

Biodegradace nových syntetických materiálů

Bc. Vladimír Piš

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vladimír PIŠ**
Osobní číslo: **T080319**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Biodegradace nových syntetických polymerních materiálů**

Zásady pro vypracování:

- 1. Provést biodegradační experiment v prostředí kompostu se vzorky podrobenými kontrolované degradaci.**
- 2. Zahájit a provést biodegradační experiment v prostředí kompostu.**
- 3. V závislosti na časových možnostech uskutečnit další experimenty se vzorky.**
- 4. Provést literární rešerši a zpracovat výsledky experimentů do formy DP.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Odborné publikace v databázových zdrojích na internetu.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

14. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

13. května 2011

Ve Zlíně dne 14. února 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
ředitel ústavu



PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 20.5.2011

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Byla sledována biodegradabilita série vzorků aromaticko-alifatického kopolyesteru Ecoflex a serie vzorků PLA polyesteru, které byly podrobeny procesu urychleného stárnutí v zařízení SEPAP 12/24 vybaveného výkonnými lampami simulujícími účinek slunečního záření. V tomto zařízení byly fóliové vzorky ecoflexu vystaveny záření po dobu 0, 10, 25 a 100 hodin, a fóliové vzorky PLA polyesteru po dobu 0, 10, a 50 hodin. Během ozařování došlo u vzorků ecoflex především k síťovacím reakcím a u vzorků PLA ke štěpným reakcím. Předpokladem bylo, že tyto změny v ozářených polymerech by mohli ovlivnit následnou biodegradabilitu v prostředí kompostu. Biodegradační experimenty provedené s fotodegradovanými vzorky ecoflex a PLA ukázaly, že doba ozařování nemá vliv na následnou rychlost biodegradace v prostředí kompostu. Pravděpodobným vysvětlením je to, že při stárnutí nedocházelo k významné změně počtů dostupných hydrolyzovatelných vazeb v polymeru.

V rámci práce se provedl i biodegradační pokus se vzorky PBAT, Ecoflex, nízkomolekulárním PLA a vysokomolekulárním PLA v práškové formě za účelem sledování změn mikrobiálního oživení v kompostu. Byly sledovány termofilní bakterie rostoucí na TYA agaru, aktinomycéty, vláknité plísňe a mikroorganismy schopné rozkládat daný polyester. Bylo zjištěno, že v průběhu tohoto biodegradačního pokusu došlo k výraznějšímu nárůstu pouze u skupin mikroorganismů schopných rozkládat zkoumané polyestery

Klíčová slova:

aromaticko-alifatický kopolyester, Ecoflex, PLA, biodegradace, kompost

ABSTRACT

The series of samples made from aromatic-aliphatic co-polyester Ecoflex, was subjected to accelerated aging procedure in SEPAP 12/24 unit equipped with high power lamps simulating the effects of sunlight and subsequently biodegradation of the irradiated samples were studied. Film's samples of ecoflex were exposed to irradiation for 0, 10, 25 and 100 hours and film's samples of PLA polyester for 0, 10, and 50 hours in the apparatus. Primarily, Crosslinking in the samples of ecoflex and chain scission in the samples of PLA occurred during irradiation. It was supposed that changes in the irradiated polymers might affect subsequent biodegradability in compost. The biodegradation experiments conducted with photodegradable samples of ecoflex and PLA showed that duration of irradiation did not have effect on a subsequent speed of the biodegradation in compost. The most probable explanation was that the number of available hydrolysable ester bonds did not change significantly during the aging.

Even the biodegradation experiment with the samples of PBAT, Ecoflex, low-molecular PLA and high-molecular PLA in state of powder was made in order to observe changes in microbial resuscitation in compost within this study. Thermophilic germs growing in TYA agar, actinomyces, mildew and micro-organisms which are able to lyse given polyester were studied. It was discovered, in the course of the biodegradation experiment, more obvious increase occurred only in micro-organisms which are capable of lysing observed polyester.

Keywords:

aromatic-aliphatic copolyester, Ecoflex, PLA, biodegradation, compost

Rád bych poděkoval vedoucímu diplomové práce Doc. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování diplomové práce. Také děkuji celému kolektivu ÚIOŽP za vytvoření výborných pracovních podmínek.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu při studiu a v osobním životě.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY	13
1.1 AROMATICKO-ALIFATICKÉ KOPOLYMERY	14
1.2 PLA (POLY(LACTIC)ACID)	15
1.3 APLIKACE BIODEGRADABILNÍCH POLYMERŮ	16
1.3.1 Biodegradabilní mulčovací fólie	17
2 KOMPOSTOVÁNÍ	19
2.1 PODMÍNKY KOMPOSTOVÁNÍ	19
2.2 FÁZE KOMPOSTOVÁNÍ DLE TEPLoty A MIKROBIÁLNÍHO OŽIVENÍ	21
3 POŽADAVKY A SMĚRNICE PRO SLEDOVÁNÍ BIODEGRADACE V LABORATORNÍM ROZSAHU	23
3.1 STANOVENÍ ÚPLNÉ AEROBNÍ BIODEGRADABILITY POLYMERNÍCH MATERIÁLŮ ZA ŘÍZENÝCH PODMÍNEK KOMPOSTOVÁNÍ DLE ISO 14855-1	25
3.1.1 Požadavky na kompost.....	25
3.1.2 Požadavky na vzorky a zkoušenou směs	26
3.1.3 Požadavky na respirometrický systém.....	27
3.2 STANOVENÍ ÚPLNÉ AEROBNÍ BIODEGRADABILITY POLYMERNÍCH MATERIÁLŮ ZA ŘÍZENÝCH PODMÍNEK KOMPOSTOVÁNÍ DLE ISO 14855-2	29
3.2.1 Požadavky na kompost, vzorek a zkoušenou směs	29
3.2.2 Popis a princip laboratorního přístroje MODA.....	29
3.3 STANOVENÍ ÚPLNÉ AEROBNÍ BIODEGRADABILITY POLYMERNÍCH MATERIÁLŮ ZA ŘÍZENÝCH PODMÍNEK KOMPOSTOVÁNÍ DLE ASTM D 5338	32
4 STUDIUM BIODEGRADABILNÍCH POLYMERŮ NA RŮZNÝCH PRACOVÍŠTÍCH	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	36
5 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	37
6 MATERIÁLY, ROZTOKY, VYBAVENÍ	38
6.1 ROZTOKY	38
6.2 TUHÉ ŽIVNÉ PŮDY	41
6.3 ZKOUŠENÉ POLYMERNÍ MATERIÁLY	42
6.3.1 Příprava fóliových vzorků podrobených urychlenému stárnutí v zařízení SEPAP 12/24	42
6.3.2 Příprava vzorků deponovaných na perlit po úpravě chloroformem	43
6.3.3 Příprava roztoků polymerních submikročásteček.....	43
6.3.4 Příprava vzorků ve formě prášku	44
6.4 OSTATNÍ MATERIÁLY POUŽITÉ V BIODEGRADAČNÍCH EXPERIMENTECH	44
6.5 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	45
7 METODIKA	46
7.1 CHARAKTERISTIKA SUBSTRÁTU	46
7.1.1 Stanovení sušiny kompostu.....	46
7.1.2 Spalitelný podíl kompostu.....	47

7.1.3	Stanovení pH kompostu	47
7.1.4	Mikrobiální rozbor kompostu	47
7.2	SLEDOVÁNÍ AEROBNÍ DEGRADACE POLYMERŮ V PROSTŘEDÍ KOMPOSTU POMOCÍ RESPIROMETRICKÉHO SYSTÉMU	50
7.2.1	Biometrická láhev	50
7.2.2	Příprava biometrických láhví k biodegradačním pokusům.....	50
7.2.3	Přívod vzduchu.....	51
7.2.4	Hodnocení aerobní biodegradace pomocí plynové chromatografie.....	51
7.2.5	Biodegradační experiment	52
7.2.6	Zpracování naměřených dat	53
7.3	ISOLACE A IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ SCHOPNÝCH ROZKLÁDAT ZKOUMANÝ POLYMER	55
7.3.1	Isolace mikroorganismů	55
7.3.2	Identifikace mikroorganismů	56
III	VÝSLEDKY A DISKUZE	57
8	CHARAKTERISTIKA NEADAPTOVANÉHO KOMPOSTU.....	58
9	SLEDOVÁNÍ VLIVU FOTODEGRADOVANÉHO VZORKU NA BIODEGRADABILITU	60
9.1	VLIV FOTODEGRADACE NA BIODEGRADACI MATERIÁLU ECOFLEX.....	60
9.2	VLIV FOTODEGRADACE NA BIODEGRADACI MATERIÁLU PLA	63
9.3	SUMARIZACE VÝSLEDKU	66
10	POROVNÁNÍ BIODEGRADABILITY VYBRANÝCH POLYESTERŮ SE ZAMĚŘENÍM NA SLEDOVÁNÍ MIKROBIOLOGIE PROCESU.....	68
10.1	SLEDOVÁNÍ BIODEGRADACE V KOMPOSTU	68
10.2	POČTY VÝZNAMNÝCH SKUPIN MIKROORGANISMŮ V PRŮBĚHU BIODEGRADACE	69
10.3	IZOLACE A IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ ROZKLÁDAJÍCÍCH PŘÍSLUŠNÝ POLYESTER	74
	ZÁVĚR	76
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	78
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	81
	SEZNAM OBRÁZKŮ	82
	SEZNAM TABULEK.....	83
	SEZNAM PŘÍLOH.....	84

ÚVOD

V současné době jsou lidé jedním z nejvíce rozšířených živočišných druhů žijících na zemi. Velké množství lidí pak zákonitě produkuje značné množství odpadů, které zamožuje životní prostředí. Přírodní odpady relativně nepředstavují až takový problém, jelikož jsou dobře odbouratelné v přirozeném prostředí. Vážnější problém však představují syntetické materiály, které se už poněkud liší svou strukturou a v prostředí pak mohou zůstat desítky až stovky let. Hojně využívaným syntetickým materiálem v posledních desetiletích je plast a z něj vyrobené plastové výrobky. Nejlepší cestou, jak s použitými plasty nakládat, je samozřejmě recyklace. Často je však plastový výrobek po jednom použití natolik znehodnocen, že jeho recyklace je takřka nemožná, především z technických a finančních důvodů, a musí se tak uložit na řízenou skladku, kde přetrvává spousty let.

Je proto vhodné vyrábět strukturně takové plasty, které se v prostředí rozloží působením organismů v dostatečně krátké době a nezanechají žádná škodlivá rezidua. Takovéto plasty se pak označují jako biodegradabilní.

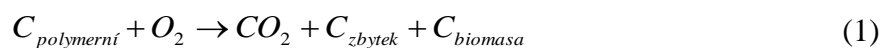
V současné době je na trhu řada komerčně vyráběných biodegradabilních polymerů, mezi něž patří i PBAT, Ecoflex a PLA, které budou předmětem našeho zájmu. Hlavním cílem práce bude zpracování literární části, především se zaměřením na standardní podmínky, které musí být při sledování biodegradace v prostředí kompostu dodrženy. Z hlediska praktické části pak bude stěžejním úkolem sledování degradace v prostředí kompostu se vzorky, které byly v zařízení SEPAP 12/24 podrobeny urychlenému stárnutí.

I. TEORETICKÁ ČÁST

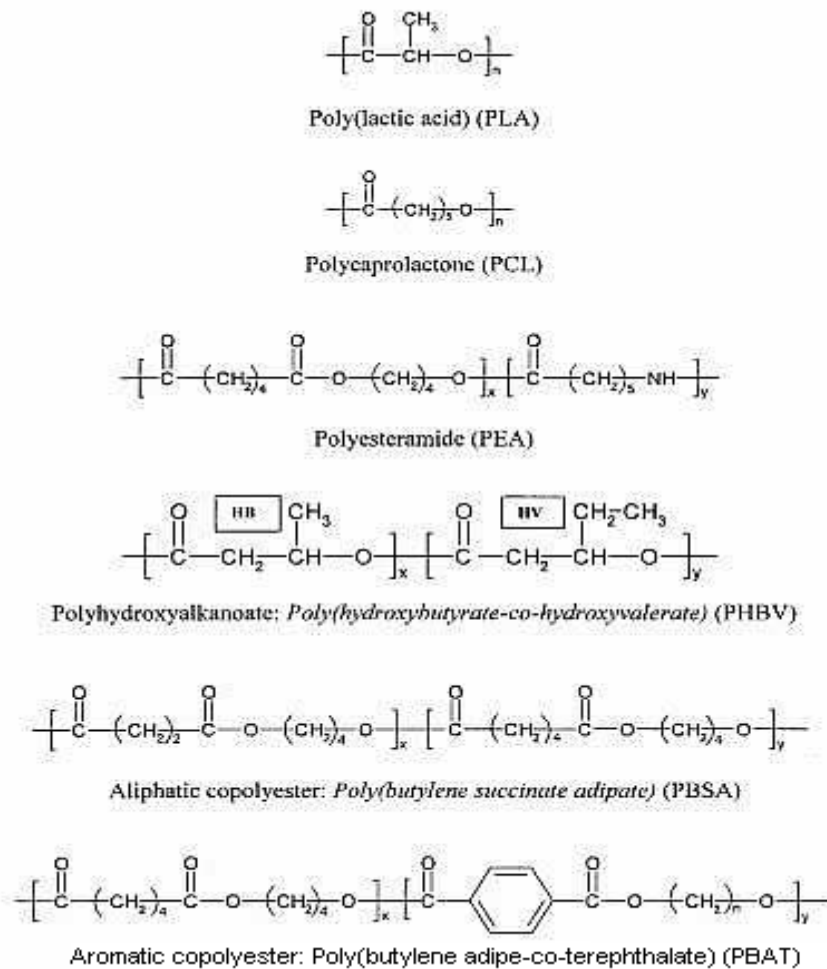
1 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY

Polymery (makromolekuly) jsou látky složené z velkého počtu atomů vázaných chemickými vazbami do dlouhých řetězců (obvyklá $M_w > 1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Tyto řetězce tvoří pravidelně se opakující části, které se nazývají monomerní jednotky. Polymery je možno dělit z několika hledisek, např. podle původu je dělíme na přírodní polymery (biopolymery) a syntetické polymery [1,2]. Syntetické polymery našly široké uplatnění v řadě aplikací a odvětvích, především kvůli svým přednostem. Mezi tyto přednosti patří lehká váha, snadná zpracovatelnost, odolnost vůči chemikáliím, atmosférickým změnám a mikrobiálnímu společenstvu atd. Problém však nastává, když se z těchto polymerů stane odpad, který již nelze jinak využít a musí se uložit na skládku. Často však tyto odpady končí i ve volné přírodě, kde způsobují řadu problémů (např. v mořském ekosystému mají tyto plastové odpady drastické až devastační účinky na vodní společenstvo, které si je často splete s potravou a po pozření se jimi zadusí) [3]. Tento problém je umocněn tím, že většina syntetických materiálů je vyráběna tak, aby maximálně odolala vnějším vlivům životního prostředí, a proto pak v prostředí přetrvává desítky až stovky let bez výrazných změn. V posledních desetiletích se však tento pohled změnil a začaly se vyvíjet a zkoumat tzv. biodegradabilní syntetické polymery, které by mohly nahrazovat v některých aplikacích konvenční polymery [4,5].

Biodegradabilní polymery by měly splňovat dobré užitkové, mechanické a zpracovatelské vlastnosti a zároveň po opotřebení by se měly v dostatečném čase v přirozeném prostředí rozložit bez toho, aniž by zanechaly problematická rezidua. Během aerobní biodegradace je uhlík v polymeru přeměněn mikroorganismy na biomasu nebo humus, uhlíkaté zbytky a CO_2 [6].



V současné době je řada komerčních výrobků, které výrobci propagují jako biodegradabilní. Mezi tyto biodegradabilní polymery patří např. Polyhydroxyalkanoate (PHA), Poly(lactic acid) (PLA), které jsou vyráběny z obnovitelných zdrojů. Dále jsou to biodegradabilní polymery založeny na ropném původu, např. Polycaprolactone (PCL), polyesteramide (PEA), alifatické kopolyestery (polybutylene succinate (PBS), polybutylene succinate/adipate (PBSA)) a aromaticko-alifatické kopolyestery (polybutylene adipate-co-terephthalate (PBAT)) [7,8].



Obr. 1 chemické struktury vybraných biodegradabilních polymerů [8].

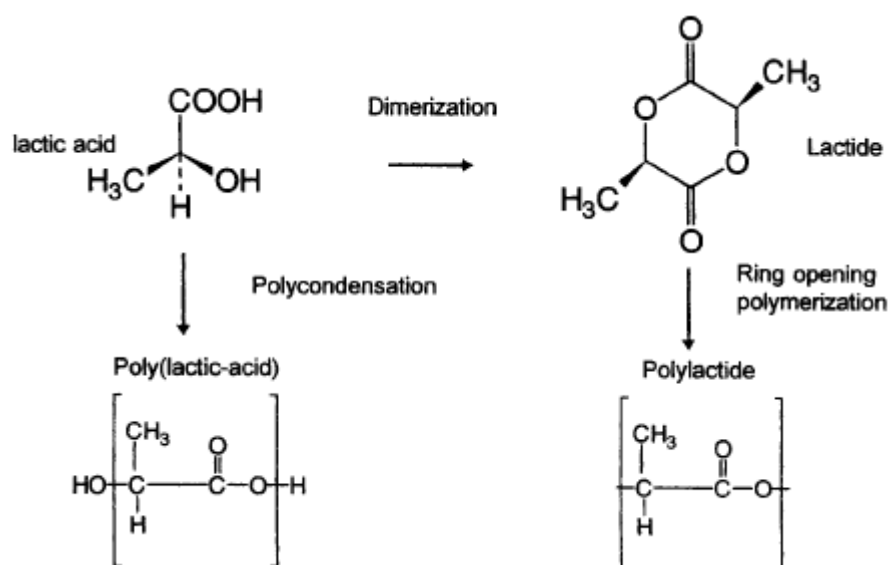
1.1 Aromaticko-alifatické kopolymerý

PBAT a Ecoflex patří mezi aromaticko-alifatické kopolyestery. Ecoflex je komerčně vyráběn firmou Basf od roku 1998. Oba polymery obsahují následující stavební jednotky: kyselinu tereftalovou, kyselinu adipovou a 1,4-butandiol. Dá se zjednodušeně říci, že alifatická složka podporuje snadnou biodegradaci materiálu a aromatická složka zlepšuje mechanické a zpracovatelské vlastnosti materiálu [7,8,9].

Vlastnosti materiálu na bázi PBAT jsou srovnatelné s vlastnostmi LD-PE. Film je odolný vůči protržení, kolísání vody a vzdušné vlhkosti, je také velmi flexibilní. Základní mechanicko-fyzikální vlastnosti aromaticko-alifatického PBAT materiálu, vyráběného společností Eastman Chemical pod komerčním názvem Eastar Bio, jsou uvedeny v Tab. 1 [6,7].

1.2 PLA (Poly(lactic)acid)

PLA patří mezi polyestery a jeho základní monomerní jednotkou je kyselina mléčná. PLA se může připravit dvěma způsoby, jednak přímou polykondenzací kyseliny mléčné a také otevíráním laktidového cyklu s následnou polymerací, tzv. Ring opening polymeration (ROP). Obě metody přípravy jsou schematicky ukázány na obr. 4. Z obr. 4 je patrné, že přímou polykondenzací vlastně vzniká kyselina mléčná, zatímco z ROP vzniká poly(lactid). Jelikož se však jedná o chemicky totožné látky, vžila se pro ně zkratka PLA. Příprava PLA polykondenzací je finančně méně náročná než u ROP, ale poskytuje polymer s menší molekulovou hmotností [10,11,12].



Obr. 2 Možnosti přípravy PLA polyesteru [10]

Výsledné vlastnosti PLA polyesteru závisí především na metodě jeho přípravy a na zastoupení L a D formy. Zajímavou vlastností PLA je jeho biokontabilita, čehož se využívá v lékařství. Základní mechanicko-fyzikální vlastnosti PLA polymeru, vyráběného společností Cargill pod obchodním názvem Natureworks, jsou uvedeny v Tab. 1. [10,11].

Tab. 1 Základní parametry komerčně dostupných materiálů PBAT a PLA [8].

	PLA NatureWorks	PBAT Eastar bio 14766
Hustota ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	1,25	1,21
Teplota tání ($^{\circ}\text{C}$)	152	110-115
Teplota skelného přechodu ($^{\circ}\text{C}$)	58	-30
Kristalinita (%)	0-1	20-35
Prodloužení při přetržení (%)	9	500
Propustnost vody ($\text{g}\cdot\text{m}^2\cdot\text{den}$)	172	550

1.3 Aplikace biodegradabilních polymerů

Vhodné aplikace aromaticko-alifatických kopolyesteru:

Tyto materiály nacházejí využití v mnoha odvětvích. Především se využívají k výrobě kompostovacích pytlů, filmů pro zemědělské účely tzv. mulčovací fólie, folií pro domácí použití, také často tvoří povlak či vrstvu různých materiálů. Ecoflex může být smíšen se škrobem nebo PLA a z takových směsí jsou pak vyráběny kelímky, tácky a talíře, používané v rychlých občerstveních [7,9].

