

Studium biodegradace aromaticko – alifatického kopolyesteru v kompostu

Bc. Kateřina Foltýnová

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina FOLTÝNOVÁ**

Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Studium biodegradace aromaticko-alifatického kopolyesteru v prostředí kompostu**

Zásady pro vypracování:

1. Zdokonalit metodiku pro práci s tímto materiálem.
2. Určit rychlost biodegradace v prostředí kompostu.
3. Věnovat pozornost vlivu morfologie vzorku.
4. V závislosti na časových možnostech uskutečnit další experimenty se vzorkem.
5. Provést literární rešerši a zpracovat výsledky experimentů do formy DP.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

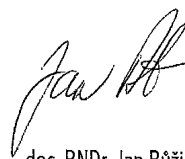
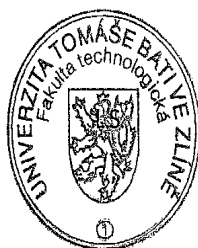
Odborné publikace v databázových zdrojích na internetu.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí
Datum zadání diplomové práce: **15. února 2010**
Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2010**

Ve Zlíně dne 15. února 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



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

Příjmení a jméno:

Obor:

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

.....

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.

ASBTRAKT

Abstrakt česky

Cílem diplomové práce bylo testovat biodegradabilitu různých forem materiálu Ecoflex: fólie o tloušťce 100 - 150 μ m a 150 - 300 μ m, tenkého povlaku na perlitu a prášku. Biodegradabilita Ecoflexu byla sledována v prostředí vyzrálého kompostu analýzou plynných produktů metodou plynové chromatografie. Výsledky ukázaly, relativně nízkou biologickou rozložitelnost vzorku ve formě folií. Na rozdíl od formy prášku a tenkého povlaku, které vykazovaly velmi rychlou biodegradaci, zřejmě kvůli svému vyššímu specifickému povrchu.

Klíčová slova:

aromaticko-alifatický kopolyester, biodegradace, Ecoflex, kompost

ABSTRACT

Abstrakt ve světovém jazyce

The aim of the thesis was to test biodegradation of different forms of Ecoflex were prepared: 100 - 150 μ m and 150 - 300 μ m thick film, thin coating on the surface of perlite and powder. These forms of the sample were used for the testing of the Ecoflex biodegradability followed in mature compost environments. The biodegradability was quantified by analysis of gaseous products by gas chromatography. Result showed relatively poor biodegradability of the film sample. In contrast the powder sample and the thin coating sample exhibited very fast biodegradation probably because of their higher specific surfaces.

Keywords:

aromatic-aliphatic copolyester, biodegradation, Ecoflex, compost

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce Doc. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady při zpracování diplomové práce. Také děkuji celému kolektivu ÚIOŽP za vytvoření výborných pracovních podmínek.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině, příteli a kamarádům za důvěru a podporu při studiu a vypracování diplomové práce.

OBSAH

ÚVOD	10
I LITERÁRNÍ REŠERŠE	12
1 BIODEGRADACE	13
1.1 METODY PRO STANOVENÍ BIOLOGICKÉ DEGRADACE.....	16
1.1.1 Vizualní hodnocení	16
1.1.2 Stanovení zbytkového polymeru	16
1.1.3 Uvolněný CO ₂ /spotřebovaný O ₂	16
1.1.4 Změny mechanických vlastností	17
1.1.5 Tvorba jasných zón	17
1.2 ISO NORMY A SMĚRNICE PRO BIODEGRADAČNÍ TESTY	17
2 KOMPOSTOVÁNÍ	19
2.1 DEFINICE	19
2.2 METODY KOMPOSTOVÁNÍ	19
2.3 PODMÍNKY KOMPOSTOVÁNÍ	20
2.3.1 Poměr C/N.....	20
2.3.2 Vlhkost.....	21
2.3.3 Kyslík a teplota	21
2.4 KVALITA KOMPOSTU	21
2.5 ÚČINKY SKLADOVÁNÍ VYZRÁLÉHO KOMPOSTU NA BIOLOGICKOU ROZLOŽITELNOST.....	23
2.5.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti kompostu	23
2.5.2 Mikroorganismy v kompostu	23
3 ECOFLEX	24
3.1 BIODEGRADACE ECOFLEXU.....	24
3.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BIODEGRADACI	25
3.2.1 Obsah kyseliny tereftalové	25
3.2.2 Struktura polymerního řetězce	26
3.2.3 Mobilita a délka polymerních řetězců	27
3.2.4 Hydrofilita a hydrofobita polymeru	27
3.2.5 Krystalinita polymeru a bod tání	28
3.2.6 Molekulová hmotnost	28
3.3 VLASTNOSTI	29
3.4 APLIKACE	30
3.5 TOXICITA ALIFATICKO-AROMATICKÉHO KOPOLYESTERU	31
3.5.1 Test s ječmenem letním	32
3.5.2 Test s perloočkou <i>Daphnia magna</i>	32
3.5.3 Test s <i>Photobacterium phosphoreum</i>	32
4 BIOLOGICKÁ DEGRADACE ALIFATICKO- AROMATICKÉHO KOPOLYESTERU ECOFLEXU	33
4.1 MEZOFILNÍMI MIKROORGANISMY	33
4.2 TERMOFILNÍMI MIKROORGANISMY	34
II MATERIÁLY A METODIKA	37

