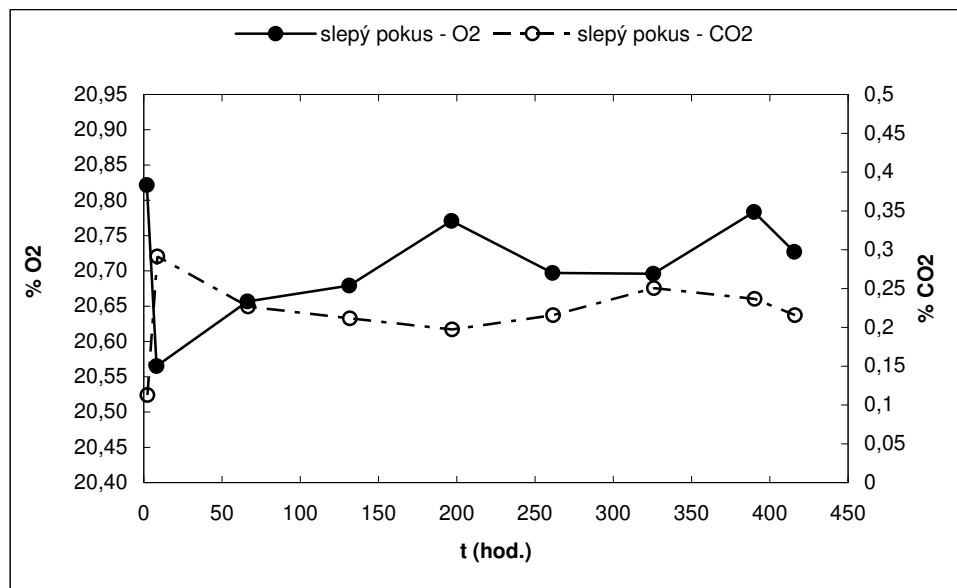
byly způsobeny netěsností. Z obrázku vyplývá, že hodnota DCO_2 se razantně nemění pokud byly použity promývací nebo infusní nádoby.

Ve všech ostatních obrázcích v Testu č.7 jsou uvedeny průměrné hodnoty ze všech měření pro jednotlivé vzorky a slepé pokusy.



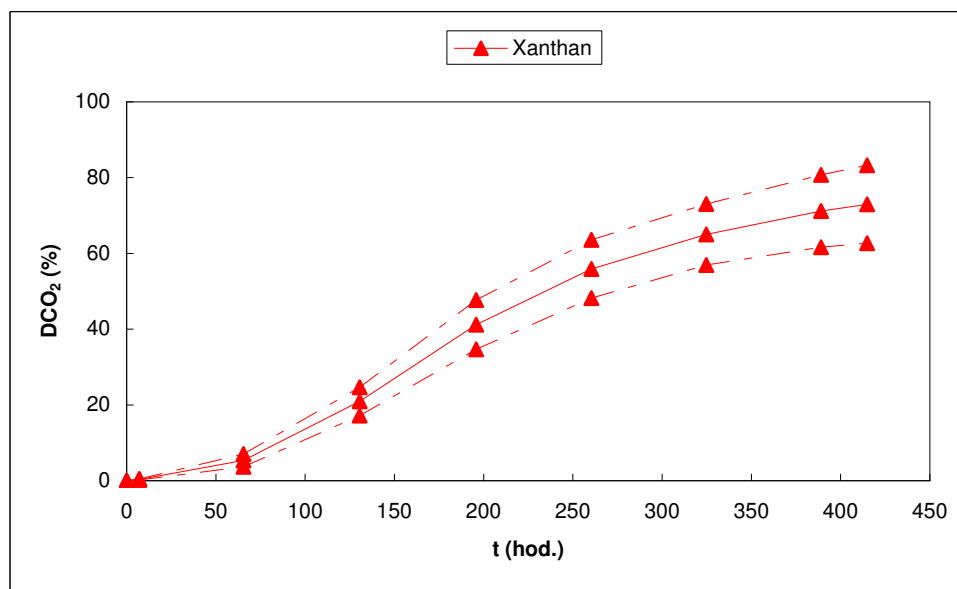
Obr. 19. Test č.7 – Procento odstranění vzorku dle produkce CO_2 - DCO_2 v promývacích nádobách a infusních lahvích - IR-analýza

V probíhajícím pokusu byly udržovány aerobní podmínky po celou dobu testu, což dokazuje Obrázek 20., kde je uvedena koncentrace O_2 a CO_2 v průběhu testu pro slepé pokusy. Obrázek 20. je uveden jako příklad, ve všech ostatních láhvích byly podobné průběhy. V testovací lahvích se udržovala koncentrace O_2 nad 20% z důvodu rozmezí detekce PMR-detektoru, která byla 19,8-21obj.% O_2 .