Vhodné aplikace PLA:

PLA se využívá v potravinářském průmyslu (balicí fólie, obaly na potraviny a nápoje, sáčky), automobilovém průmyslu, elektronice (výroba CD), zemědělství (umělá hnojiva, květináče). Častým využitím je také příprava PLA vláken pro textilní výrobky, které pak vynikají vyšší odolností proti vodě, UV záření a mají sníženou hořlavost. Rovněž se PLA uplatňuje i v medicíně, kdy se například používají samovstřebatelné stehy, které se v lidském těle po určité době rozloží [11,13].

1.3.1 Biodegradabilní mulčovací fólie

Mulčování se stalo jednou ze základních technik pěstování plodin v zemědělství. Princip spočívá v tom, že na zasetou půdu se zavedeným zavlažovacím systémem se pokládá tenký polymerní film, díky čemuž vzniká řada výhod. Film udržuje půdní vlhkost, tvoří bariéru proti ochlazování půdy prouděním vzduchu a tak zabraňuje jejímu prochlazení, např. v ranních hodinách. Je proto možné zasít plodinu v dřívějším či pozdějším období roku a tím pádem očekávat úrodu mimo hlavní sezónu, což pro zemědělce zpravidla znamená vyšší výkupní cenu. Fólie také brání růstu plevelů, umožňuje efektivnější používání hnojiv a herbicidů, a to zpravidla vede k lepší úrodě [14,15].

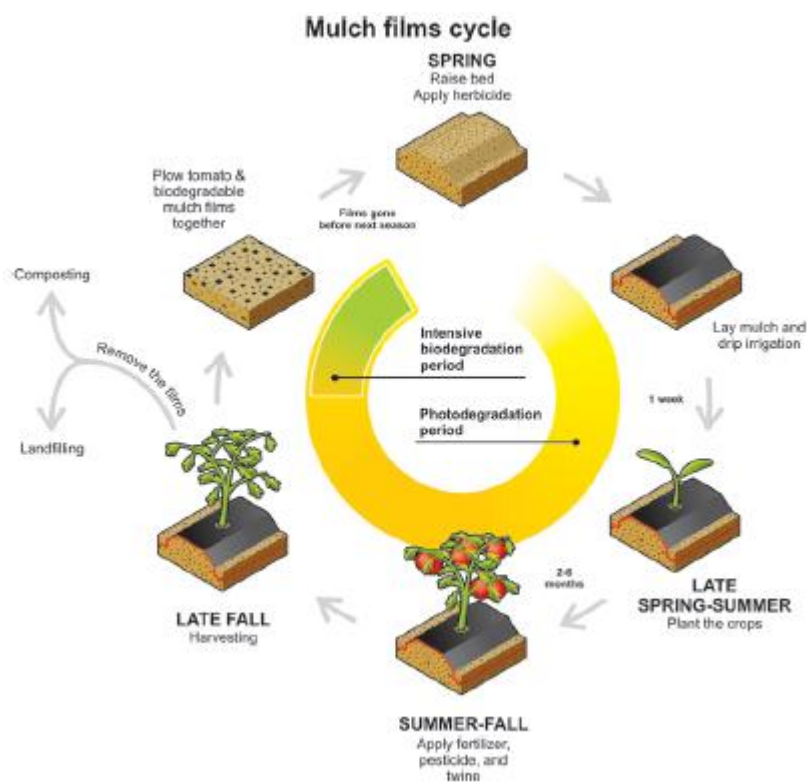
Navzdory těmto výhodám se objevuje několik problémů spojených s mulčováním. Tím hlavním je, co s polymerními filmy po sklizni. Materiál je často značně znečištěný, je promáčený, částečně protrhaný a degradovaný působením slunečního záření, což ho dělá obtížně recyklovatelným. Jelikož se doposud pro tyto aplikace převážně využívají konvenční polymery, hlavně polyetylen, dochází k tomu, že se tento materiál hromadí v prostředí bez výrazných změn po mnoho let. Proto se v posledních letech řada výrobců snaží vyvíjet biodegradabilní mulčovací filmy, které by mohly nahradit polyetylen. Při návrhu těchto filmů musí být uváženy všechny faktory životního prostředí, aby nedošlo k předčasnému nebo naopak pomalému rozkládání filmu [15].

Jedním z hlavních degradačních mechanismů působících na vystavený mulčovací film je vliv solárního záření respektive jeho UV složky v oblasti vlnových délek 300 – 400 nm. Díky působení UV záření často vznikají v polymerech radikály, které mohou vyvolat například štěpné nebo síťovací reakce. Jsou-li pak radikály náchylnější k disproportionaci nebo k terminaci vzdušným kyslíkem, převládou v polymeru štěpné reakce a dojde ke ztrátě molekulární hmotnosti. Jestliže jsou vzniklé radikály náchylnější k přenosu a terminaci vzájemně rekombinují, převládou v polymeru síťovací reakce [1].

V práci [15] se autoři zabývali touto problematikou a nastínili možnosti, jak naložit s biodegradabilním polymerním materiálem po sklizni a také, jaké hlavní degradační mechanismy se uplatňují při rozkladu PBAT filmu v reálných podmínkách na poli, obr. 1. Na obr. 1 lze vidět, že po sklizni se mohou fotodegradované fólie uložit na skládku, kompostovat nebo zaorat do polní půdy. Zaorání je asi nejlepší cestou, protože odpadají náklady na odvoz fólie. Je zde však jedna zásadní podmínka, a to taková, že fólie musí být zcela rozložena do jara. Cílem práce bylo proto navrhnout modifikaci PBAT filmu schopnou nahra-

dit LD-PE. Jako zkoumané polymery byly využity filmy vyrobené z PBAT. Jednak se vytvořila z PBAT bílá fólie s oxidem titaničitým a černá fólie s přísadkou sazí. Oxid titaničitý byl katalyzátorem fotodegradací, zatímco saze byly využity jako stabilizátor. Rovněž byl pro srovnání využit i film LD-PE. Fólie se položily na půdu se zasetou plodinou (rajčata) na jaře a během celého vegetačního vývoje pěstování se u nich sledovaly fyzikální, mechanické a optické změny.

Po dvou týdnech se u bílých fólií vytvářely prasklinky, dírkky a postupně se film začal rozpadat a přestal tak plnit svou funkci. Černý film tyto změny začal vykazovat až po 8 týdnech a fólie LD-PE nevykazovala žádné viditelné změny. Přestože docházelo k viditelným změnám u černého filmu, zdá se, že takto připravený film by mohl nahradit LD-PE, protože si uchoval podobnou ochranu proti růstu plevelu a poskytl podobnou úrodu jako polyethylen, který však nevykazoval žádné fyzické změny na pohled.



Obr. 3 Využití a možnosti odstranění biodegradabilních fólií [15].

2 KOMPOSTOVÁNÍ

Kompostování je přírodní cesta recyklování a odbourávání organického odpadu. Je to řízený rozklad organických materiálů působením bakterií, hub, hmyzu, žížal a dalšího půdního edafonu za kontrolovaných podmínek. Produktem kompostování je humus neboli kompost. Výsledný kompost se může vrátit do přírody [4,16].

2.1 Podmínky kompostování

Rychlost kompostování a kvalita výsledného kompostu závisí na tom, jaké podmínky se zajistí mikroorganismům, podílejících se na mineralizaci a huminifikaci biologicky rozložitelného materiálu. Mezi tyto základní podmínky patří poměr C:N, vlhkost, aerační status a teplota.

Poměr C:N

Vstupní směs biologicky rozložitelného materiálu, by měla mít v ideálním případě 40-30 dílků uhlíku na 1 dílek dusíku. Obecně platí, že materiál čerstvý, zelený a šťavnatý je bohatší na dusík než materiál starší, hnědý a dřevnaté struktury. Navíc je většinou potřebné přidávat dřevnatý materiál, neboť má zásadní vliv na pórovitost kompostu. Vstupní materiál by měl mít dostatečně velký specifický povrch umožňující přístup mikroorganismům (drcení, šťepkování).

Vlhkost

Ideální vlhkost při kompostování by měla být mezi 50-60%. Voda je nezbytná pro životní pochody všech organismů a její nedostatek při kompostování způsobuje několik problémů. Tím hlavním je zpomalení biochemických dějů, tím i celého procesu kompostování. Naopak nadbytek vody může vést k ucpávání póru a tím pádem k vytěsnění zásob kyslíku, ale i ke snižování teploty v kompostéru, což vede opět ke zpomalení celého děje.

Aerační status

Dostatek kyslíku je pro aerobní organismy životně důležitý a při jeho nedostatku tyto druhy organismů umírají. Způsob provedení aerace je dán kompostovacím procesem a používanou technikou.

Kompostovací procesy se dělí dle velikosti na:

- Domovní (kompost z jedné domácnosti)
- Komunitní (několik domácností kompostuje odpad dohromady)
- Průmyslové

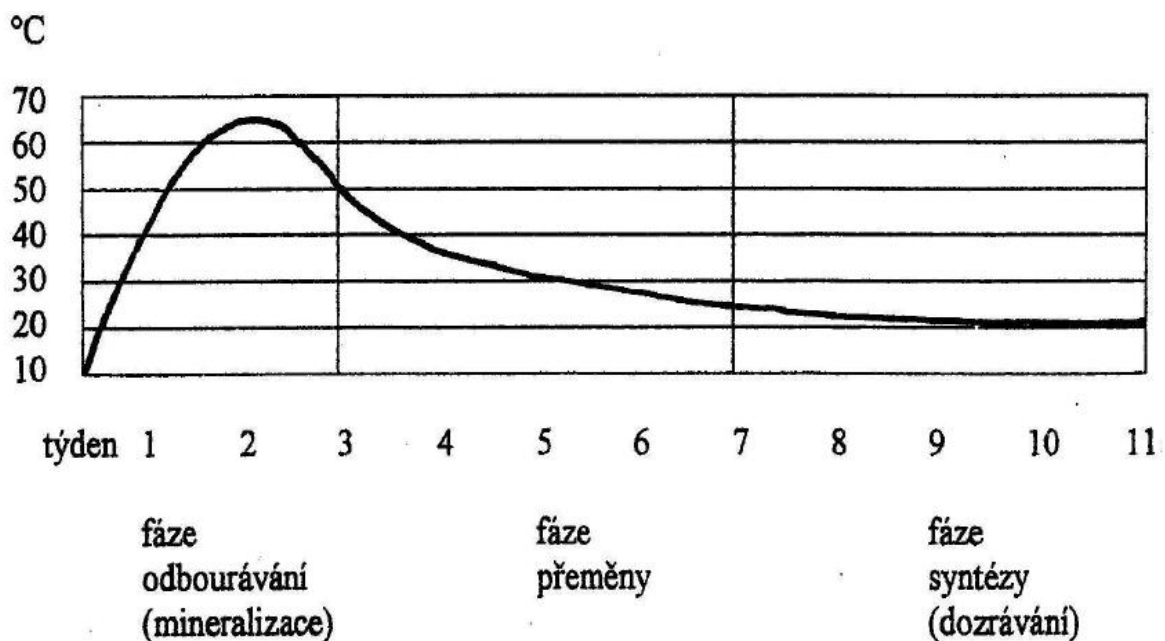
Při domovním a komunitním kompostování se používá k provzdušnění jednoduchý princip proházení kompostu jednou až dvakrát do měsíce.

Průmyslové kompostování může být prováděno několika způsoby, například:

- Kompostování v pásech – zde je aerace prováděna mechanickým překopáváním pomocí překopávačů
- Kompostování v uzavřených nádobách – aerace prováděna většinou pomocí ventilátoru vhnáním či odsáváním vzduchu nebo mechanickým otáčením
- Kompostování v polo-uzavřených nádobách

Teplota

Teplota ovlivňuje zásadně rychlost kompostování. V průběhu kompostování teplota kolísá (viz obr. 6) a má zásadní význam na daném biotickém složení. Při velmi nízkých teplotách kompostování vůbec nezačne probíhat. Nicméně tento stav je reverzibilní a při zvýšení teploty začnou organismy a mikroorganismy vykonávat svou činnost. Naopak příliš vysoké teploty vedou k postupnému odumírání organismů a tento děj je již ireverzibilní [4,16].



Obr. 4 průběh teploty při ideálním kompostování [16]

2.2 Fáze kompostování dle teploty a mikrobiálního oživení

Průběh kompostování z mikrobiálního pohledu, probíhá ve třech fázích:

- Mezofilní fáze
- Termofilní fáze
- Fáze chladnutí a zrání (mezofilní fáze)

První mezofilní fáze:

Na začátku procesu kompostování se uplatňují především mezofilní bakterie a houby, které odbourávají snadno rozložitelné složky organické hmoty, jako jsou sacharidy, tuky a bílkoviny. Při těchto rozkladných procesech se začne zvyšovat teplota, která se uvolňuje vlivem působení organismů. Degradace proteinů vede k uvolňování amoniaku, což má za následek zvýšení pH na hodnotu 8-9. Tato fáze kompostování končí, když teplota převyšuje 40°C a trvá několik hodin až dnů.

Termofilní fáze:

Tato fáze kompostování začíná, když teplota přesáhne 40°C. Termofilní bakterie a houby začnou být v kompostu dominantní skupinou. Teplota se postupně dále zvyšuje a to vede ke zrychlenému rozkladu a přeměně organického odpadu. Jakmile však teplota přesáhne teplotu 55-65°C, dojde k tomu, že mikrobiální aktivita a diverzita klesne, protože mnoho organismů při těchto teplotách odumírá. Při tak vysokých teplotách dochází k částečné hygienizaci kompostu. Tato fáze trvá několik dnů až měsíců.

Fáze chlazení a zrání:

Po zkonsumování snadno rozložitelných organických zdrojů začne kompost chladnout a stává se stabilním. Znova se začnou vyskytovat především mezofilní bakterie a houby, které provádějí konečné zrání kompostu. Druhové zastoupení je však rozdílné, oproti první mezofilní fázi. V kompostu je především hojné množství aktynomycét a protozoy. V této fázi probíhají biologické pochody pomalu, ale kompost je nadále přeměňován a stává se postupně vyzrálým.

Trvání všech fází a celého kompostování závisí na kontrolovaných podmínkách, kterým jsou mikroorganismy vystaveny [4].

3 POŽADAVKY A SMĚRNICE PRO SLEDOVÁNÍ BIODEGRADACE V LABORATORNÍM ROZSAHU

S narůstajícím rozvojem a využíváním biodegradabilních polymerů na komerčních trzích bylo zapotřebí vyvinout uzanční postupy pro právoplatné a věrohodné zhodnocení biodegradace. Spotřebitelům při koupi těchto materiálů, které jsou často dražší než konvenční polymery, totiž nestačí pouze označení biodegradabilní plast a často po dodavateli či výrobci vyžadují certifikát, že produkt je skutečně biodegradabilní dle mezinárodních standardů [17].

Standardní metody týkajících se biodegradace plastů byly zavedeny např. American Normative Reference (ASTM), Japanese Industrial Standards (JIS), European Normative Reference, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), International Organization Standardization (ISO). Základní výčet ISO norem zabývajících se biodegradací polymerů je uveden v tab. 1. V této tabulce jsou uvedeny normy, které byly vydány v rámci pracovní skupiny TC61/SC5/WG22. Je zde uvedeno 9 ISO norem, které popisují, jak provádět biodegradační test v daném prostředí (vodní prostředí, kompost a půda), 1 ISO norma popisující vhodnou přípravu zkoušených vzorků a 1 ISO norma určující specifikace pro kompostovatelné plasty [17,18].

Pro sledování biodegradace polymerů v prostředí kompostu existují dvě platné normy, a to ISO 14 855 a ASTM D 5338, které v následujícím textu budou popsány.

Tab. 2 základní výčet ISO norem zabývajících se biodegradací polymerních materiálů [18]

Číslo ISO normy	Název
14851	Stanovení úplné aerobní biodegradability polymerních materiálů ve vodném médiu – metoda měření spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru.
14852	Stanovení úplné aerobní biodegradability polymerních materiálů ve vodném médiu – metoda analýzy vyvinutého CO ₂ .
14855-1	Stanovení úplné aerobní biodegradability polymerních materiálů za řízených podmínek kompostování – metoda analýzy vyvinutého CO ₂ – část 1: obecná metoda
14855-2	Stanovení úplné aerobní biodegradability polymerních materiálů za řízených podmínek kompostování – metoda analýzy vyvinutého CO ₂ – část 2: Grafimetrické měření vyvinutého CO ₂ v laboratorním zkoušce
16929	Plasty – stanovení stupně rozkladu plastových materiálů za definovaných podmínek kompostování v průzkumné zkoušce
20200	Plasty – stanovení stupně rozkladu plastových materiálů za simulace podmínek kompostování – v rozsahu laboratorní zkoušky
17556	Plasty – stanovení úplné aerobní biodegradace v půdě, měřením odběru kyslíku v respirometru, nebo množství vyvinutého CO ₂
14853	Plasty – stanovení úplné anaerobní biodegradace ve vodném systému – metoda měření produkovaného bioplynu
15985	Plasty – stanovení úplné anaerobní biodegradace a rozpadu - metoda analýzy uvolněného bioplynu
17088	Specifikace pro kompostování plastů
DIS 10210	Plasty – Příprava zkoušených materiálů pro biodegradační zkoušku

3.1 Stanovení úplné aerobní biodegradability polymerních materiálů za řízených podmínek kompostování dle ISO 14855-1

Tato norma přesně popisuje princip, parametry a sestavení respirometrického systému, environmentální testovací podmínky, základní parametry použitého kompostu, vhodnou přípravu vzorků a zkoušené směsi[6,19].

3.1.1 Požadavky na kompost

Dle ISO 14855 je doporučovaný vyzrálý kompost, který nejlépe vznikl při průmyslovém kontrolovaném kompostování pevného komunálního odpadu, neboť je zde záruka dostatečné mikrobiální rozmanitosti. Kompost by měl být homogenní a neměl by obsahovat velké inertní předměty jako sklo, kameny a kousky kovů a před přidáním do bioreaktoru by se měl přesít na velikost okolo 0,5 – 1 cm. Stáří kompostu by mělo být okolo 2 až 4 měsíců od jeho založení.

Před začátkem biodegradčního experimentu se musí u kompostu stanovit pH, celková sušina, spalitelný podíl a mikrobiální aktivita. Hodnota pH by měla být v rozmezí 7 – 9. V laboratorních podmínkách se zjistí hodnota pH přípravou roztoku kompostu a demineralizované vody v poměru 1:5. Roztok se intenzivně promíchá a změří se okamžité pH s využitím pH metru.

Celková sušina se obecně získává odebráním známého množství zkoumaného materiálu, látky či směsi, s následným sušením při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti. Celková sušina kompostu by měla být mezi 50 – 55 % a je indikátorem vodního obsahu. Zregulování vodního obsahu se provádí buď přidáním vody nebo provzdušněním kompostu suchým vzduchem.

Spalitelný podíl částic se získává díky spálení známého množství zkoumaného materiálu, látky či směsi při teplotě 550 °C do konstantní hmotnosti a jeho odečtením od celkové sušiny. Množství těchto částic by nemělo být větší než 70% u použitého kompostu.

Ověření mikrobiální aktivity inokula se provádí již v průběhu testu sledováním rychlosti rozkladu pozitivního vzorku (celulózy) a množstvím vyvinutého CO₂ v nádobách, které obsahují pouze kompost. Referenční materiál by se měl rozložit za dobu 45 dnů alespoň z 70% a rozdíly mezi jednotlivými nádobami s referenčním vzorkem by neměly být větší než 20%. Samotné inokulum by mělo během prvních 10 dnů testu produkovat 50 – 150 mg CO₂ na spalitelný podíl kompostu. Když je produkce CO₂ vyšší, tak se kompost pro-

vzdušňuje po několik dnů a následně se připraví nové inokulum k novým testům. Když je však aktivita inokula příliš nízká, potom se musí využít a použít jiný kompost.

Je dále doporučováno stanovit celkový organický uhlík, celkový dusík a celkové mastné kyseliny na začátku a na konci testu [19].

Ve studii [20] se autoři snažili zjistit, zda rozdílná teplota a délka skladování kompostu ovlivní mikrobiální aktivitu, mikrobiální diverzitu a následnou biodegradaci zkoumaných materiálů. Kompost byl založen přímo na pracovišti a byla u něj sledována teplota. Týden po začátku zrající fáze kompostování se kompost odebral a následně byl vložen do skleněných nádob, které se uzavřely a skladovaly při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30, 60 a 90 dnů. Z hlediska mikrobiálního rozboru kompostu se stanovovaly počty mezofilních a termofilních organismů. Předpokládalo se, že jejich počet bude nižší u kompostu skladovaného při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ než u kompostů skladovaných při vyšších teplotách. Mezofilních mikroorganismů však bylo v počtech více při nižší teplotě skladování. U termofilních mikroorganismů se však předpoklad potvrdil, což se přikládá tomu, že tyto druhy jsou více náchylné na mrazivé podmínky než mezofilní druhy. Rovněž se provedla analýza aktivity tzv. exoenzymů. Zjistilo se, že aktivita mírně klesala s dobou skladování kompostu. Nicméně biodegradace celulózy byla téměř nezávislá na délce a teplotě skladování, což naznačuje, že délka a způsob skladování kompostu nemá zásadní vliv na biodegradční experiment.

3.1.2 Požadavky na vzorky a zkoušenou směs

U testovaného vzorku je nezbytné určit jeho celkový organický uhlík (TOC), aby bylo možno vypočítat teoretické množství CO_2 , které může vzniknout při úplné mineralizaci vzorku. TOC vzorku se může zjistit např. elementární analýzou za předpokladu, že sloučenina neobsahuje žádný anorganický uhlík.