5	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	38
5.1	CHEMIKÁLIE	38
5.2	ROZTOKY	39
5.3	ŽIVNÁ MÉDIA	41
5.4	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	42
6	CHARAKTERISTIKA TESTOVANÉHO MATERIÁLU	43
6.1	REFERENČNÍ MATERIÁL	43
6.2	TESTOVANÝ MATERIÁL	43
6.3	PŘÍPRAVA RŮZNÝCH FOREM MATERIÁLU ECOFLEX	43
7	CHARAKTERISTIKA SUBSTRÁTU	45
7.1	SUŠINA KOMPOSTU	45
7.2	SPALITELNÝ PODÍL	45
7.3	MIKROBIÁLNÍ ROZBOR KOMPOSTU	45
8	DIFERENCIÁLNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE (DSC)	47
8.1	PRINCIP DSC	47
8.2	POSTUP MĚŘENÍ DSC	47
9	AEROBNÍ BIODEGRADACE	48
9.1	OBSAH BIOREAKTORŮ PRO AEROBNÍ BIODEGRADACI	48
9.2	PŘÍPRAVA POKUSU PRO AEROBNÍ BIODEGRADACI	49
9.2.1	Příprava vzorků Ecoflexu pro biodegradaci v prvním kompostu	49
9.2.2	Příprava vzorků Ecoflexu pro biodegradaci v druhém kompostu	50
9.3	HODNOCENÍ AEROBNÍ BIODEGRADACE PLYNOVOU CHROMATOGRAFIÍ.....	52
9.3.1	Postup měření	53
9.4	ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH HODNOT	54
10	VÝSLEDKY A DISKUZE	56
10.1	CHARAKTERISTIKA VZORKU	56
10.2	CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH KOMPOSTŮ	58
10.3	HODNOCENÍ DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE	59
10.4	HODNOCENÍ BIODEGRADACE POMOCÍ MĚŘENÍ PRODUKCE CO ₂	60
10.4.1	Prostředí prvního kompostu	60
10.4.2	Prostředí druhého kompostu	63
10.4.3	Porovnání stupně biodegradace v prvním a druhém kompostu	66
10.5	MIKROSKOPIE VZORKŮ FOLIÍ PO UKONČENÍ BIODEGRADACE	67
	ZÁVĚR	69
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	74
	SEZNAM OBRÁZKŮ	76
	SEZNAM TABULEK	79

ÚVOD

Syntetické plasty jsou hojně využívány v obalovém průmyslu např. jako obaly pro potraviny, léčiva, kosmetiku, prostředky na čištění a chemikálie. Tyto materiály nahrazují papír a výrobky z celulosy, protože mají lepší fyzikální a chemické vlastnosti, jako je jejich pevnost, lehkost a odolnost vůči vodě. Nejpoužívanější plasty pro balení jsou polyetylen (PE), polypropylen (PP), polystyren (PS), polyvinylchlorid (PVC), polyuretan (PUR), poly(etylentereftalát) (PET), poly(butylentereftalát) (PBT). Rozšíření aplikace plastů je nejen díky jejich výhodným mechanickým a tepelným vlastnostem, ale také hlavně pro jejich stabilitu a trvanlivost.

Plastový odpad můžeme skládkovat, spalovat nebo recyklovat. Jejich přetrvávání v našem prostředí má vliv na životní prostředí, včetně škodlivých účinků na volně žijící živočichy a na estetickou kvalitu měst a lesů. Pálením plastů např. PVC plastů vznikají perzistentní organické polutanty (POP) známé jako furany a dioxiny.

Plasty obvykle nejsou přirozeně rozložitelné a jsou považovány za příčinu některých problémů životního prostředí. Pokud jsou polymery skladované v přírodním prostředí, zůstávají zde po dlouhou dobu nerozloženy. V důsledku stále rostoucího problému s odpadními plasty byly navrženy nové polymery, které jsou biologicky rozložitelné.