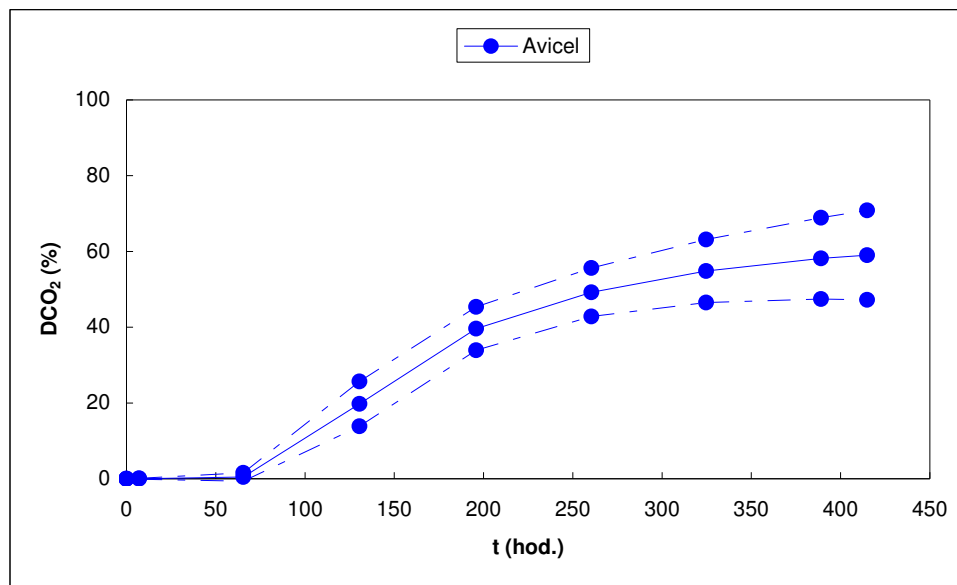


Obr. 20. Test č.7 – Aktuální koncentrace O₂ a CO₂ v infusních lahvích

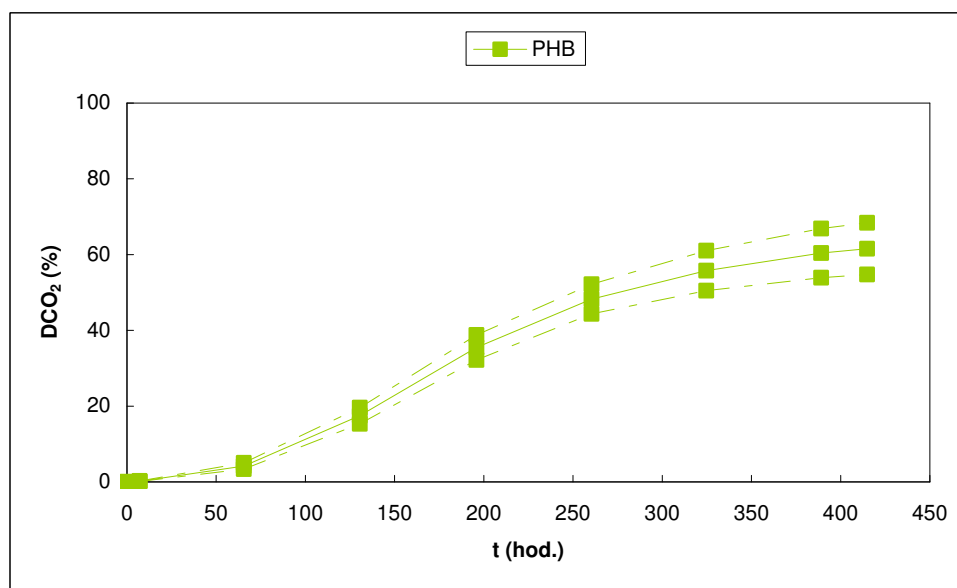
Jako hodnotící kritérium pro biodegradaci bylo procentuální vyjádření biodegradace DCO₂ Obrázky 21.-23. a DO₂ Obrázek 24. Na Obrázcích 21-23. je také zobrazený 95%-ní interval spolehlivosti pro dané modelové látky.