Do bioreaktoru by se mělo přidat takové množství vzorku, aby vznikající CO_2 bylo možno stanovit. Běžně je vyžadováno na jeden bioreaktor minimálně 50g sušiny s obsahem 20g TOC.

Zkoumaný materiál může být využit v různých modifikacích, například ve formě prášku, zrníček, tenkých fólií či jiných jednoduchých tvarů. Maximální vnější povrch každého kousku zkoumaného materiálu by měl být 2 x 2 cm. Specifický povrch zkoumaného materiálu výrazně ovlivňuje rychlost biodegradace, což bude zmíněno níže v práci [19].

Smíšením kompostu, testovaného materiálu a inertního materiálu dostaneme zkoušenou směs. Množství směsi závisí na objemu použitého bioreaktoru. Doporučuje se přidat 1 dílek sušiny materiálu na 6 dílku sušiny inokula kompostu. Inertní materiál se do tohoto vztahu nezahrnuje a slouží především jako podpůrný materiál umožňující dostatečnou pórovitost směsi. Je důležité, aby výsledná směs měla správnou vlhkost (ideálně mezi 50 – 55%). Je také důležité, aby v každé kompostovací nádobě bylo stejné množství kompostu. Stejně principy přípravy platí i pro směs s referenčním vzorkem [19].

3.1.3 Požadavky na respirometrický systém

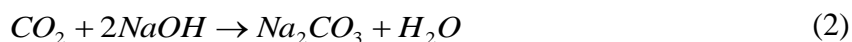
Respirometrický systém či respirometr je zařízení, které je využíváno k měření (monitorování) respirační aktivity žijících organismů. Při aerobní respiraci je O_2 konečným akceptorem elektronů pocházejících ze substrátu, který je postupně rozkládán a mineralizován až na CO_2 , H_2O a minerální soli prvků obsažených v substrátu. Respirometrem se tedy může měřit buď spotřeba O_2 , nebo množství vyvinutého CO_2 z rozkládaného materiálu. Obecně je respirometrický systém většinou složen z 3 hlavních komponent [6,19].:

- Přívod vzduchu
- Bioreaktor
- Měřicí zařízení

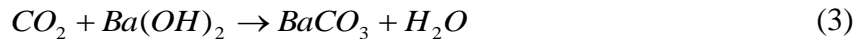
Přívod vzduchu

Přívod vzduchu do kompostovací nádoby je většinou zajištěn využitím tlakové láhve se stlačeným vzduchem nebo syntetickým vzduchem bez CO_2 s určitou vlhkostí. Syntetický vzduch nemusí být dále upravován a konstantním tlakem se vhání do bioreaktoru. Naopak neupravený stlačený vzduch se před vstupem do bioreaktoru probublává skrz nádoby s roztoky hydroxidů, kde dochází k odstranění atmosférického CO_2 .

Vzduch se nejprve vede přes vodný roztok NaOH, kde dochází k absorpci atmosférického CO_2 dle:



Za roztokem NaOH je umístěn roztok Ba(OH)₂, který slouží jako indikátor absence CO₂ ve vzduchu. Pokud se ve vzduchu nachází dostatečné množství CO₂ dojde ke vzniku bílé sraženiny dle:



Vzduch musí mít také určitou vlhkost, která by měla být mezi 15 – 90%. Vlhčení se děje přímo ve vodném roztoku NaOH. Často se však vzduch ještě probublává skrz nádobu s vodou, která se umísťuje za absorpční roztoky. Vlhkost se ověřuje RH metrem.

Uspořádání absorpčních roztoků není striktně dáno, je důležité, aby přivádějící vzduch měl co nejmenší množství CO₂. Někdy se do bioreaktoru přivádí neupravený vzduch s atmosférickým CO₂. V takových případech se měří množství CO₂ před vstupem do reaktoru a zjištěná hodnota se pak odečte od vycházejícího CO₂ s reaktoru.

Bioreaktor a inkubační místnost

Kompostovací nádoba neboli bioreaktor je prostor, kde se umísťuje zkoušená směs. Bioreaktor musí být vzduchotěsný. Objem nádoby by neměl být menší než 2 litry a musí být vyroben z inertního materiálu, aby nedocházelo k narušování zkoušky. Tímto materiálem je povětšinou sklo. Dle této normy musí být využito nejméně 9 bioreaktorů s následným složením:

- a) 3 nádoby pro směs se zkoušeným materiálem
- b) 3 nádoby pro směs s referenčním materiálem
- c) 3 nádoby pro směs pouze s inokulem (tzv. Blank)

Do bioreaktoru je přiváděn vzduch zbavený CO₂ nejlépe ze spodu nádoby. Volí se takové proudění, aby byly zachovány aerobní podmínky po celou dobu testu (kyslík by neměl klesnout pod 6%). Bioreaktory jsou umístěny v inkubátoru při teplotě 58°C±2°C. Pravidelně jednou týdně by se měly protřepat. Délka zkoušky by neměla trvat déle než 180 dnů. Bioreaktor musí být zaplněn směsí tak, aby zbyl volný prostor. Obvykle se zaplňuje ze 2/3.

Měřicí zařízení:

Měření množství CO₂ vyvinutého z kompostu a zkoušeného materiálu může být realizováno buď pomocí absorpčních roztoků NaOH a Ba(OH)₂ s následnou acido-bazickou titrací, která se provádí pomocí HCl o známé koncentraci nebo s využitím instrumentálních tech-

nik, např. plynová chromatografie je hojně využívanou koncovkou respiračního systému pro sledování biodegradace v prostředí kompostu. [6,19].

3.2 Stanovení úplné aerobní biodegradability polymerních materiálů za řízených podmínek kompostování dle ISO 14855-2

Tato norma popisuje využití modifikovaného respirometrického systému tzv. MODA (Microbial Oxidative Degradation Analyzer). Opět se stanovuje množství vyvinutého CO₂ z materiálu, tentokrát však pomocí gravimetrického vážení absorpční kolony. Norma byla zavedena roku 2003 a oproti ISO 14855-1 má dvě zásadní výhody. Tou první je, že zkoušeného materiálu je vyžadováno mnohem méně a to asi jen 10 g pro daný typ vzorku (ISO 14 855-1 vyžaduje nejméně 150 g vzorku) a druhou výhodou je, že aparatura MODA je poměrně malá a zabere tak málo místa v pracovní laboratoři [18,21].

3.2.1 Požadavky na kompost, vzorek a zkoušenou směs

Ve srovnání s ISO 14855 – 1 je v této části ISO 14855 – 2 použito desetinné množství inokula kompostu a zkušební vzorku.

Inokulum musí splňovat stejné podmínky přípravy a musím mít stejné fyzikálně-chemické a mikrobiální parametry jak bylo uvedeno v kapitole 3.1.1.

Zkoušený materiál by měl být převeden do formy prášku, nicméně malé kousky folií a různých tvarů je také možno testovat. Maximální průměrná velikost částic by však neměla převyšovat 250 μm. Běžně se dává do směsi 10g sušiny zkoušeného materiálu obsahujícího alespoň 4g TOC na kompostovací nádobu [22].

3.2.2 Popis a princip laboratorního přístroje MODA

Typická zkušební laboratorní aparatura MODA může být sestavena, jak ukazuje obr. 1. Je složena ze 4. základních částí:

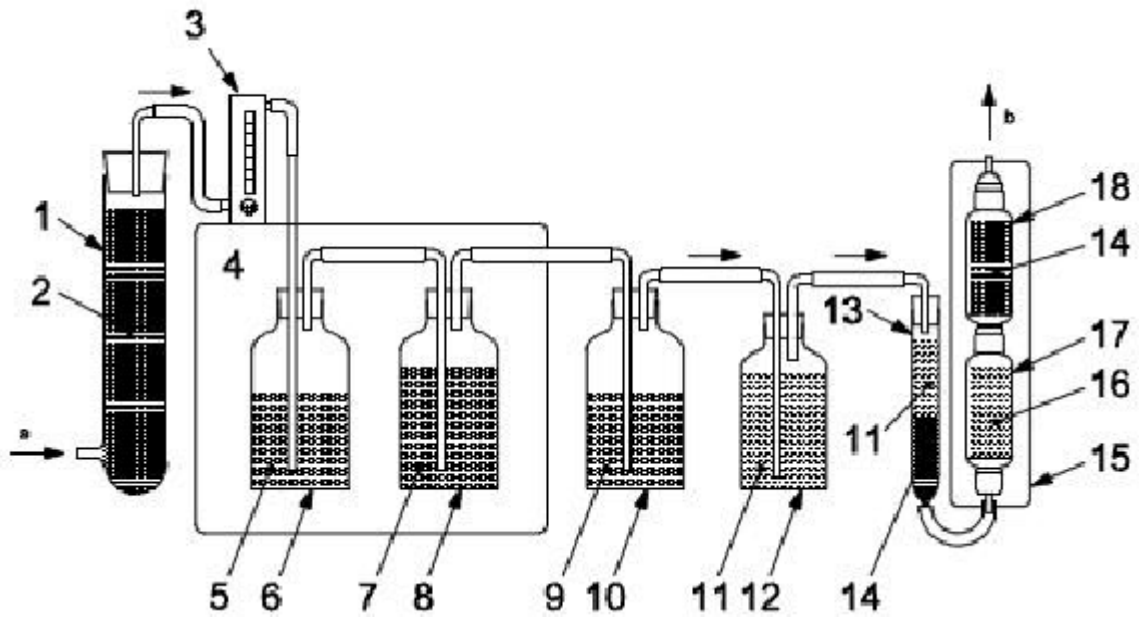
- Zásobárnu a úpravnou přitékajícího vzduchu
- Kompostovací nádobou umístěnou v inkubátoru nebo elektricky vyhřívanou
- Absorbčního systému pro záchyt NH₃, sirovodíku, VOC látek a vody z plynu vycházejícího z kompostovacích nádob
- Absorbční kolony pro záchyt CO₂ pocházejícího z rozkládaného materiálu pro gravimetrickou analýzu

Jako zásoba vzduchu se využívá láhev se stlačeným vzduchem. Ten se vede přes kolonu naplněnou roztokem NaOH, kde dochází k odstranění vzdušného CO₂ dle rovnice 1 a následně přes nádobu s vodou, kde dochází ke zvlhčení vzduchu. Dále vzduch proudí do kompostovacích nádob, kterých musí být nejméně 6 a to:

- a) dvě nádoby pro směs se zkoušeným materiálem
- b) dvě nádoby pro směs s referenčním materiálem
- c) dvě nádoby pro směs pouze s inokulem

Kompostovací nádoby, které mají obvykle obsah 500 ml, musí být vyrobeny s inertního materiálu (nejlépe sklo). Kompostovací nádoby jsou vystaveny v inkubátoru teplotě 58°C±2°C. Zajímavou modifikací je elektrické vyhřívání kompostovací nádoby s regulací teploty. Doba kompostování by neměla převýšit 180 dnů.

Z kompostovací nádoby vychází vzduch, který se musí zbavit amoniaku, vody a těkavých organických kyselin. To se provádí přes absorbenty obsahující 1M H₂SO₄, silika gel a bezvodý CaCl₂ (je důležité dodržet toto pořadí). Takto vyčištěný vzduch se vede do kolony pro hodnocení CO₂ vyloučeného z rozkládaného materiálu. Kolona je naplněna směsí NaOH a Ca(OH)₂. Vlivem reakce dojde k vytvoření uhličitánů a H₂O. Vytvořená H₂O je zachycena pomocí absorbentu (bezvodý CaCl₂). Množství CO₂ se stanoví zvážením kolony před a po provedení analýzy [18,21,22].



Obr. 5 schéma přístroje MODA [22]

Kde:

1	absorbér atmosférického CO ₂	10	absorbér NH ₃
2	NaOH	11	silikagel
3	průtokoměr	12	odvlhčovací nádoba
4	indikátor s termostatem	13	odvlhčovací nádoba
5	H ₂ O	14	bezvodý CaCl ₂
6	zvlhčovací nádoba	15	detekční kolona
7	zkoušená směs	16	směs NaOH a Ca(OH) ₂
8	kompostovací nádoba	17	absorbční kolona CO ₂
9	1M H ₂ SO ₄ s indikátorem metyloranž	18	absorbční kolona H ₂ O

3.3 Stanovení úplné aerobní biodegradability polymerních materiálů za řízených podmínek kompostování dle ASTM D 5338

Norma ASTM D 5338 má jen několik rozdílů oproti již zmíněné normě ISO 14855-1. Jedním s těchto rozdílů je, že může být během testování využit teplotní profil. Tento teplotní profil může být nastaven následovně: 1 den 35°C; 4 dny 58°C; 23 dnů 50°C a 2 dny 35°C. Může se však využít i konstantní teplota 58 °C po celou dobu testu. Druhým podstatným rozdílem je, že se musí testovat i nebiodegradabilní vzorek v prostředí kompostu. Proto se navíc připravují i 3 paralelní bioreaktory se vzorkem LD-PE [6].

4 STUDIUM BIODEGRADABILNÍCH POLYMERŮ NA RŮZNÝCH PRACOVÍŠTÍCH

V článku [6] byla biodegradace polymerů v prostředí kompostu sledována pomocí respirometrického systému, který byl sestaven dle ASTM D5338. Jako zkoušený materiál bylo využito PLA. PET bylo využito pro negativní kontrolu a jako referenční vzorek pro pozitivní kontrolu byl využit škrobový prášek. PLA a PET se přidávalo do bioreaktorů ve formě částic o velikosti 1cm x 1 cm. Respirometrický systém se nechal běžet bez výraznějšího zásahu po dobu 63 dnů při teplotě $58\pm 2^\circ\text{C}$ a relativní vlhkosti $55\pm 5\%$. Během této doby se PLA, škrobový prášek a PET rozložili z $64,2\pm 0,5\%$, $72,4\pm 0,7\%$, $2,7\pm 0,2\%$ v tomto pořadí.

Dle [18] byla biodegradace zkoumaných polymerů v prostředí kompostu sledována MODA analyzátozem, který splňoval požadavky dle ISO 14855 – 2. Jako zkoumané vzorky byly použity PCL (poly(caprolactone) a PLA. Cílem studie bylo sledování stupně rozkladu zkoumaných polymerů na základě jejich různých velikostí a tvarů. Materiály PLA byly dodány v různých komerčních formách, jako např. PLA kuličky, PLA filmy s tloušťkou 25 μm , vratné kelímky vyrobené z PLA. Na pracovišti se také připravila směs PLA a bavlny.

Závislost rychlosti rozkladu polymeru na velikosti částic byla jasně prokázána u prášku připraveného z PLA kuliček. PLA kuličky se mechanicky rozrušily a převedly do formy prášku a následně se přesily na velikost 0-125 μm , 125-250 μm , 250-500 μm . Při následném testu se ukázalo, že prášek s částicemi v rozmezí 0-125 μm se rozkládal 2 x rychleji než prášek s částicemi 250-500 μm . Během prvních 10 – 20 dnů biodegradace vůbec neprobíhala, nicméně do 50 dnů dosáhly všechny velikosti prášků 80% rozkladu.

Tvar vzorku má vliv na rychlost rozkladu polymeru v kompostu a je jasně prokázán u vzorků připravených z komerčních PLA kelímků. Jednak se připravil prášek mechanickým rozrušením, či se nastříhaly čtvercové plátky o velikosti 1cm x 1cm. Prášek se rozložil za 30 dnů cca z 80%, zatímco plátky ve formě čtverečků této hodnoty dosáhly až cca za 100 dnů. Zajímavostí také bylo, že prášek z PLA kelímku nevykazoval na začátku zkoušky žádnou lagovou fázi, což mohlo být způsobeno změkčovadly, které se do kelímku zřejmě při komerční výrobě přidaly.

Rovněž i v článku [23] se autoři zabývali sledováním závislosti biodegradace polymerů v prostředí kompostu pomocí respirometrického systému sestaveného dle ASTM D5338.

Jako zkoušené polymery byly vybrány PLLA, PBS, PCL, PBSA. PLLA, PBS byly označeny jako pomaleji se rozkládající polymery, zatímco PCL a PBS jako rychle se rozkládající polymery v prostředí kompostu. Z těchto polymerů se připravil prášek a tenká fólie o tloušťce 47-72 μm . Fólie byly nastříhány na čtvercové kousky. Byla zde vyslovená jasná myšlenka a předpoklad, že polymer s větším specifickým povrchem by se měl rozkládat v prostředí kompostu rychleji, než tentýž polymer s menším specifickým povrchem, protože poskytne mikroorganismům a enzymům lepší přístup k němu. Tento předpoklad byl potvrzen, protože práškové formy všech sledovaných polymerů se v počáteční fázi zkoušky rozkládaly podstatně rychleji než vzorky ve formě fólií. U PLLA a PBS se tento trend udržel po celou dobu zkoušky (50 dnů), kdežto u PCL a PBS se stupeň degradace postupně vyrovnal. Tento fakt je přikládán tomu, že biodegradace snadno rozložitelných polymerů probíhala v prostředí kompostu rychle, a proto se vzorky fólií velmi rychle rozpadaly a jejich specifický povrch se tím zvětšil.

Práce [24] volně navazuje na již zmíněnou studii [15] jež je uvedena v kapitole. V práci [15] autoři zjistili, že během vystavení PBAT fólií slunečnímu záření docházelo u vzorku k síťování a štěpení řetězce. Síťováním se PBAT fólie staly křehčí a snadno se protrhávaly a rozpadaly na menší kousky. Cílem této studie [24] bylo navodit síťování PBAT vzorků působením UV záření, vyšetřit případné změny v polymeru stejně jako u reálného testu a vyšetřit zdali síťování ovlivní rychlost biodegradace v prostředí kompostu.

PBAT fólie byly vystaveny UV záření o vlnové délce 340 nm v zařízení Q-panel lab. Vědci se snažili navodit takové laboratorní podmínky, které by odpovídaly reálným podmínkám. Proto byly PBAT fólie ozařované ve 12 hodinových cyklech (8 hodin napodobení denního světla a 4 hodiny napodobení noci) po dobu 6 týdnů. Každý týden se vzorky odebíraly k analýze a porovnáním s daty získanými v práci [11] bylo zjištěno, že došlo k úspěšnému napodobení reálných podmínek při vystavení fólií slunečnímu záření.

Jednou ze sledovaných vlastností bylo síťování. To bylo sledováno rozpouštěním v THF dle ASTM D 2765. Bylo zjištěno, že již po prvním týdnu došlo ke vzniku gelového podílu kolem 60 – 70%. V dalších týdnech již nedocházelo k nárůstu gelového podílu a % vzniklého gelu se pohybovala okolo 70%. Aby však autoři byli schopni vyšetřit, zdali síťování skutečně ovlivňuje následnou biodegradabilitu vzorku v prostředí kompostu, museli připravit fólie, které budou vykazovat po rozpouštění v THF i jiné gelové zastoupení. Proto byly fólie ozařovány v zařízení Q-panel Lab po dobu 2,5, 6, 10 a 12 hodin. Takto připravené fólie byly následně rozpouštěny v THF a produkovaly rozdílné gelové zastoupení a to

10%, 30%, 50% a 70%. Ozářené fólie tvořící různé zastoupení po rozpouštění v THF byly podrobeny biodegradačnímu experimentu dle ASTM D 5338. Test probíhal 45 dnů a během této doby se neozařovaná fólie rozložila z 60%. Ozářené fólie se mineralizovaly pomaleji. Fólie tvořící v THF 10%, 30%, 50% a 70% gelový podíl se zmineralizovaly za 45 dnů z 36%, 43%, 21% a 24% v tomto pořadí. Lze vidět trend, že fólie ozářené 2,5 a 6 hodin se mineralizovaly 2x rychleji než fólie ozářené 10 a 12 hodin. Vědci tak vyslovili myšlenku, že síťování je klíčový proces rozkladu PBAT filmu, které však ovlivňuje následnou biodegradabilitu v prostředí kompostu. Hlavním vysvětlením bylo, že zasíťované vazby poskytují horší přístup mikroorganismům.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem práce je provést biodegradační experimenty s ozářenými vzorky Ecoflex a PLA v prostředí kompostu. Snahou je vyšetřit, zdali nebude ovlivněná rychlost biodegradace s dobou ozáření vzorků.

Rovněž bude snaha sledovat možné změny počtů mikroorganismů v průběhu biodegradačního experimentu v prostředí kompostů.

V neposlední řadě by měla být provedena izolace mikroorganismů zodpovědných za rozklad zkoumaných polymerů.

6 MATERIÁLY, ROZTOKY, VYBAVENÍ

6.1 Roztoky

Zásobní roztoky využité k přípravě minerálního média:

Roztok A (KH_2PO_4)

Na přípravu 100 ml roztoku bylo naváženo 0,9 g KH_2PO_4 a doplněno na požadovaný objem destilovanou vodou. Výsledná koncentrace roztoku je $9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Roztok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

Na přípravu 100 ml roztoku bylo naváženo 2,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a doplněno na požadovaný objem destilovanou vodou. Výsledná koncentrace roztoku je $24 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Roztok C ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Na přípravu 100 ml roztoku bylo naváženo 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a doplněno na požadovaný objem destilovanou vodou. Výsledná koncentrace roztoku je $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Roztok D ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Na přípravu 100 ml roztoku bylo naváženo 0,3 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a doplněno na požadovaný objem destilovanou vodou. Výsledná koncentrace roztoku je $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Roztok E ($\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Na přípravu 100 ml roztoku bylo naváženo 1,0 g $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a doplněno na požadovaný objem destilovanou vodou. Výsledná koncentrace roztoku je $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Roztok F (NaCl)

Na přípravu 100 ml roztoku bylo naváženo 5,0 g NaCl a doplněno na požadovaný objem destilovanou vodou. Výsledná koncentrace roztoku je $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Roztok G (NH_4Cl)

Na přípravu 100 ml roztoku bylo naváženo 3,0 g NH_4Cl a doplněno na požadovaný objem destilovanou vodou. Výsledná koncentrace roztoku je $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Roztok stopových prvků:

Na přípravu 1000 ml roztoku se využívá:

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,040 g
H_3BO_3	0,057 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,043 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,037 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,043 g

Příslušné navážky se smíchají a doplní destilovanou H_2O na požadovaný objem.