Biologicky rozložitelné polymery rozlišujeme podle toho, zda jsou založené na obnovitelných (např. polymléčná kyselina) nebo ropných zdrojích (např. poly(butylenadipát)). Tyto materiály vykazují dobrou biologickou rozložitelnost, ale mají nedostačující materiálové vlastnosti. Proto se staly tyto alifatické polyestery středem pozornosti a byly kopolymerizovány s aromatickými polyestery (PBT, PET) pro zlepšení jejich vlastností a takto vznikly alifaticko-aromatické kopolyestery. Aromatické polyestery mají na rozdíl od alifatických vynikající materiálové vlastnosti.

Aromaticko-alifatický kopolyester distribuovaný pod obchodním názvem Ecoflex lze použít jako kompostovací pytle, mulčovací folie, folie pro balení potravin a jiné. Dané materiály musí být odolné při jejich používání a musí být biologicky rozložitelné na konci své životnosti. Zkoumání degra-

dačního procesu a identifikace metabolitů vzniklých mikrobiálním napadením jsou podstatné pro vyhodnocení jejich toxicity a vlivu na životní prostředí. Proto byly tyto polymery sledovány a zkoumán vliv těchto složek na životní prostředí.

Kompostování biologicky rozložitelných obalů je forma využití odpadů, která by mohla snížit rostoucí potřebu nových skládkových kapacit.

V této diplomové práci byla sledována biologická rozložitelnost různých forem materiálu Ecoflex při aerobním kompostování. V tomto prostředí by mělo docházet k rozkladu Ecoflexu termofilními mikroorganismy.

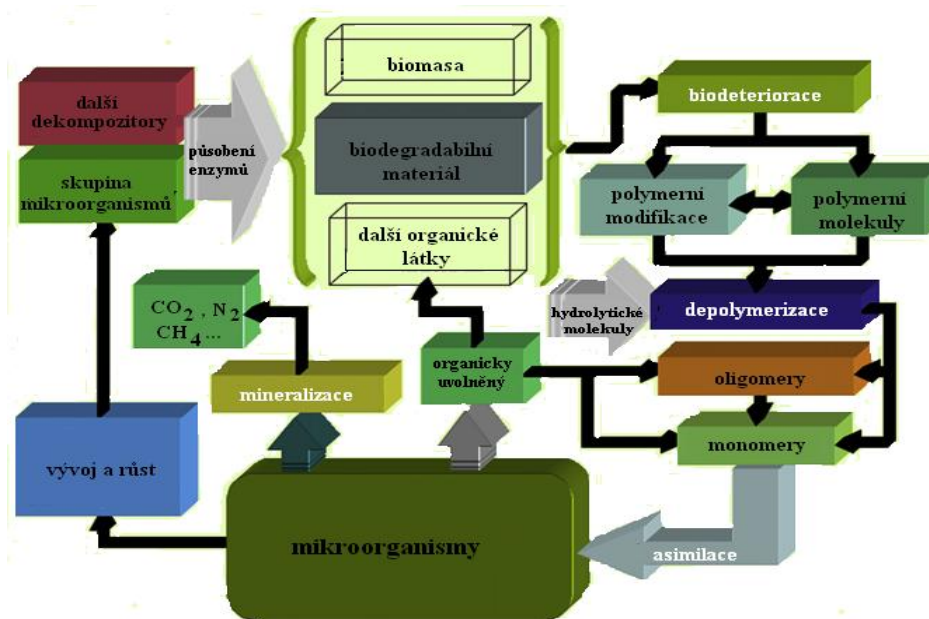
I. LITERÁRNÍ REŠERŠE

1 BIODEGRADACE

Biologicky rozložitelné polymery mohou být biologicky rozloženy mikroorganismy v aerobním přírodním prostředí na oxid uhličitý (CO_2), vodu (H_2O) a novou biomasu, tento pochod se nazývá biodegradace [1, 2, 3]. Biodegradace je ovlivněna zejména teplotou, světlem, živinami, pH, vlhkostí a přítomností kyslíku. Většinou bývá zapříčiněna enzymy, které jsou produkovány mikroorganismy. Mohou být podporovány i jinými procesy, např. abiotickou hydrolýzou, fotodegradací nebo mechanickým narušováním apod. [3].