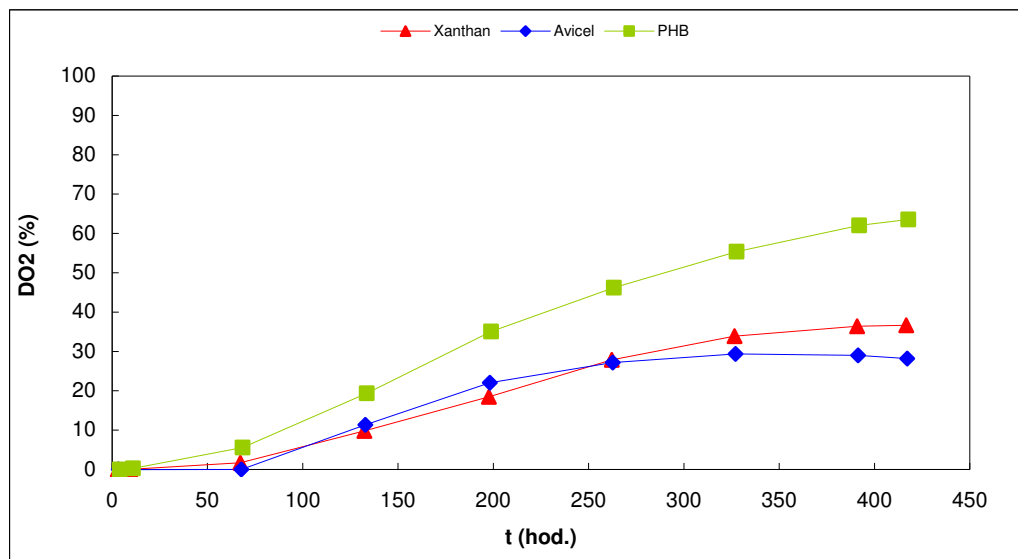
Obr. 21. Test č.7 – Procento odstranění vzorku dle produkce CO₂ - DCO₂ s 95% intervalem spolehlivosti pro xanthan



Obr. 22. Test č.7 – Procento odstranění vzorku dle produkce CO_2 - DCO_2 s 95% intervalem spolehlivosti pro Avicel



Obr. 23. Test č.7 – Procento odstranění vzorku dle produkce CO_2 - DCO_2 s 95% intervalem spolehlivosti pro PHB



Obr. 24. Test č.7 – Procento odstranění vzorku dle úbytku O_2 - DO_2 v infusních lahvích

Hodnoty odstranění substrátu v prostředí ředěných půd perlitem v poměru 1:1 podle kritéria DCO₂ (IR-analýzou) a DO₂ (PMR) jsou uvedeny v Tabulce 20 v čase 415 hodin trvání pokusu.

Tabulka 20. Odstranění substrátu podle DCO₂ a DO₂ v 415 hodině testu pro ředěné půdy

No.	láhev	vzorek	čas [hod.]	DCO ₂ [%]	DO ₂ [%]
5	promýv. nádo ba (500 ml)	Xanthan	415	40,6	23,8
6		Xanthan		72,5	62,0
7		Xanthan		56,8	49,4
14	1 000	Xanthan		66,9	44,2
15	1 000	Xanthan		72,1	48,2
16	1 000	Xanthan		83,7	57,5
17	1 000	Xanthan		80,8	54,9
18	1 000	Xanthan		77,0	52,5
19	1 000	Xanthan		57,2	36,7
20	1 000	Avicel		68,8	46,7
21	1 000	Avicel		66,8	45,8
22	1 000	Avicel		50,8	32,0
23	1 000	Avicel		61,3	39,2
24	1 000	Avicel		47,5	28,2
25	1 000	PHB		62,1	54,4
26	1 000	PHB		60,8	53,0
27	1 000	PHB		58,5	51,8
28	1 000	PHB		63,5	55,8
29	1 000	PHB		52,4	46,4
30	1 000	PHB		71,2	63,6

Výsledky u Testu č.9 nejsou konečné. Ale podle průběhů křivek u Obrázků 18-21 lze říci, že ředění a podmínky v době testu jsou vyhovující a lze s nimi do budoucna počítat.

4 ZÁVĚR

Diplomová práce navazuje na dosavadní činnosti ústavu a je zaměřena na sledování biorozložitelnosti polymerů v půdním prostředí za aerobních podmínek.

Cílem práce bylo na základě poznatků z láhвовých půdních testů navrhnout modifikaci testu biorozložitelnosti, plastových směsí a jejich komponent, s využitím respirometru Micro Oximax a jeho verifikaci. Ke sledování biorozložitelnosti v láhвовých testech bylo použito titrační analýzy a analytické koncovky GC, zahrnující také analýzu aktuální koncentrace O₂, vedle produkovaného CO₂.

Půdní láhвовé testy byly realizovány ve dvou alternativách, se stejnými počátečními podmínkami testů (vlhkost, pH, dávkování vzorků), ale lišících se použitým substrátem. Použité substráty byly půdy a půdy „ředěné“ perlitem.