Minerální médium:

Minerální médium slouží mikroorganismům jako zdroj makrobiogéních, microbiogéních a stopových prvků nezbytných pro správné životní pochody. Rovněž je využíváno ke zvlhčení prostředí v laboratorních podmínkách. Na přípravu 100 ml minerálního média se využije:

Roztok A	2,0 ml
Roztok B	8,0 ml
Roztok C	1,0 ml
Roztok D	1,0 ml
Roztok E	1,0 ml
Roztok F	1,0 ml
Roztok G	1,0 ml
Roztok stopových prvků	0,2 ml

Jednotlivé roztoky se nadávkovaly pomocí mikrodávkovačů a následně byly doplněny destilovanou vodou na požadovaný objem. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 minut.

Minerální médium s roztokem polymerních submikročástic:

Na přípravu 100 ml média se využilo:

Roztok A	2,0 ml
Roztok B	8,0 ml
Roztok C	1,0 ml
Roztok D	1,0 ml
Roztok E	1,0 ml
Roztok F	1,0 ml
Roztok G	1,0 ml
Roztok stopových prvků	0,2 ml
Roztok polymerních submikročástic	20 ml

Jednotlivé roztoky se doplnily destilovanou vodou na požadovaný objem. Vzniklé médium se ihned využilo na přípravu agarů s polymerem. Příprava agarů s polymerem je uvedena v kapitole 6.2 a příprava roztoku polymerních submikročástic je pak uvedena v kapitole 6.3.3.

Fyziologický roztok:

Na přípravu 100 ml fyziologického roztoku bylo naváženo 0,85 g NaCl a doplněno na požadovaný objem destilovanou vodou. Následně se provedla sterilizace v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 minut. Výsledná koncentrace fyziologického roztoku je 8,5 g·l⁻¹.

Suspendační médium:

Suspendační médium se využívá k převedení mikroorganismů např. ze vzorku půdy či kompostu do roztoku. Na přípravu 100 ml suspendačního média se využije:

Fyziologický roztok	50 ml
Destilovaná H ₂ O	50 ml
Na ₄ (P ₂ O ₄)	0,4 g
Tween 80	0,1 g

Vzniklá suspenze se řádně promíchala a nechala se sterilizovat v autoklávu při teplotě 125°C po dobu 30 minut.

6.2 Tuhé živné půdy

Trypron yeast agar (TYA agar)

Trypton yeast agar patří mezi univerzální živnou půdu a využívá se pro kultivaci a následné stanovení celkových počtů mikroorganismů z daného vzorku.

Pro přípravu 100 ml živné půdy se navážilo 2,1 g TYA agaru, který se řádně rozmíchal v 100 ml destilované H₂O a poté se provedla v autoklávu sterilizace při 125 °C po dobu 30 minut. Následně se živná půda nechala ochladnout a v aseptickém boxu se rozlila na Petriho misky.

Glycerol dusičnanový agar (GD agar)

Na přípravu 100 ml živné půdy se navážilo:

Dusičnanový agar	2,45 g
Glycerol	2,0 g
Agar Powder	1,0 g

Všechny složky se smísily a byly doplněny destilovanou H₂O na požadovaný objem. Následně se provedla sterilizace v autoklávu při 125 °C po dobu 30 minut. Po ochladnutí se živná půda rozlila v aseptickém boxu na Petriho misky.

Agar s glukózou a kvasničným extraktem (GKCH agar)

Na přípravu 100 ml živné půdy se využilo:

Glukóza	0,5 g
Kvasniční extrakt	0,5 g
Chloramfenikl	0,02 g
Agar Powder	1,5 g

Všechny složky se řádně smísily, doplnily destilovanou vodou na požadovaný objem a provedla se v autoklávu sterilizace při 125 °C po dobu 30 minut. Po ochladnutí se živná půda rozlila v aseptickém boxu na Petriho misky.

Agar s polymerem

Na přípravu 100 ml živné půdy bylo naváženo 2,2 g čistého agaru Powder, který byl řádně rozmíchán v 100 ml minerálního média s příslušným roztokem polymerních submikročásteček. Následně byla provedena sterilizace při teplotě 125 °C po dobu 30 minut. Po ochladnutí v laminárním boxu se živná půda rozlila na Petriho misky a nechala ztuhnout.

V rámci diplomové práce jsme připravili 4 agary s polymery PBAT, PLA_N, PLA_V a Ecoflex, kdy při přípravě 100 ml minerálního média se přidalo 20 ml roztoku submikročásteček PBAT, PLA_N, PLA_V nebo Ecoflex.

6.3 Zkoušené polymerní materiály

PBAT byl poskytnut partnerským pracovištěm na Blaise Pascal Univerzity ve Francii dále jen BPU (výrobce IRe Chemical Ltd. Korea).

Ecoflex byl dodán ve formě bílých granulí firmou BASF spol. s.r.o.

Vysokomolekulární PLA dále jen PLA_V byl dodán firmou NatreWorks. Hodnota M_w tohoto produktu je asi 100 kg/mol.

Nízkomolekulární PLA dále jen PLA_N byl syntetizován v laboratoři Centra polymerních materiálů ve Zlíně ve skupině vedené ing. Vladimírem Sedlaříkem, Ph.D. Hodnota M_w tohoto produktu je asi 20 kg/mol.

Z dodaných polymerních materiálů byly ing. Petrem Stloukalem připraveny různé zkoušené formy.

6.3.1 Příprava fóliových vzorků podrobených urychlenému stárnutí v zařízení

SEPAP 12/24

Z dodaných polymerních materiálů PLA V a Ecoflexu se připravily fólie o tloušťce cca 100 μm . Tyto fólie se připravily lisováním na etážovém lisu při pracovní teplotě 140 °C.

Následně byly vyrobené fólie degradovány v zařízení SEPAP 12/24. V tomto zařízení byly vzorky vystaveny teplotě 60 °C a intenzivnímu záření, které mělo simulovat vystavení fólií na slunci. Přístroj je kalibrován tak, že 100 hodin ozařování odpovídá 3 měsíčnímu vystavení fólií na slunci v evropských zeměpisných šířkách v období od března do října. V přístroji se využívá podobné spektrum záření jako má sluneční záření dopadající na zemský povrch.

Fólie ecoflexu byly ozařované po dobu 0, 10, 25 a 100 hodin a byly označené příslušným kódem Eco0F, Eco10F, Eco25F a Eco100F.

Fólie PLA_V byly ozařované po dobu 0, 25, 50 hodin a byly označené příslušným kódem PLA0F, PLA25F, PLA50F.

Tato forma vzorků byla připravená ing. Petrem Stloukalem v průběhu jeho pracovního pobytu na BPU.

Takto připravené vzorky folií se na našem pracovišti před vložením do biometrických láhví nastříhaly za aseptických podmínek v laminárním boxu na kousky o rozměrech cca 0,5cm x 0,5cm.

6.3.2 Příprava vzorků deponovaných na perlit po úpravě chloroformem

Fotodegradované fóliové vzorky jejichž příprava je uvedena v předchozí kapitole, byly rozpouštěny v chloroformu a deponovány na povrch perlitu za účelem zvětšení specifického povrchu.

Do biometrických láhví se navázilo příslušné množství vzorku a bylo přidáno 10 ml chloroformu. Láhve se uzavřely a byly ponechány na míchačce po dobu 2 hodin. Během této doby docházelo k rozpouštění rozpustného podílu a nabobtnání případného zasítovaného gelu. Následně bylo naváženo příslušné množství perlitu, obsah byl promíchán a chloroform byl vystřipován proudem vzduchu. Takto připravené láhve se řádně označily příslušným kódem a byly využity v biodegradačních experimentech.

Láhve s polymerem ecoflex jsme označili; Eco0R, Eco10R, Eco25R, Eco100R.

Láhve s polymerem PLA_V jsme označili; PLA0R, PLA25R, PLA50R.

6.3.3 Příprava roztoků polymerních submikročástic

Roztoky polymerní submikročástic se připravovali pro všechny druhy zkoumaných polyesterů a to tedy pro PBAT, Ecoflex, PLA_N a PLA_V.

Dodaný komerční materiál PBAT se nechal rozpustit v chloroformu. Příslušná navážka polymeru byla taková, aby výsledný roztoky měly koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Takto připravené roztoky se mísil s 0,5 % roztokem PVA v poměru 1:4. Vzniklá směs se nalila do válce a nechala 5 minut homogenizovat pomocí homogenizátoru a poté se ještě 5 minut působilo ultrazvukem.

Homogenizovaná směs se následně přelila do odsávací baňky, která se uzavřela. Za sníženého tlaku a současného míchání, docházelo k rychlému odpaření rozpouštědla skrz vývjevu. Po odstranění veškerého rozpouštědla, byl roztok podroben dvojnásobné centrifugaci.

Obdobným způsobem se připravily roztoky submikročásteč polymerů PLA_N, PLA_V a Ecoflex.

6.3.4 Příprava vzorků ve formě prášku

Dodaný komerční materiál PBAT byl rozpuštěn v chloroformu za vzniku roztoku o koncentraci $0,050 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Do tohoto chloroformového roztoku byl z byrety přikapáván etanol v dvojnásobném množství. Vzniklá sraženina se přefiltrovala a umístila do digestoře, kde se nechala 24 hodin stát za účelem odpaření rozpouštědla a vysušení vzniklého prášku.

Obdobným způsobem se připravily i práškové formy polyesterů Ecoflex, PLA_N a PLA_V.

6.4 Ostatní materiály použité v biodegradačních experimentech

Substrát vyzrálého kompostu byl připraven smíšením zahradního kompostu s nespecifickým složením.

Mikrokrytalická celulóza (Sigma) byla v biodegradačních testech používána jako referenční látka.

Perlit vyroben společnosti AGRO CS, a.s. pod názvem Agroperlit, byl využíván v biodegradačních experimentech jako podpurný materiál (pórovitost směsi, zadržování vlhkosti, podpurný materiál).

6.5 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy Kern 770, Německo
- Kulový mlýnek MM 301 Retsch, Německo
- Centrifuga Rotanda 460 R
- Laboratorní sterilizátor LAM-3-20-MCS-J Sonoclav, Německo
- Elektrická laboratorní pec LH09MT
- Třepačka Promax 1020, Německo
- Váhy Kern EW 1500-2M, Německo
- Laminární box Telstar BIO-II-A, Španělsko
- Minitřepačka MS1 IKA^R, Brazílie
- Plynový chromatogram Agilent 7890, USA
- Elektrická sušárna UM 100 Memmert
- Mikrodávkače Biohit, Finsko
- Plynotěsná injekční stříkačka Hamilton 100 μ l, USA
- PCR Piko Thermal Cycler Finnzymes
- pH metr InoLab pH 730

V rámci práce bylo využíváno běžné laboratorní sklo a pomůcky.

7 METODIKA

7.1 Charakteristika substrátu

U vyzrálého kompostu jsme sledovali jednak fyzikálně-chemické parametry jako sušinu, spalitelný podíl a pH a dále mikrobiální oživení.

7.1.1 Stanovení sušiny kompostu

Na řádně umytou, vysušenou a zváženou misku s přesností $\pm 0,00001$ g se navázil kompost. Navážka kompostu byla rovněž provedena na analytické váze s přesností $\pm 0,00001$ g. Miska s kompostem se vložila do elektrické trouby a nechala sušit při 105 °C do konstantní hmotnosti. Po vysušení se miska vložila do exsikátoru, nechala se zhládnout na laboratorní teplotu a poté byla zvážena. Výpočtem dle rovnice 4 se vypočetla sušina kompostu v procentech. Stanovení se provedlo 3x vedle sebe.

$$\left. \begin{aligned} S_1 &= \frac{m_{MVK1} - m_{M1}}{m_{MK1} - m_{M1}} * 100 \\ S_2 &= \frac{m_{MVK2} - m_{M2}}{m_{MK2} - m_{M2}} * 100 \\ S_3 &= \frac{m_{MVK3} - m_{M3}}{m_{MK3} - m_{M3}} * 100 \end{aligned} \right\} S_\phi = \frac{S_1 + S_2 + S_3}{3} \quad (4)$$

Kde:

$S_{1,2,3}$	dílčí hodnoty sušin s paralelních stanovení	[%]
S_ϕ	průměrná hodnota sušiny kompostu	[%]
$m_{M1,2,3}$	hmotnosti prázdných dílčích misek	[mg]
$m_{MK1,2,3}$	hmotnosti dílčích misek s naváženým kompostem	[mg]
$m_{MVK1,2,3}$	hmotnosti dílčích misek s naváženým vysušeným kompostem	[mg]

7.1.2 Spalitelný podíl kompostu

Do vyžíhaného a zváženého kelímku se navážil kompost s přesností $\pm 0,00001\text{g}$. Nejdříve se u takto naváženého vzorku stanovila sušina kompostu, jejichž provedení je uvedeno v předchozí kapitole. Po zvážení sušiny se kelímek s vysušeným kompostem vložil do muflonové peci a nechal se žíhat při teplotě $550\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 2 hodin. Po vyžíhání se kelímek vložil do exsikátoru, nechal se zhládnout na laboratorní teplotu a poté byl zvážen. Výpočtem dle rovnice 5 se vypočetla sušina kompostu v procentech. Stanovení se provedlo 3x vedle sebe.

$$\left. \begin{aligned} S_{P1} &= \frac{m_{VK1} - m_{SK1}}{m_{VK1} - m_{K1}} * 100 \\ S_{P2} &= \frac{m_{VK2} - m_{SK2}}{m_{VK2} - m_{K2}} * 100 \\ S_{P3} &= \frac{m_{VK3} - m_{SK3}}{m_{VK3} - m_{K3}} * 100 \end{aligned} \right\} S_{P\phi} = \frac{S_{P1} + S_{P2} + S_{P3}}{3} \quad (5)$$

Kde:

$S_{P1,2,3}$	dílčí hodnoty spalitelného podílu s paralelních kelímku	[%]
$S_{P\phi}$	průměrná hodnota spalitelného podílu	
$m_{K1,2,3}$	hmotnosti prázdných kelímků	[mg]
$m_{VK1,2,3}$	hmotnosti dílčích kelímků s vysušeným kompostem	[mg]
$m_{SK1,2,3}$	hmotnosti dílčích kelímku se spáleným kompostem	[mg]

7.1.3 Stanovení pH kompostu

Do kádinky bylo naváženo 10 g kompostu a přidáno 50 ml demineralizované H_2O . Směs se pomocí elektromagnetického míchadla nechala míchat a pomocí pH metru InoLab 730 bylo změřeno pH.

7.1.4 Mikrobiální rozbor kompostu

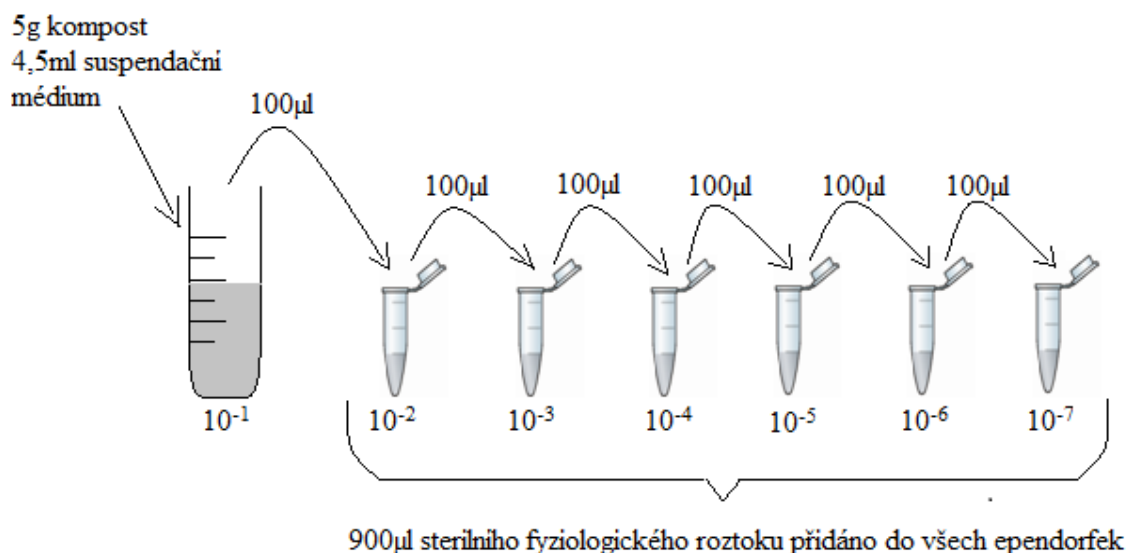
Mikrobiální rozbor kompostu byl zaměřen na sledování řádových počtů termofilních bakterií, aktinomycét, vláknitých plísní a degradérů schopných rozkládat zkoumané polyestery. Tomuto rozboru byl podroben neadaptovaný i adaptovaný vyzrálý kompost na daný polyester.

Praktické provedení mikrobiálního rozboru na našem pracovišti spočívalo v následujících krocích:

Výtřep kompostu a příprava desetinného ředění

Mikroorganismy vyskytující se v kompostu byly nejprve uvolněny a převedeny do vodného suspenzačního média. To bylo provedeno tak, že do sterilní zkumavky se navážilo 0,5 g kompostu s přesností $\pm 0,01$ g a přidalo se pipetou 4,5 ml suspenzačního média. Zkumavka se následně nechala intenzivně třepat 15 minut, čímž došlo k požadovanému uvolnění mikroorganismů s pevných částic kompostu do roztoku. Takto připravená zkumavka se nechala sedimentovat a supernatant se využil k přípravě desetinného ředění, přičemž je nutno si uvědomit, že již při tomto výtřepu vzniklo ředění 10^{-1} (10 x naředěný vzorek kompostu).

V rámci práce jsme využili desetinné ředění v rozmezí 10^{-1} až 10^{-7} , jehož princip přípravy je znázorněn na obr. 6. Do čisté sterilní ependorfy bylo nadávkováno 900 μ l sterilního fyziologického roztoku a 100 μ l supernatantu, čímž vzniklo ředění 10^{-2} . Do další sterilní ependorfy bylo nadávkováno 900 μ l sterilního fyziologického roztoku a 100 μ l roztoku s ependorfy o ředění 10^{-2} , čímž vzniklo ředění 10^{-3} . Stejným postupem přípravy se pokračovalo až do vzniku ředění 10^{-7} .



Obr. 6 schematické znázornění desetinného ředění

Očkování živných půd a inkubace

Vzniklé desetinné ředění se očkovalo na kultivační Petriho misky s živnými půdami, jejichž příprava je uvedena v kapitole 6.2. V rámci práce se na všechny misky očkoval stejný objem inokula a to 100 μ l a vždy se pro každé ředění připravily dvě paralelní misky.

Misky s TYA agarem se využily pro stanovení celkových počtů termofilních bakterií. Na tyto kultivační misky bylo očkováno inokulum o ředění v rozmezí 10^{-4} - 10^{-7} .

Misky s GD agarem se využily pro stanovení termofilních aktinomycét. Na tyto kultivační misky bylo očkováno inokulum o ředění v rozmezí 10^{-1} - 10^{-3} .

Misky s GKCH agarem byly využity pro stanovení vláknitých plísní. Na tyto kultivační misky bylo očkováno inokulum o ředění v rozmezí 10^{-1} - 10^{-3} .

Misky s polymerním agarem byly využity pro stanovení mikroorganismů schopných rozkládat daný polyester. Na tyto kultivační misky bylo očkováno inokulum o ředění v rozmezí 10^{-3} - 10^{-6} .

Inkubace

Všechny naočkované misky byly inkubovány bez přístupu světla v termostatu udržujícího teplotu na 58 °C. Misky s TYA agarem byly inkubovány 3 dny a ostatní misky 7 dnů.

Vyhodnocení počtů

Během kultivace rostou mikroorganismy na živné půdě ve formě kolonií. Výsledky se pak obecně uvádějí jako počet jednotek tvořících kolonie na jeden gram či ml vzorku (CFU/g nebo CFU/ml). V rámci diplomové práce jsme vyjádřili počty kolonií jako CFU/g sušiny vzorku. Princip přepočtu CFU/g sušiny vzorku pro Petriho misky, na nichž bylo očkováno 100 μ l inokula o ředění 10^{-1} je následující:

Po inkubaci se odečtou počty kolonií s obou paralelních misek a vypočte se průměrná hodnota. Pro jednoduchost si můžeme myslet, že průměrná hodnota je 100 kolonií. Nyní se musí uvážit ředění. Index 10^{-1} značí, že vzorek je 10x naředěn. Jelikož se očkuje na misku 0,1ml inokula (~0,1g inokula) a počty kolonií v práci vyjadřujeme na 1 gram sušiny vzorku, pak na misce vzniká ředění 10^{-2} , což značí, že vzorek je naředěn 100x. Když se pak zjištěné počty kolonií vynásobí ředěním, dostaneme skutečnou hodnotu kolonií v 1 gramu vzorku. Pro tento demonstrativní příklad je tedy skutečná hodnota 10 000 kolonií v 1 gramu vzorku. Poslední věc, kterou musíme do výpočtu zahrnout, je přepočet kolonií na sušinu vzorku. Pro jednoduchost si můžeme myslet, že sušina vzorku je 50 %, pak tento přepo-

čet nabude tvaru 10 000/0,50. Skutečná hodnota počtů kolonií pro náš demonstrativní příklad je 20 000 CFU/g sušiny vzorku, což v práci vyjadřujeme tvarem $2,0 \cdot 10^4$ CFU/g sušiny vzorku.