Biodegradace polymerních materiálů zahrnuje několik kroků [2]:

- **Biodeteriorace** – odbourání materiálu na malé fragmenty působením mikrobiálních kultur a ostatních rozkladných organismů a/nebo abiotických faktorů.
- **Depolymerizace** – mikroorganismy vylučují katalytické látky např. enzymy, které mohou přimknout k polymerním molekulám a postupně snižovat jejich molekulární hmotnost. Tento proces vytváří oligomery, dimery a monomery.
- Některé molekuly rozpoznají receptory mikrobiální buňky a prochází plazmatickou membránou. Ostatní molekuly zůstávají v extracelulárním prostředí a mohou být předmětem různých modifikací.
- **Asimilace** – v cytoplazmě se transportované molekuly začlení do mikrobiálního metabolismu k výrobě energie, výrobě nové biomasy a jako četné primární a sekundární metabolity.
- **Mineralizace** – některé jednoduché a složené metabolity jsou vylučovány do extracelulárního prostředí. Jednoduché metabolity jako je CO_2 , N_2 , CH_4 , H_2O a ostatní soli jsou kompletně oxidovány v prostředí.



Obr. 1 Schéma polymerní biodegradace

Biodeteriorace

Biodeteriorace je převážně výsledkem činnosti mikroorganismů rostoucích na povrchu a/nebo uvnitř daného materiálu. Mikrobiální rozvoj závisí na složení a vlastnostech polymerního materiálu a specifických podmínkách prostředí. Mikroorganismy zapojené do biodeteriorace jsou velmi různorodé a patří sem bakterie, prvoci, řasy, houby a lišejníkové skupiny, které mohou utvářet konsorcia s biofilmy [2].

Depolymerizace

Fragmentace je nezbytný jev potřebný pro následující krok, kterým je asimilace. Polymerní molekuly s vysokou molekulovou hmotností nemohou projít přes buněčnou stěnu nebo cytoplazmatickou membránu. Mikroorganismy mohou využívat různé postupy přimknutí k polymeru např. vylučování specifických enzymů nebo tvorba volných radikálů [2].

- **Fyzikální cesta** – mikrobiální druhy mohou na povrch materiálu přilnout v důsledku vyměšování slizu. Tato látka je vyrobena například z polysacharidů nebo bílkovin, které proniknou porézní strukturou a

mění velikost a distribuci pórů a také stupeň vlhkosti. Odolnost a trvanlivost materiálu je tímto oslabena.

- **Chemická cesta** – extracelulární polymery produkované mikroorganismy mohou působit jako povrchově aktivní látky, které usnadňují výměnu informací mezi hydrofilní a hydrofobní fází. Každý druh mikrobiální flóry se rozvíjí postupně do materiálu a přispívá k chemické biodeterioraci.

Chemolitotrofní bakterie používají anorganické sloučeniny (např. amoniak, dusitany, sirovodík) jako zdroj energie a elektronů. Mohou uvolnit aktivní látky jako kyselinu dusitou (např. *Nitrosomonas sp.*), kyselinu dusičnou (např. *Nitrobacter sp.*) nebo kyselinu sírovou (např. *Thiobacillus sp.*).

Chemoorganotrofní mikroorganismy používají jako organický substrát uhlík jako energii a elektronový zdroj. Uvolňují kyseliny, jako jsou kyselina šťavelová, citronová, glukonová a jiné.

Tyto kyseliny mají různé způsoby reakce, některé mohou reagovat se složkami materiálu a zvýšit erozi povrchu a jiné mohou vázat kationty (např. Ca^{2+} , Al^{3+} , Si^{4+} a další) v matici do stabilních komplexů. Organické kyseliny jsou efektivnější na fixování kationtů než minerální kyseliny.

- **Enzymatická cesta** – některé materiály považované za rezistentní polymery (např. PUR, PVC a polyamid) se řídí mikrobiální biodeteriorací. Zranitelnost těchto polymerů je zapříčiněna biosyntézou lipáz esterázami ureáz a proteáz.

Asimilace

Při asimilaci dochází k začlenění fragmentů polymerního materiálu uvnitř mikrobiální buňky. Tato integrace přináší mikroorganismům potřebné zdroje energie, elektronů a prvků pro vytvoření buněčné struktury. Také umožňuje mikroorganismům růst a reprodukovat se při spotřebě výživných substrátů z prostředí.

Uvnitř buňky molekuly jsou oxidovány skrz katabolickou dráhu vedoucí k výrobě adenosintrifosfátu (ATP) a prvků, které tvoří strukturu buněk. V závislosti na mikrobiální schopnosti růstu v aerobním nebo anaerobním prostředí existují tři základní katabolické dráhy k výrobě energie: aerobní respirace, anaerobní respirace a kvašení.