Ze zjištěných výsledků popsaných v kapitole 3 vyplývá, že sledování biorozložitelnosti polymerů v půdním prostředí je nevyhovující pro vysokou spotřebu O₂ půdními mikroorganismy během testu. Z důvodu vysoké spotřeby O₂ bylo v testech použito „ředění“ inertními materiály (perlitu), ke snížení této spotřeby. V láhвовých půdních testech se osvědčilo ředění perlitem v poměru 1:1 (sušina půdy:inertnímu materiálu), protože tato směs byla sypká, vzdušná a měla dostatečně krátkou lagovou fázi. Další výhodou byl dostatečný rozdíl v produkci CO₂ mezi testovanou látkou a slepým pokusem a dostatečné aerobní podmínky oproti neřazeným půdám.

Pomocí půdních láhвовých testů byly nalezeny vhodné podmínky pro sledování biodegradace v prostředí půd ředěných inertem. Podmínky jsou následující:

- ředění půdy inertním materiálem (perlitem) 1:1 (vždy sušina půdy k inertnímu materiálu)
- aktuální sušina 50%
- $\text{pH}_{\text{prostředí}} = 6,5-7,00$
- $\text{teplota}_{\text{prostředí}} = 25^{\circ}\text{C}$
- uložení lahví v temném prostředí
- provzdušňování plynné fáze v lahvích lze u slepých pokusů provádět v intervalu až 16 dnů a u pokusů se vzorky až 10 dnů. Po tuto dobu neklesne koncentrace O₂ pod hranici 10%O₂

Za uvedených podmínek byl realizován test č.9 na automatickém analyzátoru MicroOxymax. Vyjímka v použitých podmínkách testu byla v intervalu provzdušňování, který byl na přístroji MicroOxymax nastaven po 6 hodinách, z důvodů omezení rozmezí detektoru pro stanovení CO₂ a O₂. Pokus pokračoval i po dokončení této práce. Ale podle průběžných výsledků lze říci, že ředění a podmínky v době testu jsou vyhovující a lze s nimi do budoucna počítat.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Claus J Weber: Biobased Packaging Materials for the Food Industry. Denmark: The Royal Veterinary and Agricultural University, 2000. ISBN 87-90504-07-0
- [2] R. Chandra, Renu Rustgi: Biodegradable Polymers. Delhi: Delhi College of Engineering, 1998. S0079–6700(97)00039–7
- [3] Watanabe Y, Morita M, Hamada N, Tsujisaka Y. Formation of hydrogen peroxide by a polyvinyl alcohol degrading enzyme. *Agric Biol Chem* 1975;39:2447–8.
- [4] Sakai K, Hamada N, Watanabe Y. Studies on the poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme. Part VI. Degradation mechanism of poly(vinyl alcohol) by successive reactions of secondary alcohol oxidase and b-diketone hydrolase from *Pseudomonas* sp. *Agric Biol Chem* 1986;50:989–96.
- [5] Watanabe Y, Hamada N, Morita M, Tsujisaka Y. Purification and properties of a polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by a strain of *Pseudomonas*. *Arch Biochem Biophys* 1976;174:575–81.
- [6] Suzuki T. Degradation of poly(vinyl alcohol) by microorganisms. *J Appl Polym Sci, Appl Polym Symp* 1979;35: 431–7.
- [7] Matsumura S, Tomizawa N, Toki A, Nishikawa K, Toshima K. Novel poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme and the degradation mechanism. *Macromolecules* 1999;32:7753–61.
- [8] Emo Chiellini*, Andrea Corti, Salvatore D'Antone, Roberto Solaro: Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. Italy: University of Pisa, 2002.
- [9] Roman Honzík : Plasty se zkrácenou životností a způsoby jejich degradace [online]. [cit. 2004-08-18]. Dostupný z WWW: <<http://biom.cz/index.shtml?x=194542/>>.
- [10] Emo Chiellini, Helena Gil, Gerhart Braunegg, Johanna Buchert, Paul Gatenholm, Maarten Van Der Zee: Biorelated Polymers: Sustainable Polymer Science and Technology. Springer, 2001. ISBN: 030646652X
- [11] Huang, S. J., Bitritto, M., Leong, K. W., Paulisko, J., Roby, M. and Knox, J. R., *Adv. Chem. Ser.*, 1978, 169, 205.