7.2 Sledování aerobní degradace polymerů v prostředí kompostu pomocí respirometrického systému

7.2.1 Biometrická láhev

Jako bioreaktor byla využita 500 ml skleněná láhev o objemu plynné fáze 580 ml (obr). Každá biometrická láhev měla uzávěr s otvorem opatřeným septem pro odběr vnitřní atmosféry. Před zahájením pokusu byly láhve řádně umyty a nechaly se sterilizovat v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 minut. Uzávěry se sterilizovaly UV zářením v aseptickém laminárním boxu po dobu 30 minut.

7.2.2 Příprava biometrických láhví k biodegradačním pokusům

Do řádně umytých a označených biometrických láhví se přidávala zkoušená směs. Tato směs se povětšinou skládala ze 4 komponentů:

- 0,1 – 0,3 g testovaného polyesteru nebo mikrokrytalické celulózy
- 5 g vyzrálého kompostu
- 7 g perlitu
- 3 – 5 ml minerálního média

Navážky testovaných polyesterů a celulózy byly provedeny na analytické váze s přesností $\pm 0,00001$ g a navážka vyzrálého kompostu a perlitu na váze s přesností $\pm 0,01$ g. Minerální médium bylo přidáváno pomocí mikrodávkače.

V rámci všech biodegradačních pokusů se připravily vždy 3 paralelní láhve se zkoumaným polyesterem, 1 – 3 paralelní láhve s referenčním materiálem pro pozitivní zkoušku (mikrokrytalická celulóza) a 4 – 5 paralelních láhví bez přidaného vzorku, pro sledování respirační aktivity samotného kompostu (slepý pokus). Během pokusu byly všechny láhve umístěny v termostatu, který udržoval teplotu na 58 °C.

7.2.3 Přívod vzduchu

Biometrické láhve musí být během pokusu plynotěsně uzavřeny, aby mohlo být detekováno množství vyvinutého CO_2 z polymerního materiálu. Jak již bylo několikrát zmíněno, tato mineralizace uhlíku je prováděná aerobními mikroorganismy, které při této činnosti spotřebovávají atmosférický kyslík. Jelikož testy probíhají mnoho dní, musí se hladina kyslíku v láhvích obnovovat, aby nedošlo k jeho poklesu na tokovou míru, která by znamenala smrt těchto organismů.

Na našem pracovišti byl přívod vzduchu zajištěn pomocí čerpadla, které jej vhánělo do systému. Vzduch se nejprve probublával v 5M NaOH, kde docházelo k odstraňování atmosférického CO_2 dle rovnice 2. Dále vzduch procházel skrz láhev s roztokem 0,25M $\text{Ba}(\text{OH})_2$, která byla zapojena do systému pro případ, že by došlo k vyčerpání roztoku NaOH (vyčerpání roztoku by znamenalo vznik bílé sraženiny viz rovnice 3) a skrz láhev s destilovanou vodou, kde docházelo ke zvlhčení vzduchu. Takto upravený vzduch se přiváděl pomocí silikonové hadičky do biometrické láhve.

7.2.4 Hodnocení aerobní biodegradace pomocí plynové chromatografie

Hodnocení množství vyvinutého CO_2 a spotřebovaného O_2 v biometrické láhvi, bylo prováděno metodou plynové chromatografie. Množství vyprodukovaného CO_2 v láhvi nám posloužilo pro stanovení stupně biodegradace zkoumaného polyesteru, který zde byl jediným přidaným zdrojem organického uhlíku. Množství spotřebovaného kyslíku sloužilo pro posouzení, zdali mikroorganismy v láhvích netrpí jeho nedostatkem.

V našem případě byl pro analýzu množství CO_2 a O_2 využit GC Agilent 7809. V termostatu tohoto GC jsou umístěny 2 skleněné náplňové kolony o délce 1,829 m, které jsou zapojeny do série. Na první koloně se stacionární fázi Porapak (velikost částic 80/100 MESH) byl stanovován CO_2 a na druhé koloně s molekulovým sítem 5A (velikost částic 60/80 MESH) byl stanoven O_2 .

Po nastříknutí vzorků byly zapojeny obě kolony, poté v čase 0,9 minut došlo k přepnutí ventilu pouze na 1. kolonu a v čase 2,0 minuty došlo k přepnutí ventilu na 2. kolonu. K přepínání ventilu mezi kolonami byl využit N_2 , který byl do GC přiváděn z láhve se stlačeným vzduchem. K detekci analyzovaných složek byl použit tepelně vodivostní detektor (TCD) a jako nosný plyn bylo využito He čistoty 4.6. Základní pracovní parametry jsou uvedeny v tabulce 2.

Vyhodnocování signálu bylo prováděno pomocí programu GC ChemStation metodou přímé kalibrace. Analýzou směsného syntetického plynu Linde Technoplyn, byla sestavena kalibrační křivka pro stanovení obsahu CO₂. Pro stanovení obsahu O₂ byla kalibrační křivka sestavena s obsahem O₂ ve vzduchu.

Tab. 3 Parametry měření na GC Agilent 7890 [25]

Parametry		Analýza
Teplota (°C)	Injektor	200
	Termostat	60
	TCD detektor	250
Nosný plyn	Typ	He
	Průtok (ml*min ⁻¹)	53
Přepínání ventilu	Čas (min)	0,9
		2,0
	Plyn	N ₂ , vzduch

7.2.5 Biodegradační experiment

Všechny biodegradační testy provedené v rámci diplomové práce měly podobný průběh. Do čistých biometrických láhví se přidávala zkoušená směs. Láhve se řádně označily, uzavřely a vložily do inkubátoru, kde byla udržována teplota 58 °C. V předem určených intervalech se provedl odběr a analýza atmosféry uvnitř láhví. Před odběrem atmosféry se láhev nechala zchládnout na laboratorní teplotu (asi 20 minut), mírně se protřepala a poté se přes septum pomocí plynotěsné injekční stříkačky Hamilton odebralo 100 µl atmosféry a provedla se analýza na plynovém chromatografu (Agilent 7890), kde byl vyhodnocen obsah CO₂ a O₂.

Po odběru se láhev obvykle otevřela, a nechala se provzdušňovat za účelem obnovy hladiny kyslíku a vystripování CO₂ vyprodukovaného mikroorganismy. Realizace přívodu vzduchu do bioreaktoru je popsána v kapitole 7.1.3.

Před zahájením provzdušňování byla vždy provedena jednoduchá zkouška, pro ověření a regulaci přívodu vzduchu. Tato zkouška byla realizována tak, že vyústění silikonové hadičky bylo ponořeno do kádinky s destilovanou vodou a tvořící se bublinky byly indikací, že systém přívodu vzduchu skutečně funguje. Rovněž se pomocí této zkoušky provedla pomocí ventilu regulace rychlosti proudění vzduchu. Po provzdušnění se láhev uzavřela a vložila zpět do inkubátoru.

7.2.6 Zpracování naměřených dat

Zpracování naměřených dat je využito z [25]

Denní produkce uhlíku ve formě CO₂

$$m_{(d)C} = \frac{M_C * P}{R * T} * \frac{V_g}{1000} * w(CO_2) * \frac{V_{St}}{S_{St}} * \frac{S_{Vz}}{V_{Vz}} * 1000 \quad (6)$$

Kde:

$m_{(d)C}$	množství vyprodukovaného uhlíku ve formě CO ₂	[mg]
M_C	atomární hmotnost uhlíku	[g*mol ⁻¹]
p	tlak v okamžiku provzdušňování	[kPa]
R	molární plynová konstanta	[J*K ⁻¹ *mol ⁻¹]
T	termodynamická teplota v okamžiku provzdušňování	[K ⁻¹]
V_g	plynný objem biometrické láhve	[ml]
$V_{St, Vz}$	dávkovaný objem plynné fáze standardu respektive vzorku do plynového chromatografu	[μl]
$S_{St, Vz}$	signál detektoru u standardu respektive vzorku	[μV*s]
$w(CO_2)$	množství CO ₂ v kalibračním plynu	[%]

Kumulativní produkce uhlíku ve formě CO₂

Pokud nedochází k provzdušňování testovacích láhvi, je kumulativní produkce rovna produkci denní. Pokud je systém provzdušňován je kumulativní produkce uhlíku ve formě CO₂ dána vztahem:

$$m_{(k)C}(2) = m_{(k)C}(1) + m_{(d)C}(2) \quad (7)$$

Kde:

$m_{(k)C}(2)$	kumulativní produkce uhlíku z aktuálního měření	[mg]
$m_{(k)C}(1)$	kumulativní produkce uhlíku z předchozího měření	[mg]
$m_{(d)C}(2)$	denní produkce uhlíku z aktuálního měření	[mg]

Substrátová produkce uhlíku ve formě CO₂

Jedná se o kumulativní produkci ze systémů se vzorky sníženou o produkci uhlíku ze slepých pokusů, tj. o produkci ze samotného vyzrálého kompostu.

$$n_{(s)C} = m_{(k)C Vz} - m_{(k)C Sl} \quad (8)$$

Kde:

$n_{(s)C}$	substrátová produkce uhlíku ve formě CO ₂	[mg]
$m_{(k)C Vz}$	kumulativní produkce uhlíku z láhve se vzorkem	[mg]
$m_{(k)C Sl}$	kumulativní produkce uhlíku z láhve bez vzorku	[mg]

Procentuelní mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO₂

$$D_C = \frac{n_{(s)C}}{m_C * TC} \quad (9)$$

Kde:

D_C	procentuelní mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO ₂	[%]
$n_{(s)C}$	substrátová produkce uhlíku ve formě CO ₂	[mg]
m_C	hmotnost testovaného materiálu	[mg]
TC	obsah celkového uhlíku v testovaném materiálu	[%]

Procentuelní obsah O₂ v láhvi

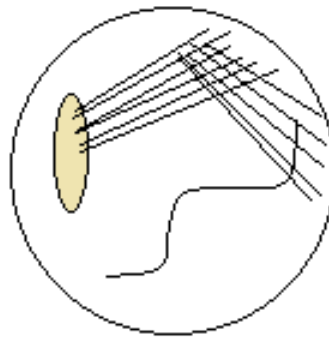
$$\%O_2 = \frac{w(O_2) * S_{Vz} * \frac{V_{St}}{V_{Vz}}}{S_{St}} \quad (10)$$

Kde:

$\%O_2$	aktuální procento O ₂ obsaženého v láhvi	[%]
$w(O_2)$	obsah kyslíku ve vzduchu	[%]

7.3 Isolace a identifikace mikroorganismů schopných rozkládat zkoumaný polymer**7.3.1 Isolace mikroorganismů**

Mikroorganismy rostoucí na pevných živných půdách, jsou často kontaminované i jinou skupinou organismů, které by mikrobiální identifikaci rušilo. Proto se v rutinních případech používá metoda tzv. křížového roztěru. Při této metodě se odebere domnělá skupina mikroorganismů pomocí vyžihané kličky a nanese se na čistou Petriho misku s pevnou živnou půdou, způsobem jež je zobrazen na obr 7.



Obr. 7 Křížový roztěr

Na našem pracovišti byla přeočkovávána biomasa s misek s polymerním agarem. Nejprve jsme přeočkovali kulturu na misku s TYA agarem a po inkubaci jsme odebrali s TYA agaru čistou kulturu, kterou jsme naočkovali zpět na čistou misku s polymerním agarem. Všechny úkony byly provedeny v laminárním aseptickém boxu.

7.3.2 Identifikace mikroorganismů

Na našem pracovišti byla identifikace prováděna pomocí molekulárně biologických postupů srovnáváním sekvencí nukleotidů v genu pro16S rRNA. Je nutno zmínit že, tato část práce byla realizována ve spolupráci s ing. Lucií Husárovou, a proto je sled provedených kroků identifikace uveden pouze z informačních důvodů a je velmi zkrácen, neboť problematika vyžaduje širší znalosti, a v rámci diplomové práce tvoří jen minoritní podíl.

Identifikace mikroorganismu pomocí srovnávání sekvencí nukleotidů v genu 16S rRNA byla prováděna následujícími kroky:

- a) Isolace DNA pomocí Power SoilTM DNA Isolation Kit
- b) Amplifikace vymezeného úseku DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR)
- c) Kontrola produktů PCR gelovou elektroforézou
- d) Purifikace amplifikované DNA pomocí QIA quick PCR Purification Kit
- e) Sekvenace produktů amplifikované DNA (provedeno na Biologické centru AV, České Budějovice).
- f) Porovnání zjištěných sekvencí nukleotidů s údaji v databázi (aplikace BLAST)

III. VÝSLEDKY A DISKUZE

8 CHARAKTERISTIKA NEADAPTOVANÉHO KOMPOSTU

U používaného vyzralého kompostu jsme se snažili zjistit jeho fyzikálně-chemické vlastnosti a mikrobiální diverzitu. Spalitelný podíl a hodnotu pH jsem stanovili pouze jednou a to dne 3.2.2011. Hodnota pH kompostu byla 7,04 a průměrná hodnota spalitelného podílu kompostu vypočtena dle rovnice 5 vyšla 70%.

Sušinu kompostu jsme stanovili vždy před zahájením nového biodegradačního pokusu k ověření, zda-li se sušina výrazně nemění s dobou skladování a zda-li má kompost vhodný obsah volné vody pro mikroorganismy. Hodnoty zjištěných sušin jsou uvedeny v Tab. 4.

Můžeme vidět, že sušina kompostu se výrazně neměnila s dobou skladování a její hodnota je v rozmezí 50 – 60% což odpovídá standartu dle ISO 14855 a kompost je tak z tohoto pohledu v hodný k provádění standardních biodegradačních testů.

Tab. 4 Hodnoty naměřených sušin u neadaptovaného kompostu

	S₁ (%)	S₂ (%)	S₃ (%)	S_φ (%)
04.06.2010	55,19	55,07	54,82	55,03
27.10.2010	54,69	54,42	54,44	54,52
03.02.2011	57,02	57,07	56,20	56,76

Z hlediska mikrobiálního oživení používaného vyzralého kompostu, jsme se snažili zjistit řadové počty termofilních bakterií respektive bakterií rostoucích na TYA agyru, aktinomycét, vláknitých plísní a mikroorganismů schopných rozkládat zkoumané polyestery v něm obsažených.

Mikroorganismy přítomné v kompostu byly nejprve převedeny do suspenzačního média, které se následně využilo na přípravu desetinného ředění. Na připravené kultivační misky se pak očkovalo inokulum o příslušném ředění. Naočkované misky s TYA agarem pro stanovení celkových počtů bakterií, se nechaly inkubovat 3 dny a misky pro stanovení aktinomycét, vláknitých plísní a mikroorganismů rozkládajících daný polyester 7 dnů. Inkubace proběhla ve tmě při teplotě 58°C. Praktické provedení je podrobně popsáno v kapitole 7.1.4. Po inkubaci se provedl odečet narostlých kolonií mikroorganismů na miskách s příslušným agarem. Zjištěné počty mikroorganismů jsou pak uvedeny v tabulce 2, kde

jsou vyjádřeny jako počty kolonií na 1 gram sušiny vzorku kompostu (CFU/g sušiny vzorku). Při přepočtu se využila hodnota průměrné sušiny kompostu stanovené 03.02.2011.

Tab. 5 Počty kolonií sledovaných mikroorganismů u neadaptovaného kompostu očkovaného na kultivační misky dne 3.2.2011

	CFU/g sušiny vzorku						
	T.B.	T.A.	V.P.	D.PBAT	D.ECO	D.PLA_N	D.PLA_V
N. Kompost 03.02.2011	$3,8 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^4$	0	$1,7 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$9,6 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^5$

T.B., termofilní bakterie kultivované na TAY agaru; T.A., termofilní aktinomycety kultivované na GD agaru; V.P., vláknité plísňe kultivované na GKCH agaru; D.PBAT, degraděři kultivovaní na agaru s polymerem PBAT; D.ECO, degraděři kultivovaní na agaru s polymerem Ecoflex; D.PLA_N, degraděři kultivovaní na agaru s nízkomolekulárním PLA polymerem; D.PLA_V, degraděři kultivovaní na agaru s vysokomolekulárním PLA polymerem; N. Kompost 03.02.2011, neadaptovaný kompost očkovaný na misky v uvedený den.

9 SLEDOVANÍ VLIVU FOTODEGRADOVANÉHO VZORKU NA BIODEGRADABILITU

Z vybraných polymerů se připravily fólie o tloušťce 100 μm a ty se následně nechaly podrobit urychlenému stárnutí v zařízení SEPAP 12/24. V tomto zařízení jsou fólie vystaveny intenzivnímu záření, které simuluje podmínky vystavení fólií na slunci. Bylo zjištěno, že během ozáření dochází u vzorku Ecoflex především k síťování a u vzorku PLA především ke štěpení řetězce. Pro námi ozářené fólie byl tento fakt ověřen reologickými testy a také rozpouštěním fólií v chloroformu. Jestliže byl polyester po působení záření respektive UV záření zesíťovaný, potom se v chloroformu nerozpustil úplně a zanechal určitý podíl nerozpustného zbytku ve formě gelu viz. tabulka 5. Tato forma vzorků fólií byla připravována ing. Petrem Sloukalem na jeho pracovním pobytu na partnerském pracovišti BPU. Rovněž i hodnoty v tabulce 5 byly obdrženy od ing. Petra Stloukala.

Základním cílem experimentu provedeného na našem pracovišti, bylo prozkoumání, zdali ozářené vzorky nebudou ovlivňovat rychlost jejich rozkladu v prostředí kompostu.

Tab. 6 hodnoty vzniklých gelových frakcí vzorků Ecoflex ozářených 10, 25, 100 hodin po přidavku chloroformu

	Navážka fólie		Hmotnost vzniklého gelu		% gelové frakce		ϕ gelové frakce
	(g)		(g)		(%)		(%)
Eco10F	0,1008	0,1030	0,0081	0,0077	8,03	7,48	7,76
Eco25F	0,1009	0,1028	0,0539	0,0552	53,41	53,70	53,56
Eco100F	0,1008	0,1054	0,0788	0,0813	78,17	77,13	77,65

9.1 Vliv fotodegradace na biodegradaci materiálu Ecoflex

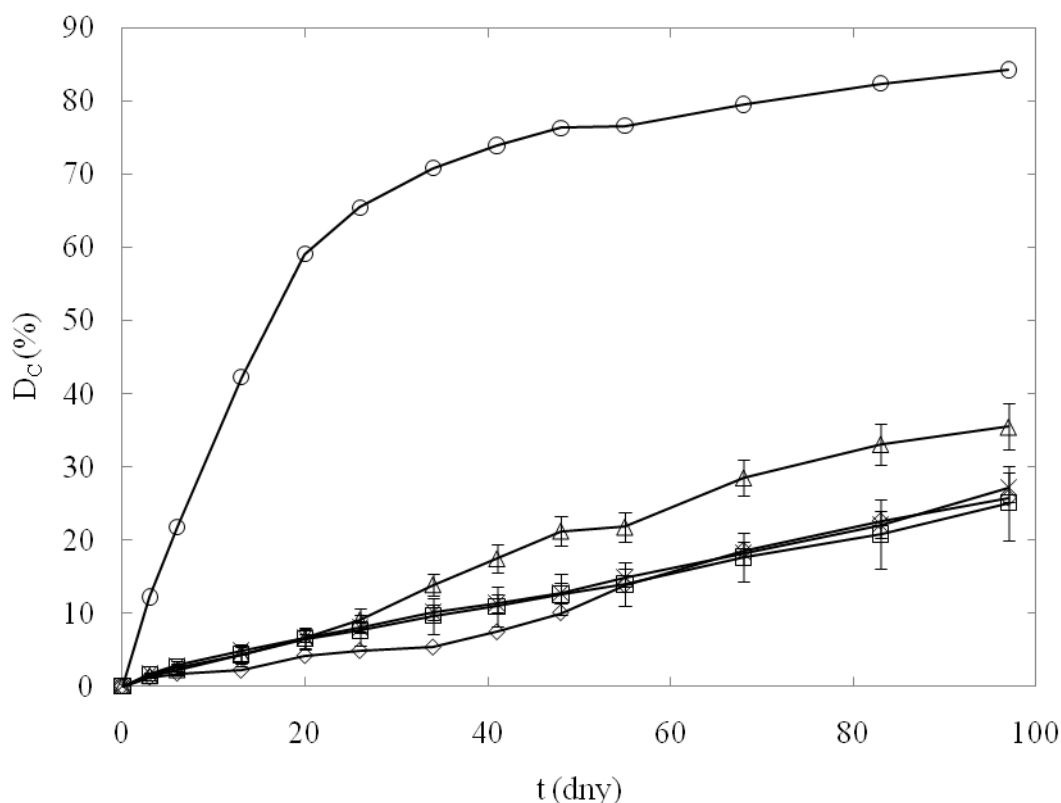
V rámci tohoto pokusu se pracovalo se vzorky Ecoflex ve formě fólií, které byly ozářené v zařízení SEPAP po dobu 0, 25, 50 a 100 hodin, díky čemuž došlo k síťování vzorku. Předpokládalo se, že fólie ozářena delší dobu, se bude v prostředí kompostu rozkládat pomaleji, než fólie ozářená kratší dobu, protože je více zasíťována a mikroorganismy by tak mohly mít horší přístup k volným hydrolyzovatelným vazbám. Rovněž se předpokládalo, že vzorky ve formě fólií mající poměrně malý specifický povrch se budou v prostředí

kompostu rozkládat pomalu. Proto se připravily i biometrické láhve, do kterých se navážilo 200 mg vzorků a bylo přidáno 10 ml rozpouštědla v podobě chloroformu a takto byly vzorky třepány. Přitom bylo možno pozorovat, že vzorky neozářené se rozpustily úplně, vzorky ozářené 10 hodin se rozpustily téměř úplně a zanechaly jen malý nerozpustný zbytek, kdežto fólie ozářené 25 a 100 hodin se z větší části nerozpustily. Nerozpuštěné fólie účinkem chloroformu pouze výrazně nabobtnaly a zprůhlednily, avšak zachovaly svůj tvar. Tím se potvrdil fakt, že u fólií ecoflex působením UV záření docházelo především k síťování. Pokud byl poté chloroform vystripován, nevrátili se nabobtnalé fólie do své původní formy, ale materiál nabyl houbovitého charakteru s několikanásobně větší tloušťkou oproti původní fólii, čímž došlo k zamyšlenému zvětšení povrchu vzorku.