- [12] Fields, R. D., Rodriguez, F. and Finn, R. K., J. Appl. Polym. Sci., 1974, 18, 3571.
- [13] Benedict, C. V., Cook, C. V., Jarrett, P., Cameron, J. A., Huang, S. J. and Bell, P., J. Appl. Polym.Sci., 1983, 28, 327.
- [14] Benedict, C. V., Cameron, J. A. and Huang, S. J., J. Appl. Polym. Sci., 1983, 28, 335.
- [15] Cook, W. J., Cameron, J. A., Bell, J. P. and Huang, S. J., J. Polym. Sci., Polym. Lett., 1981, 19,159.
- [16] Zeikov, G. E. and Livshitz, U. S., Polym. Degrad. Stab., 1987, 17, 65.
- [17] Walker, J. D., Austin, J. F. and Colwell, R. R., J. Gen. Appl. Microbiol., 1975, 21, 27.
- [18] Dwyer, D. F. and Tiegje, J. M., Appl. Environ. Microbiol., 1986, 52, 852.
- [19] Swisher, R. D., Surfactant Biodegradation. Marcel Dekker, 1987, p. 415.
- [20] Proc. of Society of the Plastics Industry Symp. on Degradable Plastics, Washington, DC, June 1987.
- [21] Leahy, J. H., and R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews 54 (3):305-315.
- [22] Gibb, A., A. Chu, R. C. K. Wong, and R. H. Goodman. 2001. Bioremediation kinetics of crude oil at 5 °C. Journal of Environmental Engineering 127 (9):818-824.
- [23] Admon, S., M. Green, and Y. Avnimelech. 2001. Biodegradation kinetics of hydrocarbon in soil during land treatment of oily sludge. Bioremediation Journal 5 (3):193-209, 2001.
- [24] Prince, R. C., J. R. Clark, and K. Lee. 2002. Bioremediation effectiveness: Removing hydrocarbons while minimizing environmental impact. 9th International Petroleum Environmental Conference, IPEC (Integrated Petroleum Environmental Consortium), Albuquerque, NM.
- [25] Margesin, A., A. Zimmerbauer, and F. Schinner. 1999. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. Chemosphere 40: 339-346.

- [26] Trinidad, P., L. G. Sobral, A. C. Rizzo, S. G. F. Leite, J. L. S. Lemos, V. S. Milloili, and A.U. Soriano. 2002. Evaluation of the biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbon contaminated soils. 9th International Petroleum Environmental Conference, IPEC (Integrated Petroleum Environmental Consortium), Albuquerque, NM.
- [27] Dragun, J. 1998. The Soil Chemistry of Hazardous Materials. 2nd Edition. Amherst Scientific Publishers, Amherst, MA.
- [28] Orchard, V.A., and F.J. Cook. 1983. Relationship between soil respiration and soil moisture. *Soil Biol. Biochem.* 15:447-453.
- [29] Leiros, M.C., C. Trasar-Cepeda, S. Seoane, and F. Gil-Sotres. 1999. Dependence of mineralization of soil organic matter on temperature and moisture. *Soil Biol. Biochem.* 31:327-335.
- [30] Namkoong, W. E. Hwang, J. Park, and J. Choi. 2002. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution* 119:23-31.
- [31] Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiological Reviews* 45 (1): 180-209.
- [32] Lešinský D.: Environmentálně degradovatelné plasty v odpadovém hospodářství, pp 17, Banská Štiavnica květen 2003
- [33] Emo Chiellini, Andrea Corti and collective: Adsorption Desorption of Polyvinyl Alcohol on Solid Substrates and Relevant Biodegradation. *Journal of Polymers and the Environment*, Vol. 8, No. 2, 2000
- [34] Suzuki T, Ichihara Y, Yamada M, Tonomura K. Some characteristics of *Pseudomonas* O-3 which utilizes polyvinyl alcohol. *Agric Biol Chem* 1973;37:747-56.
- [35] Fukanage, F., Sumina, S., Neda, K., Takemasa, T. and Tachibana, K., *Jpn. kokai*, 1977, 7,794,471.
- [36] Chiellini E., Corti A., Solaro R.: Biodegradation of poly(vinylalcohol) based blown films under different environmental conditions, *Polymer degradation and stability*, Volume 75, Issue 3, 2002, Pages 447-458

- [37] Mejia AI, Lopez BL, Hess M.: Biocorversion of poly(vinyl alcohol) to vanillin in a *Phanerochaete chrasosporium* culture medium, *Material research innovation*, 7, 2003, Pages 144 – 148.
- [38] Alexy P. a kol. (1999): Modified plyvinylalcohol with collagen hydrolyisate specified for blow extruded films, pp. 76 - 79, In *Selected papers IW on Environmentally Degradable Plastics - Smolenice Oct. 1999*.
- [39] Lešinský D., P. Alexy, D. Bakoš, K. Kolomazník, S. Javorekova (2000): Research and production of biodegradable polymers in Slovakia, pp 96-100, In *The Food Biopack Conference papers, Copenhagen, Denmark - Aug. 2000*
- [40] Beczner J., Vásárhelyi-Perédi K., Fehér J. and Keszler B.(2000): Biodegradable packaging materials based upon starch/PVAL, pp117-118, In *The Food Biopack Conference papers, Copenhagen, Denmark August 2000*
- [41] Haili Liu , Chengdong Huang: Biodegradation of xanthan by newly isolated *Cellulomonas* sp. LX, releasing elicitor-active xantho-oligosaccharides-induced phytoalexin synthesis in soybean cotyledons. China, 2005.
- [42] H. J. Ruijssenaars, J. A. de Bont, S. Hartmans: A pyruvated mannose-specific xanthan lyase involved in xanthan degradation by *Paenibacillus alginolyticus* XL-1. Wageningen Universit, Nederland.
- [43] Y. Yughuchi, M. Mimura, S. Kitamura, H. Urakawa and K. Kajiwara, *Food Hydrocolloids* 7 (5), 373 (1993).
- [44] K. Te Nijenhuis in: *Advances in Polymer Science: Thermoreversible Networks*, A. Abe et al. (Eds), p. 219. Springer, Berlin (1997).
- [45] Wiseman D.: *Handbook of Biodegradable Polymers*. Taylor & Francis, 1998, pages 275-278. ISBN 9057021536
- [46] Jin Hyuck, Lee Nam-Kyu and collective: Production of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* NK2000 with soybean pomace. *Biochemical Engineering Journal* v 16 n 3 December 2003. p 357-360 , 2003.
- [47] N. Barbani, C. Cristallini, M. G. Cascone, L. Lazzeri and G. Pizzirani, *Biomateriali*, in press.

- [48] M. G. Cascone, N. Barbani and collective: Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. Department of Chemical Engineering, University of Pisa. 2000.
- [49] Unpublished data.
- [50] P. J. Hocking, R. H. Marchessault: Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers, 1.ed, Ed. G. J. L. Griffin, Chapman&Hall, Glasgow 1994, p. 48.
- [51] M. Lemoigne: Produits de deshydratation et de polymerisation de 1-acide β -oxybutiric. Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 1926, 8: 770.
- [52] L. Savenkova, E. Zagreba, Z. Gercberga: The official gazette of the patent office of the Republic of Latvia. 1993, 2, 94.
- [53] L. Savenkova, Z. Gercberga, Z. Kizhlo, E. M. Stegantseva: Process Biochem. 1993, 34, 109.
- [54] Y. Lee, E. M. Stegantseva, L. Savenkova, Y. H. Park: J. Microbiol. Biotechnol. 1995, 5, 2, 100.
- [55] La Cara F., Immirzi B., Ionata E., Mazzela A., Portofino S., Orsello G., De Prisco P.P.: Biodegradation of Poly-e-caprolactone/poly-b-hydroxybutyrate blend, Polymer Degradation and Stability, Volume 79, Issue 1, 2002, pages 37-43
- [56] I. Bibers, V. Tupureine a collective: Biodegradable materials from Plasticized PHB Biomass. 2001, Macromol. Symp. 170, 61-71
- [57] Otey, F. H., Westhoff, R. P. and Russell, C. R., Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 1977, 16, 305.
- [58] Shulman, J. and Howarth, J. T., US Patent No. 3,137,664, 16 June 1964.
- [59] Griffin, G. J. L., Am. Chem. Soc. Div. Org. Coat, Chem. Soc. Div. Org. Coat. Chem, 1973, 33 (2), 88.
- [60] Griffin, G. J. L. and Turner, R. D., International Biodeterioration Conference, Berlin, 1978.).
- [61] Griffin, G. J. L., Advances in Chemistry Series, 134, Fillers and Reinforcements for Plastics.