V rámci tohoto experimentu se připravily vždy 3 paralelní láhve s daným vzorkem. Do těchto láhví se přidaly vždy 4 komponenty a to: 0,2 g vzorku, 5 g kompostu, 7 g perlitu a 5 ml minerálního média. Dále se připravily 4 paralelní láhve bez vzorku a 1 láhve s mikrokrytalickou celulózu. Biometrické láhve se vzorky ve formě fólií a se vzorky po úpravě chloroformu deponovanými na perlit byly měřeny současně a celý experiment trval 97 dnů. Pro lepší orientaci jsme sestrojili zvláště grafy odpovídající vzorkům ve formě fólií a vzorkům po úpravě chloroformem.

Vzorek ve formě fólií

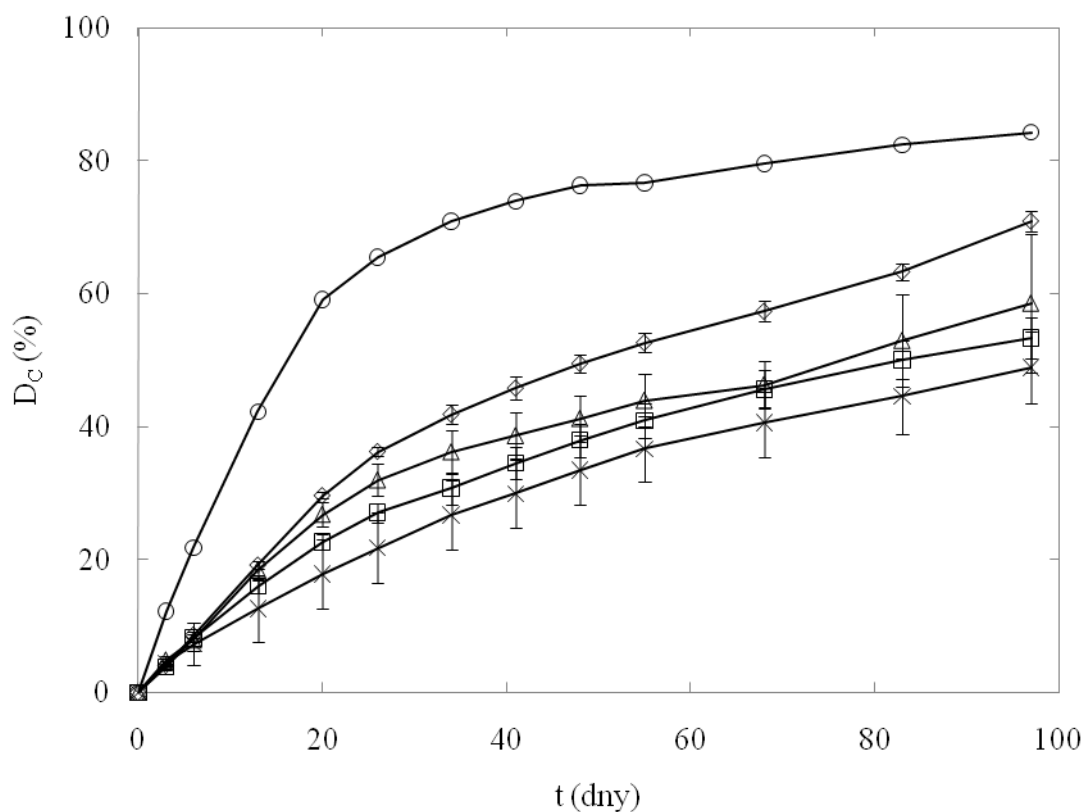
Na obr. 6 je znázorněná degradace polymerů ecoflex ve formě fólií s různou dobou ozáření. Lze pozorovat, že tato forma vzorků se rozkládala poměrně pomalu a za 97 dní dosáhla hodnot od 25 do 35%. Z tohoto grafu lze také vypožorovat, že všechny typy fóliových vzorků vykazovaly na začátku testu prakticky stejnou rychlost mineralizace a to až do 25 dne inkubace, od této doby se o něco rychleji rozkládala 100 hodin ozářená fólie, která se za 97 dní rozložila z 35%. Ostatní typy fólií si udržely podobný průběh mineralizace po celou dobu experimentu. Bohužel hodnota mineralizace 25 hodin ozářené fólie může být zkreslena, protože během pokusu se nedopatřením dvě paralelní láhve rozbily a tudíž se vyhodnocovala pouze jedna láhev. Nicméně z grafu není možno vysledovat žádné významné rozdíly mezi různě ozářenými vzorky a rovněž se neobjevil žádný trend závislosti rozsahu biodegradace na době ozařování. To může být pravděpodobně tím, že biodegradace byla zpomalena malým povrchem vzorku a nemohly se tudíž projevit rozdíly mezi různými vzorky. Dalším vysvětlením by mohlo být, že síťování výrazně nezměnilo počet dostupných hydrolyzovatelných vazeb v polymeru a tudíž biodegradaci významně neovlivnilo.



Obr. 8 Biodegradace vzorků Ecoflex ve formě fólií s různou dobou ozáření: ×, neo-
zářená fólie; □, 10 hodin ozářená fólie; ◇, 25 hodin ozářená fólie; △, 100 hodin ozá-
řená fólie; ○, srovnávací vzorek (celulóza).

Vzorek po úpravě chloroformem

Rozklad vzorků po úpravě chloroformem probíhal rychleji než v předešlém případě (u fóliových vzorků) a dosáhl za 97 dnů hodnot v rozmezí od 48 až 71% (obr. 7). Tím se potvrdil fakt, že specifický povrch vzorku má vliv na rychlost jeho rozkladu v prostředí kompostu. Z obrázku 7. lze též vysledovat, že oproti předpokladu se rychleji rozkládaly vzorky ozářené, než vzorek neozářený. Za 97 dnů se rozložil 25 hodin ozářený vzorek, 100 hodin ozářený vzorek, 10 hodin ozářený vzorek a neozářený vzorek z 71%, 59%, 53% a 49% v tomto pořadí. Nicméně se opět dá říci, že ani u takto upravených vzorků se neprokázala jasná závislost mezi stupněm zesíťování a rychlosti biodegradace. Interpretace tohoto pozorování je opět ta, že počet dostupných hydrolyzovatelných vazeb se v procesu urychleného stárnutí výrazně nezměnil.



Obr. 9 Biodegradace vzorků Ecoflex po úpravě chloroformu s různou dobou ozáření: x, neozářený vzorek; □, 10 hodin ozářený vzorek; ◇, 25 hodin ozářený vzorek; Δ, 100 hodin ozářený vzorek; ○, srovnávací vzorek (celulóza).

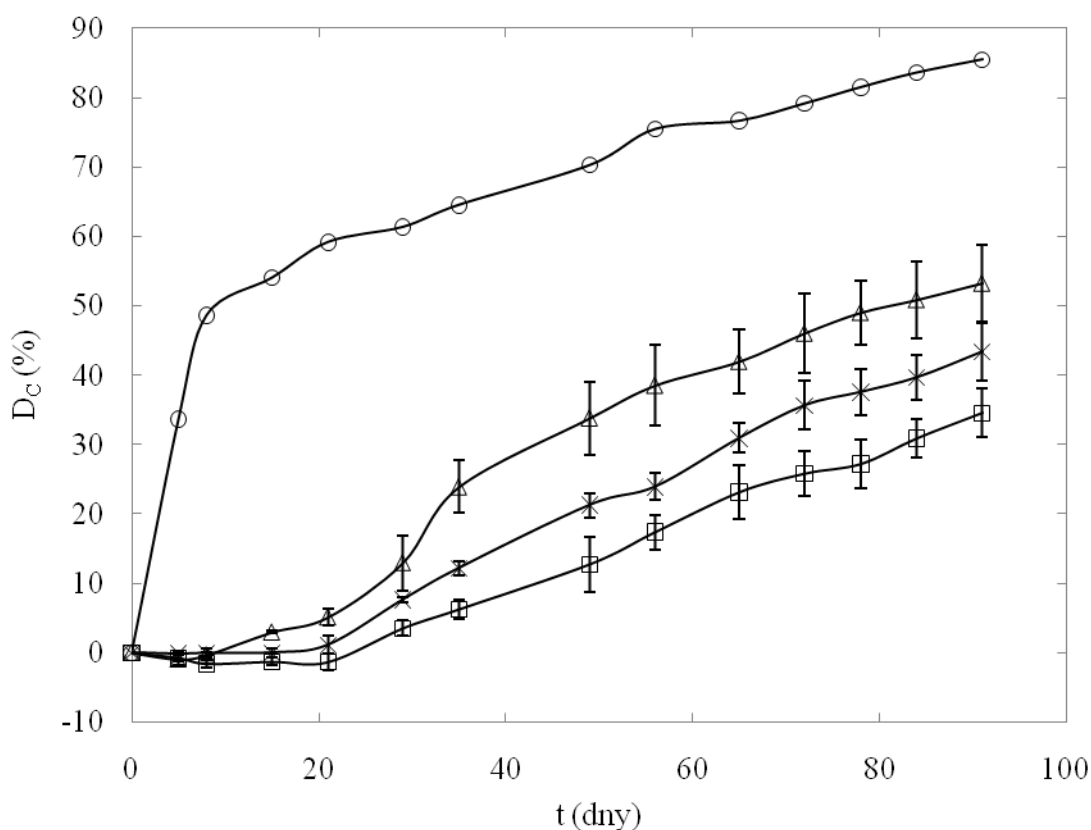
9.2 Vliv fotodegradace na biodegradaci materiálu PLA

V rámci tohoto experimentu se pracovalo se vzorky PLA ve formě fólií, které byly ozářené v zařízení SEPAP po dobu 0 hodin, 10 hodin a 50 hodin. Při působení UV záření na vzorky PLA převládlo štěpení molekul nad síťováním, což bylo ověřeno reologickými testy a také rozpouštěním fólií v rozpouštědle. Při rozpouštění všech typů PLA vzorků nedošlo k žádnému vyextrahování nerozpustného podílu. Proto byl tentokrát předpoklad zcela opačný než v předešlém experimentu (s ozářenými vzorky Ecoflex) a to takový, že ozářené fólie PLA by se měli rozkládat v prostředí kompostu rychleji než neozářený vzorek, protože by mohli poskytnout mikroorganismům více volných hydrolyzovatelných vazeb.

V rámci biodegradčního experimentu se připravily vždy 3 paralelní láhve pro každý typ vzorku. Do těchto láhví se přidaly vždy 4 komponenty a to 0,1 g vzorku, 5 g kompostu, 7 g perlitu a 5 ml minerálního média. Navážka vzorku oproti předešlému experimentu se vzor-

ky Ecoflex musela být snižena, protože ozářených fólií PLA bylo méně a nebylo by pak možné při zachování navážky 200 mg připravit tři paralelní láhve pro každý typ vzorku. Připravili se i láhve se vzorky rozpuštěnými v chloroformu, které byly deponovány na povrch perlitu. Také se připravilo 5 paralelních láhvi bez vzorku a 1 láhev s mikrokrytalickou celulózą. Délka experimentu trvala 91 dnů. Opět jsme pro přehlednost sestrojili zvlášť graf se vzorky ve formě fólií a graf se vzorky po úpravě chloroformu.

Vzorek ve formě fólie:



Obr. 10 Biodegradace vzorků PLA ve formě fólií s různou dobou ozáření: ×, neozařená fólie; □, 10 hodin ozářená fólie; △, 50 hodin ozářená fólie; ○, srovnávací vzorek (celulóza).

Na obr. 11 lze vysledovat, že na začátku testu se vzorky nerozkládaly a vykazovaly tzv. lagovou fázi. Dokonce byly po přepočtech naměřeny i záporné hodnoty. To je způsobeno tím, že slepé pokusy vykazovaly o něco vyšší produkci CO_2 než láhve se vzorky. To je možné, protože je známý fakt, že nejprve musí být vysokomolekulární PLA štěpeny na oligomerní a monomerní jednotky a až poté jsou schopné mikroorganismy tento polyester využívat a rozkládat. Podobnou zmínku i lagovou fázi je možno nalézt i v literatuře [23]

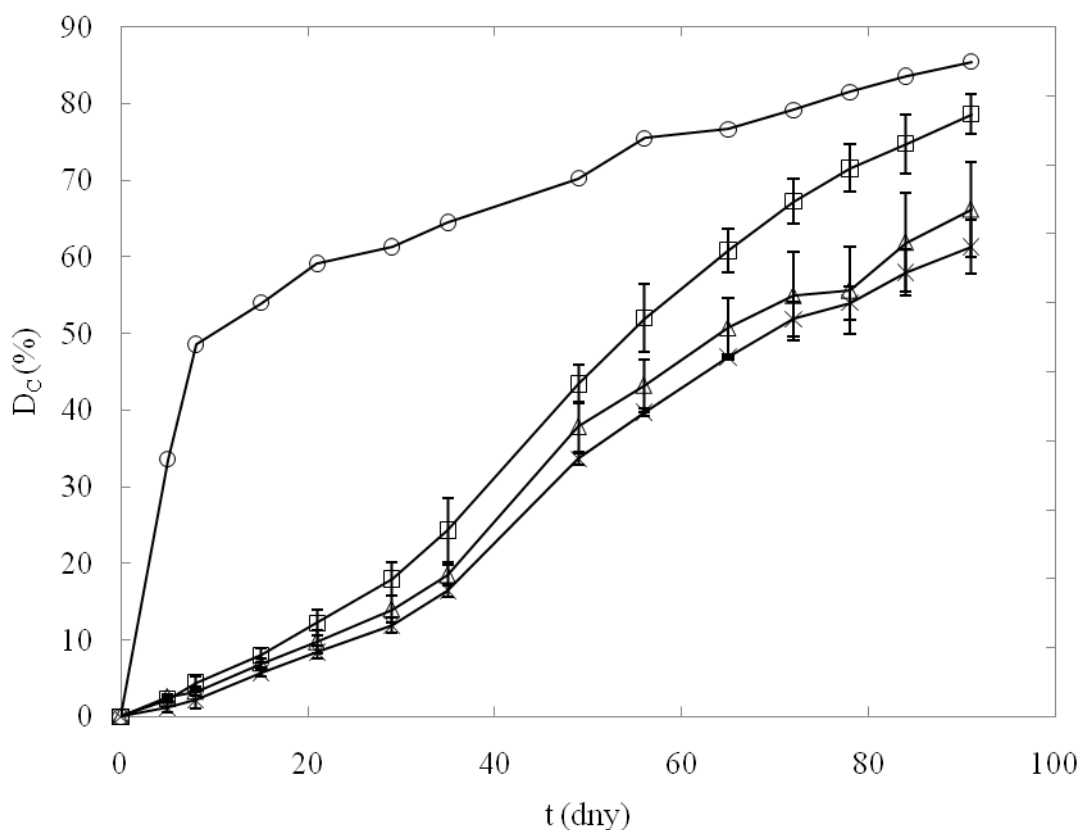
Kolem 20 dne experimentu začaly všechny typy fólií vykazovat určitou mineralizaci. Zajímavostí je, že 50 hodin ozářenou fólií začaly mikroorganismy přítomné v kompostu využívat a mineralizovat již kolem 15 dne inkubace. To je zřejmě způsobeno tím, že takto ozářená fólie již měla po fotodegradaci spousty rozštěpených vazeb a tudíž bylo zapotřebí kratší doby pro akceleraci činnosti mikroorganismů. Dle předpokladu se 50 hodin ozářená fólie mineralizovala po celou dobu experimentu rychleji než zbylé dva typy fóliových vzorků a za 91 dnů dosáhla hodnoty 53%. Oproti předpokladu se však neozářená PLA fólie vzorků mineralizovala rychleji, než 10 hodin ozářená PLA fólie, a proto nelze zcela z určitosti říci, že fotodegradované PLA filmy se budou rozkládat v prostředí kompostu rychleji než neozářené PLA filmy. I zde je však možno učinit závěr, že rozdíly mezi vzorky s různým stupněm ozáření jsou poměrně malé.

Vzorek po úpravě chloroformem:

Z obrázku 12 lze vysledovat, že se vzorky po úpravě chloroformem rozkládaly rychleji než vzorky ve formě fólií a za 91 dnů se zmineralizovali od 61% do 70%, čímž se opět potvrdil fakt, že velikost specifického povrchu vzorku má velký vliv na rychlost biodegradace v prostředí kompostu.

U takto upravených vzorků se již neobjevila lagová fáze. To je způsobeno zřejmě tím, že po rozpuštění fólií v rozpouštědle již měli mikroorganismy dostatečný přístup k volným vazbám a mohli tak polyester ihned využívat.

Dle předpokladu se rozkládaly oba typy ozářených vzorků rychleji než neozářený vzorek. Oproti předpokladu se však 10 hodin ozářený vzorek rozklál rychleji než 50 hodin ozářený vzorek. Opět se neobjevil žádný trend závislosti rozsahu biodegradace na době ozařování. Znova tak můžeme říci, že nedošlo k výraznému ovlivnění počtů dostupných vazeb pro mikroorganismy.



Obr. 11 Biodegradace vzorků PLA po úpravě chloroformem s různou dobou ozáření: x, neozářený vzorek; □, 10 hodin ozářený vzorek; △, 50 hodin ozářený vzorek; ○, srovnávací vzorek (celulóza).

9.3 Sumarizace výsledku

Obě křivky celulózy z obr. 11 a 12 vykazovaly podobný průběh mineralizace. Celulóza založená jako pozitivní kontrola u biodegradačního experimentu se vzorky ecoflex se za 97 dní zmineralizovala z 84,3%. Celulóza založená jako pozitivní kontrola u biodegradačního experimentu se vzorky PLA se za 91 dní zmineralizovala z 85,5%. Rovněž obě křivky za 45 dnů testu dosahovaly mineralizace okolo 70%. To indikuje jednak, že délka skladování kompostu neovlivnila biodegradační experimenty, ale také že kompost měl vhodnou mikrobiální aktivitu dle ISO 14855-1.

Testované vzorky Ecoflex a PLA byly vystaveny UV záření, díky čemuž docházelo v polyesterech k síťování a štěpení řetězců. Byl tedy předpoklad, že díky změně přístupnosti volných hydrolyzovatelných vazeb pro mikroorganismy, by mohla být ovlivněná rychlost biodegradace. Ani v jednom případě se však neobjevil jasný trend, že délka ozáření vzorků

má vliv na následnou rychlost biodegradace v prostředí kompostu. To je zřejmě tím, že mikroorganismy měly vždy dostatek volných hydrolyzovatelných vazeb. Naopak se potvrdil fakt, že specifický povrch výrazně ovlivňuje rychlost biodegradace v prostředí kompostu. V obou provedených experimentech se vzorky po úpravě chloroformem rozkládaly rychleji než vzorky ve formě fólií, které měli menší specifický povrch. V tab. 6 jsou pak uvedeny mineralizace testovaných vzorků, jenž byly dosaženy zhruba v polovině biodegradačních experimentů a také na konci biodegradačních experimentů.