- [62] Otey, F. H., Mark, A. M., Mehlretter, C. L. and Russel, C. R., *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 1974, 13, 90.
- [63] Polysacharidy [online]. [cit. 2005-12-18]. Dostupný z WWW: <<http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-sach-poly.html>>.
- [64] Otey, F. H., Westhoff, R. P. and Mehletter, C. L., *Staerke*, 1972, 24, 267.
- [65] Boggs, W., US Patent No. 2,908,657, 13 October 1959.
- [66] Dosmann, P. and Steel, R. N., US Patent No. 3,004,934, 17 October 1961.
- [67] SEAL, K.J.; PANTKE, M. (1986): *Material Organismen* 21(2), 151-156.
- [68] GOLUEKE, C.G. (1991): *The art and science of composting*, JG Press, Emmaus, PA, pp. 14-39.
- [69] E. Chiellini, P. Cinelli and coll.: Biodegradable Hybrid Polymer Films Based on PVAL and Collagen Hydrolyzate. *Macromol. Symp.* 2003, 197, 125-132.
- [70] P. Cinelli, E. Chiellini and coll.: Characteristic and Degradation of Hybrid Composite Films Prepared from PVA, Starch and Ligninocellulosics. *Macromol. Symp.* 2003, 197, 143-155.
- [71] R.M.D. Soares, A.M.F. Lima, V. Soldi and coll.: Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from different sources. *Polymer Degradation and Stability* 90, 2005. p. 449-454
- [72] P. G. Dalev, R. D. Patil and coll.: Biodegradation of Chemically Modified Gelatin Films in Soil. Department of Biology, University of Sofia, 1999. Bulgaria
- [73] J. L. Osmon, R. E. Klausmeier: In *Biodeterioration Investigation Techniques*. Walters, A.H., Ed., Applied Science: London, 1977, p 77.
- [74] G. S. Kumar, V. Kalpagam, U. S. Nandi: *J Appl Polym Sci* 1985, 30, 915.
- [75] Y. Otake, T. Kobayashi and coll.: *J Appl Polym Sci.* 1995, 56, 1789.)
- [76] Tsuchii, K. Takeda, T. Suzuki, Y. Tokiwa: *Biodegradation.* 1969, 7, 41.)
- [77] Z. Filip: *Biodegradable Polymers and Plastics*. Eds., RSC, Thomas Graham House: Cambridge, 1992, p 45.

- [78] E. Chiellini, A. Corti: A Simple Method Suitable to Test the Ultimate Biodegradability of Environmentally Degradable polymers. *Macromol. Symp.* 2003, 197, 381-395
- [79] U. Strotmann, P. Reuschenbach, H. Schwarz and U. Pagga: Development and Evaluation of an Online CO₂ Evolution Test and a Multicomponent Biodegradation Test System. Department of Environmental Engineering, Germany 2004.
- [80] Ch. Scheutz, P. Kjeldsen: Biodegradation of Trace Gases in Simulated Landfill Soil Cover Systems. *Journal of the Air & Waste Management Association*. Pittsburgh 2005. Vol.55, Iss. 7; pg. 878, 8 pgs
- [81] Bunkim G. Chokshi: Microbial Biodegradation of Hydrocarbons in Petroleum Sludge Waste. California Polytechnic State University, San Luis, 2003.
- [82] A. A. Smedley: Respirometric testing of petroleum-contaminated soil from the Guadalupe oil field to asses biodegradation potentials. Senior Project. Cal Poly SLO, 1997.
- [83] Sedlář J.: Analýza plyných produktů při biodegradaci plastů, Diplomová práce, UTB Zlín, 2003.
- [84] Dvořáková M.: Sledování biologických rozkladných procesů směsných polymerů v půdním prostředí. Diplomová práce, UTB Zlín, 2004. p.25-26.
- [85] Malaník P.: Rozklad plastů v půdním prostředí. Diplomová práce, UTB Zlín, 2005.
- [86] ČSN EN 29408: Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí: metoda stanovení spotřeby O₂ v respirometru (ISO 9408-1991)
- [87] I. Kotasová: Biodegradace směsných polymerů při termofilních podmínkách. Diplomová práce, UTB Zlín, 2006.
- [88] ISO 17556, Plastics – Determination of the ultimate aerobic biodegradability in soil by measuring the oxygen demand a respirometr or the amount of carbon dioxide evolved, 2003.

- [89] Instruction manual Total organic carbon analyser, model TOC – 5000A, Shimadzu corporation Japan, 1996.
- [90] Sedláček M. a kol.: Metody rozborů kalů a pevných odpadů, Státní zemědělské nakladatelství, Praha 1978.
- [91] Horáková M., Lischke P., Grunwald A.: Chemické a fyzikální metody analýzy vod. Praha, 1986.
- [92] Růžička J.: Mikrobiologie pro technology životního prostředí, 1999, strany 114-116
- [93] Manuál k MicroOxymaxu, Columbus Instruments International Corporaiton, USA
- [94] Dřímál P. Hrnčířík J, Hoffmann J.: Assessing aerobic biodegradability of plastic in aqueous environment by GC-analyzing composition of equilibrium gaseous phase. Journal of Polymers the environment, Volume 14, in press, 2006.