Tab. 7 Souhrnná tabulka biodegradace fotodegradovaných vzorků

Ecoflex vzorky ve formě fólií			PLA vzorky ve formě fólií		
	48 den (%)	97 den (%)		49 den (%)	91 den (%)
Eco0F	12,8	27,2	PLA0F	21,3	43,4
Eco10F	12,5	25,1	PLA10F	12,7	34,5
Eco25F	10,0	25,7	PLA50F	33,8	53,2
Eco100F	21,2	33,1			
Ecoflex vzorky po úpravě chloroformem			PLA vzorky po úpravě chloroformem		
Eco0R	33,5	48,9	PLA0R	33,6	61,3
Eco10R	37,9	53,3	PLA10R	43,4	78,6
Eco25R	49,5	70,9	PLA50R	37,8	66,2
Eco100R	41,2	58,5			

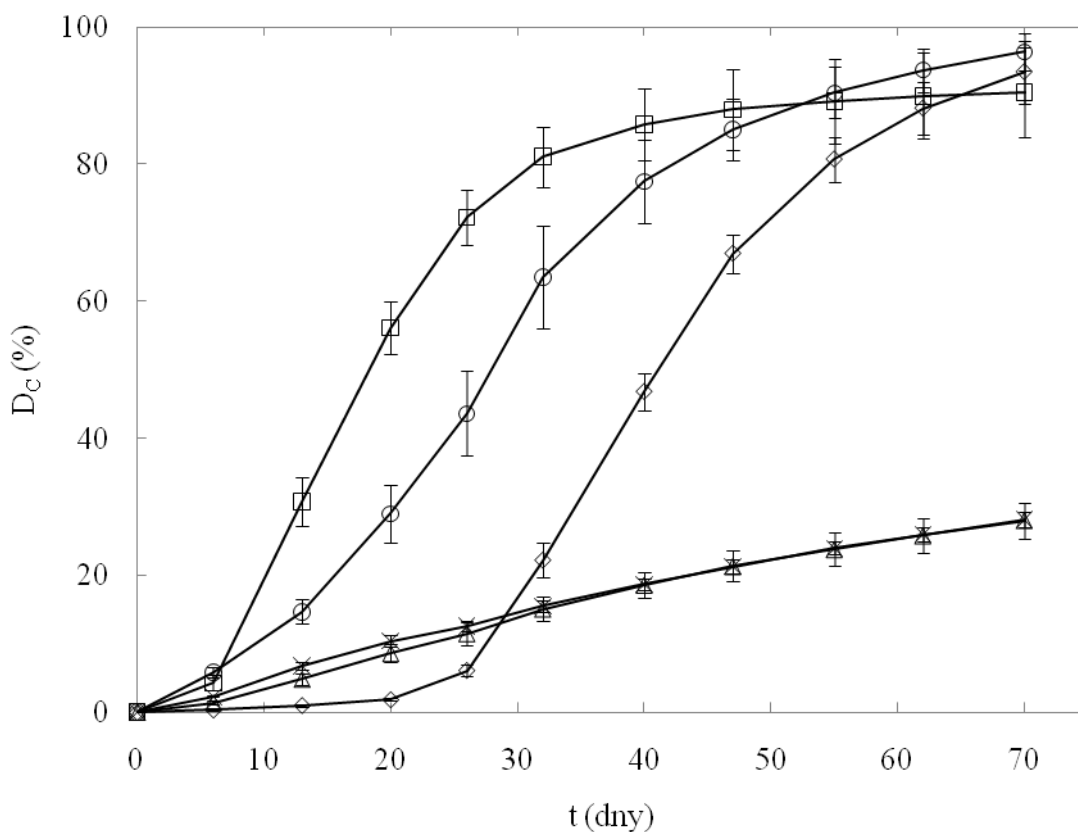
10 POROVNÁNÍ BIODEGRADABILITY VYBRANÝCH POLYESTERŮ SE ZAMĚŘENÍM NA SLEDOVÁNÍ MIKROBIOLOGIE PROCESU

10.1 Sledování biodegradace v kompostu

V rámci tohoto testu se připravily a využily práškové formy polyesterů PBAT, Ecoflex, PLA_N a PLA_V za účelem sledování rychlosti jejich mineralizace, ale hlavně pro adaptování kompostů s následným mikrobiálním rozbohem. Pro každý typ polyesteru se připravily 3 paralelní biometrické láhve. Do těchto láhví se navázilo 0,3 g vzorku, 5 g kompostu a před uzavřením se přidalo 3 ml minerálního média. Do láhví se nepřidával perlit. Také se připravily 3 paralelní láhve s mikrokrystalickou celulózu a 4 paralelní láhve bez jakéhokoli přidaného vzorku.

Test se nechal probíhat 70 dnů a během této doby se nejrychleji rozložila celulóza, která se zmineralizovala za tuto dobu z 96% (Obr. 12). Z obr. 12 lze dále vidět, že konečná mineralizace u obou typů PLA polyesterů dosáhla za 70 dnů podobných hodnot, ale průběh jejich rozkladu byl zcela odlišný. Nízkomolekulární PLA se rozkládalo v prvních dnech dokonce rychleji než celulóza a za 20 dnů se zmineralizovala přes 50%, zatímco vysokomolekulární PLA se za 20 dnů prakticky nerozložila vůbec a vykazovala lagovou fázi. Tím se potvrdil již dříve zmíněný fakt, že u tohoto polymeru je lagovou fází možno pravidelně pozorovat. Zajímavé naopak je, že u nízkomolekulární PLA lagovou fází nevykazoval. Vzorky Ecoflex a PBAT vykazovaly po celou dobu testu prakticky podobné hodnoty a za 70 dnů se rozložily pouze z 28%.

Hodnoty rozptylů a výsledné %degradace můžou být mírně zkresleny, jelikož z 1 paralelní láhve se pro každý vzorek odebíral adaptovaný kompost. K tomuto odběru došlo v průběhu testu celkem 3x. Nízká hodnota biodegradace Ecoflexu a PBAT mohla být způsobena vyšší navázkou polymeru, pro kterou jsme se rozhodli, abychom zvýšili koncentraci biodegradujících organismů ve vzorku pro následné mikrobiologické studie.



Obr. 12 biodegradace vzorků PBAT, Ecoflex, PLA_N, PLA_V ve formě prášků: x, PBAT; Δ, Ecoflex; □, PLA_N; ◇, PLA_V; ○, srovnávací vzorek (celulóza).

10.2 Počty významných skupin mikroorganismů v průběhu biodegradace

Sledování biodegradace polymerních materiálů, jehož výsledky jsou zmíněny v předchozí kapitole, se provádělo, především za účelem snahy vyšetřit, zdali nedojde k významné změně počtů mikroorganismů v průběhu testu. Proto jsme v průběhu experimentu odebírali adaptovaný kompost na daný polyester a provedli u něj stanovení počtů stejných druhů mikroorganismů jako u neadaptovaného kompostu. Adaptovaný kompost na daný polyester byl odebrán s biometrických láhví dne 15.3.2011 a 14.4.2011 což odpovídá 43 a 70 dnu biodegradčního experimentu. U adaptovaného kompostu se samozřejmě sledovaly stejné druhy mikroorganismů jako u neadaptovaného kompostu, aby bylo možno vyčíst, zdali ke změně počtu mikrobiálního oživení došlo. Neadaptovaný kompost byl očkovan na kulti-vační misky 3.2.2011, čili na začátku tohoto biodegradčního pokusu a sledovaly se u něj počty termofilních bakterií, aktinomycet, vláknitých plísní a degradérů rozkládajících příslušný polyester. Výsledky počtů těchto skupin organismů z neadaptovaného kompostu

jsou již zmíněny v Tab. 5. Pro lepší srovnání s výsledky s adaptovaným kompostem jsou však uvedeny i v tabulce. 8.

Tab. 8 Souhrnná tabulka počtů sledovaných mikroorganismů

	CFU/g sušiny vzorku						
	T.B.	T.A.	V.P.	D.PBAT	D.ECO	D.PLA_N	D.PLA_V
N.Kompost 0 den	$3,8 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^4$	0	$1,7 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$9,6 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^5$
A.K. na PBAT 43 den	$1,9 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^3$	0	$3,5 \cdot 10^7$	ns	ns	ns
A.K. na Ecoflex 43 den	$2,4 \cdot 10^7$	$5,7 \cdot 10^3$	0	ns	$8,0 \cdot 10^6$	ns	ns
A.K. na PLA_N 43 den	$3,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^4$	0	ns	ns	$3,2 \cdot 10^7$	ns
A.K. na PLA_V 43 den	$1,4 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^4$	0	ns	ns	ns	$9,1 \cdot 10^6$
A.K. na PBAT 70 den	$2,2 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^4$	0	$1,6 \cdot 10^7$	ns	ns	ns
A.K. na Ecoflex 70 den	$1,7 \cdot 10^7$	$5,1 \cdot 10^4$	0	ns	$3,2 \cdot 10^7$	ns	ns
A.K. na PLA_N 70 den	$8,0 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^5$	0	ns	ns	$2,0 \cdot 10^8$	ns
A.K. na PLA_V 70 den	$1,8 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^5$	0	ns	ns	ns	$2,6 \cdot 10^8$

A.K. adaptovaný kompost odebraný s biometrických láhví v uvedený den.

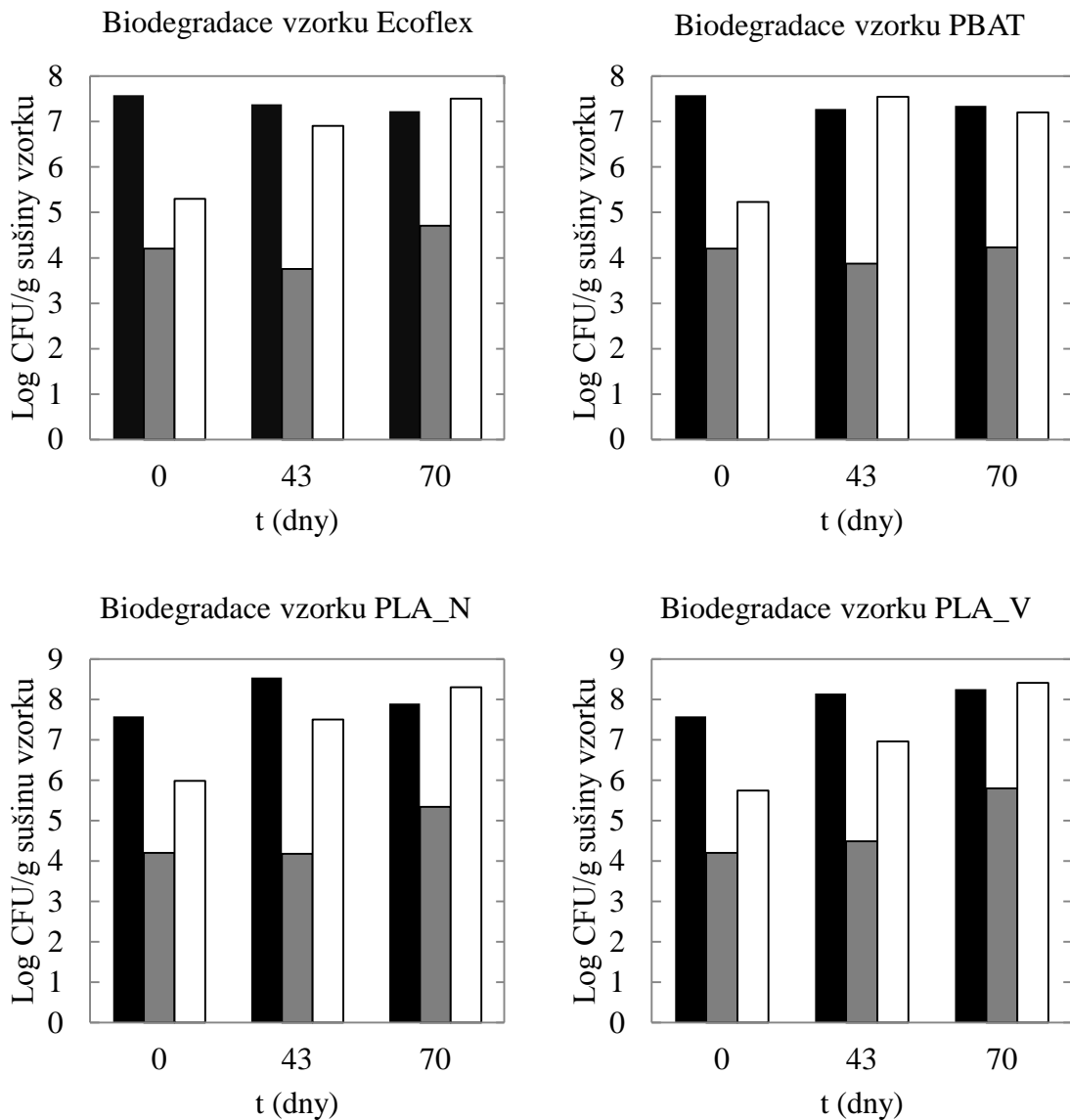
Všechny počty mikroorganismů jsou uváděny jako CFU/g sušiny vzorku. U adaptovaného kompostu na daný polyester jsme proto stanovili příslušné sušiny. Hodnoty zjištěných su-

šín jsou uvedeny v Tab. 9. Lze vypořozovat, že během biodegradačního experimentu došlo k výraznému poklesu sušin kompostu a to zhruba o 10% oproti neadaptovanému kompostu. To je zřejmě způsobeno tím, že biometrické láhve se provzdušňovali 30 minut po každém měření a během tohoto úkonu docházelo k vysušování kompostu. Také to může být způsobeno i tím, že během inkubace láhví při 58°C se voda kondenzovala na povrchu skleněné láhve v podobě kapek. Bohužel jsme nepředpokládali, že k tak velké změně dojde a proto jsme sušiny adaptovaných kompostu na daný polyester stanovili jen 14.4.2011. Tyto sušiny se využili i u přepočtu mikroorganismů stanovených z adaptovaného kompostu odebraného 15.3.2011 resp. 43 den experimentu, což může způsobit menší chybu.

Tab. 9 Hodbnoty sušin adaptovaných kompostů

	S₁ (%)	S₂ (%)	S₃ (%)	S_φ (%)
A.K. na PBAT	46,81	46,24	46,90	46,65
A.K. na Ecoflex	44,67	45,18	45,07	44,97
A.K. na PLA_N	44,33	44,15	45,12	44,53
A.K. na PLA_V	45,05	44,38	44,39	44,61

V tabulce 6 jsou tedy uvedeny všechny hodnoty zjištěných počtů mikroorganismů. Pro lepší orientaci jsme však sestrojili i obr. 13.



Obr. 13 Změny počtů sledovaných mikroorganismů v průběhu biodegradačního pokusu s práškovými formami vzorků PBAT, Ecoflex, PLA_N, PLA_V: ■, termofilní bakterie rostoucí na TYA agaru; ■, termofilní aktinomycety rostoucí na GD agaru; □, mikroorganismy rozkládající příslušný polyester.

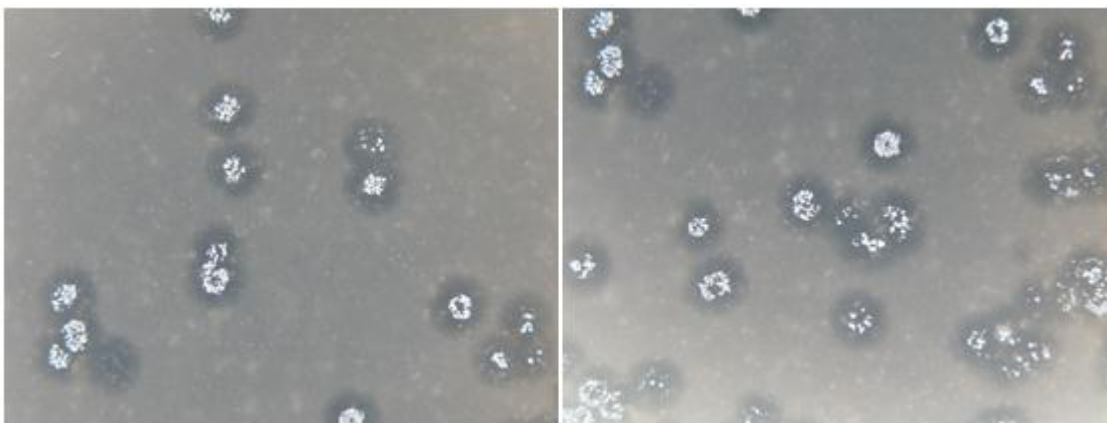
Vidíme, že ani v jednom případě se v kompostu nevyskytovaly vláknité plísně. To však může být způsobeno i tím, že námi připravené misky nebyly pro tuto kultivaci vhodné.

Počty termofilních aktinomycet se v průběhu biodegradačního testu výrazně neměnili a jejich řádové počty se pohybovaly okolo 10^4 CFU/g sušiny vzorku. Mezi neadaptovaným kompostem a všemi typy adaptovaných kompostů na dané polyestery odebraných s lahví

43 den testu, nelze vysledovat skoro žádné rozdíly. Tento trend se udržel i u adaptovaných kompostů na PBAT a Ecoflex odebraných na konci testu (70 den). K nárůstu počtů této skupiny mikroorganismů asi o jeden řád došlo jen u adaptovaných kompostů na PLA_N a PLA_V odebraných z lahví na konci experimentu.

Počty termofilních bakterií vykazovaly podobný trend jako termofilní aktinomycety. Opět nedocházelo k výrazné změně jejich počtů v průběhu experimentu. Jejich počty se pohybovaly okolo 10^7 CFU/g sušiny vzorku. Mezi neadaptovaným kompostem a adaptovaným kompostem na polyestery Ecoflex a PBAT odebraných jak v 43 den tak i v 70 den testu nejsou patrné skoro žádné rozdíly a u adaptovaných kompostů na oba typy PLA polyesterů došlo jen k menší změně počtů kolonií, které však v počtech nárůstu nepřevyšují 1 řád.

Dle očekávání v průběhu biodegradčního experimentu docházelo k výraznému nárůstu degradérů schopných rozkládat dané polyestery. Odečet počtů kolonií této skupiny mikroorganismů byl prováděn na agarech s příslušným polymerem. Díky přidanému polyesteru se misky jeví jako zakalené. Po naočkování inóku se živná půda začala projasňovat v důsledku rozkládání přidaného polyesteru a vytvořily se tzv. světlé zóny, které byly odečítány jako kolonie. Nutno poznamenat, že na miskách s polymerním agarem PLA se světlé zóny příliš netvořily, ale tvořily se na nich celkem dobře rostoucí bílé kolonie, což lze vidět i na obr. 15.



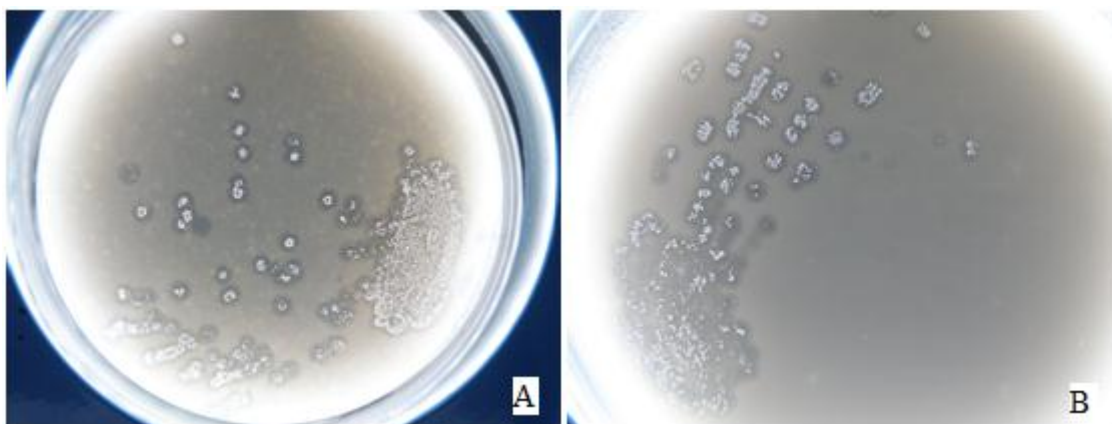
Obr. 14 Projasněné zóny na agaru s polymerem ecoflex

Stejně tak jako křivky rozkladu práškových forem Ecoflex a PABAT vykazovaly po celou dobu testu prakticky stejný průběh, tak i počty kolonií schopných rozkládat tyto polyestery měly podobné hodnoty (zastoupení) po celou dobu testu. Po 43 dnů testu došlo k nárůstu této skupiny organismů až o 2 řády a to z 10^5 na 10^7 CFU/g sušiny vzorku. Poté se již jejich počty příliš neměnili a udrželi se na stejné hodnotě tedy 10^7 CFU/g sušiny vzorku.

U mikroorganismů schopných rozkládat polyestery PLA došlo ještě k většímu nárůstu v počtech kolonií v průběhu testu. Po 43 dnech došlo k nárůstu počtů kolonií o dva řády z 10^5 na 10^7 CFU/g sušiny vzorku a po 70 dnech se tyto počty pohybovaly okolo 10^8 CFU/g sušiny vzorku. Lze vysledovat, že dokonce tyto počty degradérů převyšují i celkové počty termofilních mikroorganismů. To je možné protože TYA agar je univerzální živnou půdou, na které roste většina mikroorganismů, ale rozdílnou rychlostí. Degradéři schopní rozkládat polyester tak na těchto miskách zřejmě nestihli vyrůst. Proto by celkové počty termofilních mikroorganismů měly mít spíše označení jako termofilní bakterie rostoucí na TYA agaru.