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

PVAL	Polyvinylalkohol
PHB	Polyhydroxybutyrát
KMC	Karboxymethyl celulóza
ISO	International standard organization
ČSN	Česká státní norma
GC	Plynová chromatografie
TA	Titrační analýza
IR	Infračervená analýza
PRM	Paramagnetická rezonance
TOC	Úplný organický uhlík
MicroOxymax	Mikrorespirometr MicroOxymax (Columbus Ins. Internat. Corp., USA)
TCD	Tepelně vodivostní detektor
Th_{CO_2}	teoretické množství CO_2 [mmol]
TOC	veškerý organický uhlík ve vzorku substrátu [%]
DCO_2	procento odtranění substrátu podle produkce CO_2 [%]

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1. Stupně degradace polymeru od počátku přes mineralizaci až ke vzniku biomasy
- Obr. 2. Alternativa respirometrické láhve s využitím buriál testu
- Obr. 3. Reaktor dle ISO/DIS 17556
- Obr. 4. Upravený měřicí systém pro degradaci v půdách
- Obr. 5. Schéma aparatury sloužící k provzdušňování testovaných lahví
- Obr. 6. Schéma mikrorespirometru MicroOxymax (Columbus Ins. International Corp., USA)
- Obr. 7. Kalibrační přímka standardního plynu s CO₂
- Obr. 8. Test č.2 – odstranění substrátu podle produkce CO₂ (GC-analýza)
- Obr. 9. Test č.3 – Kumulativní produkce CO₂ v půdách - GC a TA
- Obr. 10. Test č.3 – Aktuální koncentrace O₂ v půdách – GC
- Obr. 11. Test č.4 – Kumulativní produkce CO₂ v půdách - GC a TA
- Obr. 12. Test č.4 – Aktuální koncentrace O₂ v půdách – GC
- Obr. 13. Test č.4 – Procento odstranění vzorku dle produkce CO₂ - DCO₂ v půdách
- Obr. 14. Test č.5 – Kumulativní produkce CO₂ v půdách ředěných perlitem - GC a TA
- Obr. 15. Test č.5 – Aktuální koncentrace O₂ u půd ředěných perlitem – GC
- Obr. 16. Test č.6 – Kumulativní produkce CO₂ v ředěných půdách perlitem - GC a TA
- Obr. 17. Test č.6 – Aktuální koncentrace O₂ u půd ředěných perlitem – GC
- Obr. 18. Test č.6 – Procento odstranění vzorku dle produkce CO₂ - DCO₂ u půd ředěných perlitem
- Obr. 19. Test č.7 – Procento odstranění vzorku dle produkce CO₂ - DCO₂ v promývacích nádobách a infusních lahvích - IR-analýza
- Obr. 20. Test č.7 – Aktuální koncentrace O₂ a CO₂ v infusních lahvích

- Obr. 21. Test č.7 – Procento odstranění vzorku dle produkce CO_2 - DCO_2 s 95% intervalem spolehlivosti pro xanthan
- Obr. 22. Test č.7 – Procento odstranění vzorku dle produkce CO_2 - DCO_2 s 95% intervalem spolehlivosti pro Avicel
- Obr. 23. Test č.7 – Procento odstranění vzorku dle produkce CO_2 - DCO_2 s 95% intervalem spolehlivosti pro PHB
- Obr. 24. Test č.7 – Procento odstranění vzorku dle úbytku O_2 - DO_2 v infusních lahvích

SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1. Nastavitelné proměnné v respiračním experimentu
- Tabulka 2. Složení směsných polymerních fólií na bázi PVAL
- Tabulka 3. Parametry půdních substrátů fy. Agro CS a.s. a přírodní půdy
- Tabulka 4. Parametry směsi půd v daném poměru
- Tabulka 5. Parametry Agroperlitu udávané výrobcem
- Tabulka 6. Nastavení přístroje CHROM 5 na měření CO₂
- Tabulka 7. Nastavení GC přístroje na měření O₂
- Tabulka 8. Přehled provedených testů
- Tabulka 9. Rozložení pozic v testu č.2
- Tabulka 10. Rozložení pozic s přidavkem N a P v testu č.3
- Tabulka 11. Rozložení pozic s doplňujícími údaji v testu č.4
- Tabulka 12. Rozložení pozic s doplňujícími údaji v testu č.4
- Tabulka 13. Rozložení pozic v testu č.5
- Tabulka 14. Rozložení pozic v testu č.6
- Tabulka 15. Rozložení pozic v testu č.6
- Tabulka 16. Rozložení pozic s doplňujícími údaji
- Tabulka 17. Odstranění substrátu DCO₂ v 575 hodině testu, doplňující údaje
- Tabulka 18. Odstranění substrátu podle DCO₂ v 1248 hodině testu pro neředěné půdy
- Tabulka 19. Odstranění substrátu podle DCO₂ v 984 hodině testu pro ředěné půdy
- Tabulka 20. Odstranění substrátu podle DCO₂ a DO₂ v 415 hodině testu pro ředěné půdy