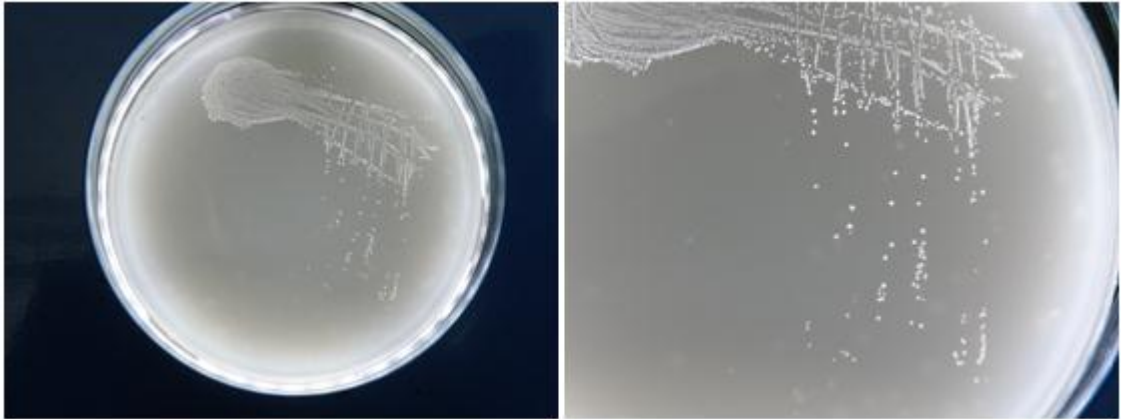
10.3 Izolace a identifikace mikroorganismů rozkládajících příslušný polyester

Po odečtení kolonií rostoucích na polymerních agarech se provedl křížový roztěr, za účelem izolace čisté kultury k následné identifikaci. Na obr. 14 jsou vyfocené misky s polymerním agarem Ecoflex a PBAT. Lze vidět, že na těchto miskách kolonie tvořily jasné zóny.



Obr. 15 Křížový roztěr kultury rostoucí na agaru s polymerem PBAT a Ecoflex: A, agar s polymerem PBAT; B, agar s polymerem Ecoflex.

Na obr. 15 jsou vyfocené misky s polymerním agarem PLA. Vidíme, že na tomto agaru narostly bílé kolonie, které však světlé zóny příliš netvořily.



Obr. 16 Křížový roztěr kultury rostoucí na agaru s polymerem PLA

Identifikace izolovaných kultur mikroorganismů byla provedena srovnáváním sekvencí nukleotidů v genu 16S rRNA. Tato část práce byla provedena v spolupráci s ing. Lucií Husárovou. Při srovnání sekvencí s databází se ukázalo, že za rozklad polymerů Ecoflex a PBAT byla zodpovědná aktinomyceta vykazující 99% podobnost s organismem *Thermomonospora curvata*.

ZÁVĚR

Hlavním cílem předložené diplomové práce, bylo sledování vlivu ozářených filmových vzorků Ecoflex a PLA na biodegradaci v prostředí vyzrálého kompostu. Ozářené filmové vzorky byly obdrženy od ing. Petra Stloukala, který je připravil v rámci svého pracovního pobytu na Pascal B. University (BPU). Na BPU byly vzorky ozařované v zařízení SEPAP 12/24, které simuluje sluneční záření. Fólie Ecoflex byly ozářené po dobu 0, 10, 25 a 100 hodin a fólie PLA po dobu 0, 10 a 50 hodin. Reologickými testy a rozpouštěním ozářených fólií v chloroformu se na P.B.U zjistilo, že vlivem ozařování vznikaly v polymerech štěpné a síťovací reakce. U vzorků ecoflex převládaly síťovací reakce, zatímco u vzorků PLA štěpné reakce.

Biodegradační experiment byl již proveden na našem pracovišti. Prováděl se biodegradační experiment zvlášť pro vzorky Ecoflex a zvlášť pro vzorky PLA. Rovněž se v rámci obou testů připravily biometrické láhve se vzorky po úpravě chloroformem za účelem zvětšení specifického povrchu, protože z dostupných zdrojů se vědělo, že velikost povrchu výrazně ovlivňuje rychlost biodegradace v prostředí kompostu.

Předpokládalo se, že vzorek Ecoflex ozářený delší dobu, se bude v prostředí kompostu rozkládat pomaleji, než vzorek ozářený kratší dobu, protože je více zasíťován a mikroorganismy by tak mohly mít horší přístup k volným hydrolyzovatelným vazbám. U ozářených vzorků PLA byl předpoklad zcela odlišný, protože vlivem záření převládaly v polyesteru štěpné reakce tvořící volné vazby, které by pak mikroorganismy mohly snáze napadnout svým enzymatickým systémem. Nicméně ani v jednom případě se neobjevil jasný trend, že délka ozáření vzorků má vliv na následnou rychlost biodegradace v prostředí kompostu. Naopak se potvrdil fakt, že specifický povrch výrazně ovlivňuje rychlost biodegradace, protože v obou provedených experimentech se vzorky po úpravě chloroformem rozkládaly rychleji než vzorky ve formě fólií, které měli menší specifický povrch. V tab. 6 jsou uvedeny průběžné a konečné hodnoty degradací v procentech pro každý typ vzorků.

V rámci práce se provedl i biodegradační pokus se vzorky PBAT, Ecoflex, nízkomolekulárním PLA a vysokomolekulárním PLA v práškové formě za účelem sledování změn mikrobiálního oživení v kompostu. Byly sledovány termofilní bakterie rostoucí na TYA agaru, aktinomycéty, vláknité plísňe a mikroorganismy schopné rozkládat daný polyester. Bylo zjištěno, že v průběhu tohoto biodegradačního pokusu došlo k výraznějšímu nárůstu pouze u skupin mikroorganismů schopných rozkládat zkoumaný polyester a to asi o 2 řády

v CFU/g sušiny vzorku. U ostatních sledovaných druhů mikroorganismů k výraznějšímu nárůstu počtů kolonií nedošlo. Rovněž byla prováděná izolace a identifikace mikroorganismů rostoucích na agarech s příslušným polymerem. Na miskách s polymerem Ecoflex a PBAT tvořili mikroorganismy světlé zóny, zatímco na miskách s polymerem PLA se tvořily poměrně dobře rostoucí bílé kolonie a zóny nebyly příliš pozorovatelné. Izolace mikroorganismů rozkládající polymery je ukázána na obr. a obr. Identifikace izolovaných degradérů se provedla pomocí molekulárně biologické metody srovnáváním sekvencí 16S rRNA. Při srovnání sekvencí s databází se ukázalo, že za rozklad polymerů Ecoflex a PBAT byla zodpovědná aktinomyceta vykazující 99% podobnost s organismem *Thermomonospora curvata*. Identifikace mikroorganismu rozkládajícího PLA nebyla ukončena před datem odevzdání Diplomové práce.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Ducháček, V., *Polymery - výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. 2. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. ISBN 80-7080-617-6
- [2] Breulmann, M., et al., *Polymers, Biodegradable*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 2009: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [3] Rutkowska, M., Krasowska, K., Heimowska, A., Kowalczyk, M.: *Degradation of the blends of natural and synthetic copolyesters in different natural environments*, Macromol Symp (2003).
- [4] Rudnik, E., *Compostable polymer materials -- definitions, structures and methods of preparation*, in *Compostable Polymer Materials 2008*, Elsevier: Amsterdam. p. 10-36.
- [5] Copinet, A., et al., *Photodegradation and Biodegradation Study of a Starch and Poly(Lactic Acid) Coextruded Material*. Journal of Polymers and the Environment, 2003. **11**(4): p. 169-179.
- [6] Kijchavengkul, T., et al., *Development of an automatic laboratory-scale respirometric system to measure polymer biodegradability*. Polymer Testing, 2006. **25**(8): p. 1006-1016.
- [7] Hwang, I.-T., et al., *Electron beam-induced crosslinking of poly(butylene adipate-co-terephthalate)*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 2010. **268**(21): p. 3386-3389.
- [8] Averous, L., Biodegradable polymers (Biopolymers). In *Biodegradable Polymer, Biopolymer, Agro-polymer, Bioplastic, Biomaterial, Compostable Packaging* [online]. [s.l.] : [s.n.], 2007 [cit. 2011-05-19]. Dostupné z WWW: <<http://www.biodeg.net>>.
- [9] Yamamoto, M., et al., *Biodegradable Aliphatic-Aromatic Polyesters: "Ecoflex®"*. Biopolymers Online 2005: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [10] Jacobsen, S., et al., *Poly lactide (PLA) - a new way of production*. Polymer Engineering & Science, 1999. 39(7): p. 1311-1319.
- [11] Kricheldorf, H.R., *Syntheses and application of polylactides*. Chemosphere, 2001. 43(1): p. 49-54.

- [12] Huneault, M.A. and H. Li., *Morphology and properties of compatibilized polylactide/thermoplastic starch blends*. Polymer, 2007. 48(1): p. 270-280.
- [13] Holišová, L., *Studium biodegradace aromaticko.alifatického kopolyesteru v prostředí půdy*. UTB ve Zlíně, fakulta technologická, diplomová práce 2008.
- [14] L. S. Naira and C. T. Laurencin, *Biodegradable polymers as biomaterials*, Prog. Polym. Sci., vol. 32, pp. 762–798, Aug.-Sep. 2007.
- [15] Kijchavengkul, T., et al., *Assessment of aliphatic-aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part I: Field study*. Chemosphere, 2008. 71(5): p. 942-953.
- [16] Hejáková, K., *Kompostování přebytečné travní biomasy: metodická pomůcka*. Vyd. 1. 2007, ZERA - Zemědělská a ekologická regionální agentura: Náměšť nad Oslavou.
- [17] Eubeler, J.P., et al., *Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2009. 28(9): p. 1057-1072.
- [18] Funabashi, M., Ninomiya, F., Kunioka, M., *Biodegradability Evaluation of Polymers by ISO 14855-2*. Int.J.Mol.Sci 2009.
- [19] ISO 14855-1. *Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions -- Method by analysis of evolved carbon dioxide -- Part 1: General method*. [s.l.] : [s.n.], 2005. 32 s.
- [20] Yang, H.-S., J.-S. Yoon, and M.-N. Kim, *Effects of storage of a mature compost on its potential for biodegradation of plastics*. Polymer Degradation and Stability, 2004. 84(3): p. 411-417.
- [21] [Http://www.hissan.co.jp](http://www.hissan.co.jp) [online]. 5.11.2010 [cit. 2011-05-19]. Hissan Trading Co., Ltd.: Dostupné z WWW: <http://www.hissan.co.jp/business/moda/e_index.html>.
- [22] ISO 14855 – 2. *Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions – Method by analysis of evolved carbon dioxide – part 2: gravimetric measurement of carbon dioxide evolved in a laboratory scale test*. [s.l.] : [s.n.], 2007. 15 s.
- [23] Yang, H.-S., J.-S. Yoon, and M.-N. Kim, *Dependence of biodegradability of plastics in compost on the shape of specimens*. Polymer Degradation and Stability, 2005. 87(1): p. 131-135.

-
- [24] Kijchavengkul, T., et al., *Assessment of aliphatic-aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part II: Laboratory simulated conditions*. Chemosphere, 2008. 71(9): p. 1607-1616.
- [25] Gerych P., *Biodegradace polyetylenů s peroxidanty*. UTB ve Zlíně, fakulta technologická, diplomová práce 2008.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ASTM	American Normative Reference
PBAT	Polybuthylene adipe-co-terephthalate
PBS	Polybutylene succinate
PBSA	Polybutylene succinate/adipate
PCL	Polycaprolactonate
PEA	Polyesteramide
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PLA	Poly(lactic acid)
THF	Tetrahydrofuran
PVA	Polyvinylalkohol
MODA	Microbial Oxidative Degradation Analyzer
ISO	International Organisation Standardization
JIS	Japanes Industrial Standards
LD-PE	Low density polyethylen

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 chemické struktury vybraných biodegradabilních polymerů [8].....	14
Obr. 2 Možnosti přípravy PLA polyesteru [10].....	15
Obr. 3 Využití a možnosti odstranění biodegradabilních fólií [15].....	18
Obr. 4 průběh teploty při ideálním kompostování [16]	21
Obr. 5 schéma přístroje MODA [22].....	31
Obr. 6 schematické znázornění desetinného ředění.....	48
Obr. 7 Křížový roztěr.....	56
Obr. 8 Biodegradace vzorků Ecoflex ve formě fólií s různou dobou ozáření: x, neozářená fólie; □, 10 hodin ozářená fólie; ◇, 25 hodin ozářená fólie; Δ, 100 hodin ozářená fólie; ○, srovnávací vzorek (celulóza).	62
Obr. 9 Biodegradace vzorků Ecoflex po úpravě chloroformu s různou dobou ozáření: x, neozářený vzorek; □, 10 hodin ozářený vzorek; ◇, 25 hodin ozářený vzorek; Δ, 100 hodin ozářený vzorek; ○, srovnávací vzorek (celulóza).	63
Obr. 10 Biodegradace vzorků PLA ve formě fólií s různou dobou ozáření: x, neozářená fólie; □, 10 hodin ozářená fólie; Δ, 50 hodin ozářená fólie; ○, srovnávací vzorek (celulóza).....	64
Obr. 11 Biodegradace vzorků PLA po úpravě chloroformem s různou dobou ozáření: x, neozářený vzorek; □, 10 hodin ozářený vzorek; Δ, 50 hodin ozářený vzorek; ○, srovnávací vzorek (celulóza).	66
Obr. 12 biodegradace vzorků PBAT, Ecoflex, PLA_N, PLA_V ve formě prášků: x, PBAT; Δ, Ecoflex; □, PLA_N; ◇, PLA_V; ○, srovnávací vzorek (celulóza).....	69
Obr. 13 Změny počtů sledovaných mikroorganismů v průběhu biodegradačního pokusu s práškovými formy vzorků PBAT, Ecoflex, PLA_N, PLA_V: ■, termofilní bakterie rostoucí na TYA agaru; ■, termofilní aktinomycety rostoucí na GD agaru; □, mikroorganismy rozkládající příslušný polyester.	72
Obr. 14 Projasněné zóny na agaru s polymerem ecoflex.....	73
Obr. 15 Křížový roztěr kultury rostoucí na agaru s polymerem PBAT a Ecoflex: A, agar s polymerem PBAT; B, agar s polymerem Ecoflex.	74
Obr. 16 Křížový roztěr kultury rostoucí na agaru s polymerem PLA	75

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Základní parametry komerčně dostupných materiálů PBAT a PLA [8].	16
Tab. 2 základní výčet ISO norem zabývajících se biodegradací polymerních materiálů [18]	24
Tab. 3 Parametry měření na GC Agilent 7890 [25].....	52
Tab. 4 Hodnoty naměřených sušin u neadaptovaného kompostu.....	58
Tab. 5 Počty kolonií sledovaných mikroorganismů u neadaptovaného kompostu očkovaného na kultivační misky dne 3.2.2011	59
Tab. 6 hodnoty vzniklých gelových frakcí vzorků Ecoflex ozářených 10, 25, 100 hodin po přidavku chloroformu.....	60
Tab. 7 Souhrnná tabulka biodegradace fotodegradovaných vzorků.....	67
Tab. 8 Souhrnná tabulka počtů sledovaných mikroorganismů.....	70
Tab. 9 Hodnoty sušin adaptovaných kompostů	71

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I

**PŘÍLOHA P I: UKÁZKA ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT PRO
25 HODIN OZÁŘENÝ VZOREK ECOFLEX DEPONOVÁNY NA
PERLIT**

Datum založení:

4.6.2010

Kalibrace						
Datum	Inkubace (dny)	množství CO2 w (v/v %)	t (°C)	p (kPa) (kPa)	Vkal (ul)	Signál (A.U., ul, %)
4.6.2010	0					
7.6.2010	3		27	100,6	100	87,00000
10.6.2010	6		28,5	100	100	87,00000
17.6.2010	13		27,5	100,3	100	86,00000
24.6.2010	20		25,5	100,3	100	88,00000
30.6.2010	26		28	100,3	100	89,30000
8.7.2010	34		27	100,5	100	80,00000
15.7.2010	41		31	100	100	87,00000
22.7.2010	48		31	100,3	100	104,00000
29.7.2010	55	0,799	28	99,6	100	104,00000
11.8.2010	68		29	100	100	104,00000
26.8.2010	83		27	100,4	100	109,00000
9.9.2010	97		23	100,7	100	108,00000
23.9.2010	111		24	100,8	100	111,06000

Kompost 1, Ecoflex, povlak na perlitu, 25 H												
Datum	Inkubace (dny)	TC (w/w %)	mC (mg)	Vhead (ml)	Vnáštřík (ul)	Signál (A.U., ul, %)	denní C (mg)	kumul. C (mg)	subst. C (mg)	Degrad. (%)	Součet degrad.	Degrad. celk. (%)
komp 1	0				100	0,00000	0	0	0	0	0	0
7.6.2010	3				100	378,00000	9,749551	9,749551	4,69423	3,736168	3,73617	4,055867
10.6.2010	6				100	719,00000	18,34251	18,34251	9,68913	7,711645	7,71164	8,642758
17.6.2010	13				100	811,00000	21,06273	39,40524	12,90774	10,27335	17,98500	19,16268
24.6.2010	20				100	814,00000	20,79853	60,20376	13,41428	10,67652	28,66152	29,62756
30.6.2010	26				100	580,00000	14,48262	74,68638	8,42489	6,705425	35,36694	36,24768
8.7.2010	34				100	454,00000	12,72173	87,40811	5,57626	4,438185	39,80513	41,83775
15.7.2010	41				100	396,00000	10,01937	97,42748	4,57450	3,640877	43,44601	45,77868
22.7.2010	48				100	487,00000	10,33859	107,7661	5,58326	4,443755	47,88976	49,48289
29.7.2010	55				100	413,00000	8,793173	116,5592	4,20710	3,348457	51,23822	52,60883
11.8.2010	68	62,54	200,9	580,0	100	649,00000	13,82742	130,3867	6,92862	5,514539	56,75276	57,32571
26.8.2010	83				100	819,00000	16,82694	147,2136	9,41816	7,495975	64,24873	63,27973
9.9.2010	97				100	948,00000	19,98273	167,1963	12,19199	9,70369	73,95242	70,91103
23.9.2010	111				100	780,00000	15,9505	183,1468	15,95050	12,69511	86,64753	86,25153
komp 2	0				100	0,00000	0	0	0	0	0	
7.6.2010	3				100	391,00000	10,08485	10,08485	5,02953	4,009024	4,00902	
10.6.2010	6				100	768,00000	19,59256	19,59256	10,93918	8,719585	8,71959	
17.6.2010	13				100	847,00000	21,99769	41,59025	13,84270	11,03398	19,75356	
24.6.2010	20				100	789,00000	20,15975	61,75	12,77551	10,18332	29,93688	
30.6.2010	26				100	634,00000	15,831	77,581	9,77327	7,790244	37,72713	
8.7.2010	34				100	567,00000	15,88815	93,46915	8,74268	6,968767	44,69589	
15.7.2010	41				100	433,00000	10,95553	104,4247	5,51066	4,392527	49,08842	
22.7.2010	48				100	412,00000	8,746402	113,1711	3,99108	3,181275	52,26970	
29.7.2010	55				100	420,00000	8,94221	122,1133	4,35613	3,472261	55,74196	
11.8.2010	68	62,54	200,6	580,0	100	588,00000	12,52777	134,6411	5,62898	4,486839	60,22880	---
26.8.2010	83				100	655,00000	13,45744	148,0985	6,04866	4,821368	65,05017	
9.9.2010	97				100	665,00000	14,01742	162,1159	6,22669	4,963272	70,01344	
23.9.2010	111				100	942,00000	19,26329	181,3792	19,26329	15,35471	85,36815	
komp 3	0				100	0,00000	0	0	0	0	0	
7.6.2010	3				100	411,00000	10,6007	10,6007	5,54538	4,42241	4,42241	
10.6.2010	6				100	806,00000	20,56198	20,56198	11,90860	9,497044	9,49704	
17.6.2010	13				100	809,00000	21,01078	41,57276	12,85579	10,25243	19,74947	
24.6.2010	20				100	806,00000	20,59412	62,16688	13,20988	10,5348	30,28428	
30.6.2010	26				100	512,00000	12,78466	74,95154	6,72693	5,364687	35,64896	
8.7.2010	34				100	495,00000	13,8706	88,82214	6,72514	5,363264	41,01223	
15.7.2010	41				100	403,00000	10,19648	99,01862	4,75161	3,789385	44,80161	
22.7.2010	48				100	430,00000	9,128526	108,1472	4,37320	3,487604	48,28921	
29.7.2010	55				100	366,00000	7,792497	115,9396	3,20642	2,557103	50,84632	
11.8.2010	68	62,54	200,5	580,0	100	568,00000	12,10166	128,0413	5,20286	4,149253	54,99557	---
26.8.2010	83				100	699,00000	14,36146	142,4028	6,95267	5,544717	60,54029	
9.9.2010	97				100	859,00000	18,10671	160,5095	10,31598	8,226936	68,76722	
23.9.2010	111				100	1102,00000	22,53519	183,0447	22,53519	17,97169	86,73891	

EVIDENČNÍ LIST DIPLOMOVÉ PRÁCE

Sigla (místo uložení diplomové práce)	Ústřední knihovna UTB ve Zlíně
Název diplomové práce	Biodegradace nových syntetických materiálů
Autor diplomové práce	Bc. Vladimír Piš
Vedoucí diplomové práce	Doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
Vysoká škola	Universita Tomáše Bati ve Zlíně
Adresa vysoké školy	nám. T. G. Masaryka 5555, 76001 Zlín
Fakulta (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Fakulta technologická ve Zlíně nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
Katedra (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Rok obhájení DP	2011
Počet stran	86
Počet svazků	3
Vybavení (obrázky, tabulky...)	16 obrázků, 9 tabulek, 1 příloha
Klíčová slova	Aromaticko-alifatický kopolyester, Ecoflex, PLA, biodegradace, kompost