1.1 Metody pro stanovení biologické degradace [2, 4]

1.1.1 Vizualní hodnocení

Hodnocení viditelné změny může být prováděno téměř ve všech testech. Lze pozorovat zdrsňení povrchu, tvorbu děr nebo prasklin, roztržení, změnu barvy nebo vznik biofilmu na povrchu. Podrobnější informace získáme pozorováním pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) nebo mikroskopie atomárních sil (AFM).

1.1.2 Stanovení zbytkového polymeru

V testech rozkladu můžeme používat stanovení zbytkového polymeru pomocí stanovení hmotnostního úbytku zkušební vzorku. Problémy mohou nastat v případě, kdy se vzorek nadměrně rozpadá. Pro jemně distribuované polymery (prášek) můžeme reziduální polymer stanovit pomocí extrakční techniky.

1.1.3 Uvolněný CO₂/spotřebovaný O₂

Za aerobních podmínek mikroorganismy oxidují kyslík na oxid uhličitý jako jeden z hlavních konečných produktů. Nejčastěji používaná metoda je spotřeba kyslíku (respirometrická metoda) nebo vznik oxidu uhličitého (Sturm test). Tyto metody jsou dobrým ukazatelem biodegradace polymerů. Kromě tradičního zachycování CO₂ v roztoku Ba(OH)₂ s následnou titrací můžeme také použít infračervené a paramagnetické detektory pro CO₂ i O₂.

1.1.4 Změny mechanických vlastností

Indikátorem degradace může být také změna některých vlastností např. pevnost v tahu, které jsou citlivé na změnu molární hmotnosti.

1.1.5 Tvorba jasných zón

Polymerní materiál je rozptýlen v podobě malých částic v syntetickém médiu – agaru. Jestliže se po naočkování mikroorganismů vytvoří jasné zóny, je to důkaz, že organismy jsou schopny depolymerovat tento materiál.

Řadu dalších technik lze využít pro sledování biologické degradace patří k nim infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), nukleární magnetická rezonance (NMR) a rentgenová difrakční analýza (XRD).

1.2 ISO normy a směrnice pro biodegradční testy

Evropská směrnice o obalech (EPD), 94/62/EC (31. prosince 1994) harmonizuje vnitrostátní opatření týkající se nakládání s obaly a obalovými odpady s cílem zabránit či omezit dopad na životní prostředí. Hlavní priorita je kladena na snižování obalového odpadu, znovu využití, recyklaci a snížení konečného množství tohoto odpadu. EPD specifikuje kompostování jako formy recyklace obalových odpadů [5].

Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) je celosvětovou federací národních normalizačních organizací. Práce na přípravu mezinárodních norm je obvykle provedena prostřednictvím ISO technického výboru (TC). V tabulce (Tab. 1) je uveden seznam jedenácti ISO standardů včetně jedné normy pro biodegradaci plastů. Devět standardů je pro testování biologické rozložitelnosti plastů, jeden standard pro specifikaci a jedna norma pro přípravu vzorků. ISO 14855-1 a ISO 14855-2 jsou biodegradční testy v kompostu, ISO 14855-1 je kontrolní test a 14855-2 je laboratorní test [1].

Tab. 1 ISO normy pro biodegradační testy [1]

ISO 14851	Stanovení konečné aerobní biologické rozložitelnosti plastů ve vodném prostředí – Metoda měření kyslíku v uzavřeném respirometru
ISO 14852	Stanovení konečné aerobní biologické rozložitelnosti plastů ve vodném prostředí – Metoda analýzy uvolněného oxidu uhličitého
ISO 14855-1	Stanovení konečné aerobní biologické rozložitelnosti plastů za kontrolovaných podmínek kompostování – Metoda analýzy uvolněného oxidu uhličitého část 1: obecná metoda
ISO 14855-2	Stanovení konečné aerobní biologické rozložitelnosti plastů za kontrolovaných podmínek kompostování – Metoda analýzy uvolněného oxidu uhličitého část 2: gravimetrické měření oxidu uhličitého uvolněného při laboratorním testu
ISO 16929	Stanovení stupně rozkladu plastových materiálů za definovaných podmínek kompostování ve zkušebním měřítku
ISO20200	Stanovení stupně rozkladu plastových materiálů za simulovaných podmínek kompostování v laboratorním měřítku
ISO 17556	Stanovení konečné aerobní biologické rozložitelnosti v půdě měřením spotřeby kyslíku v respirometru nebo oxidu uhličitého, který se vyvinul
ISO 14853	Stanovení konečného anaerobního biologického rozkladu plastů ve vodném prostředí – Metoda měření výroby bioplynu
ISO 15985	Stanovení konečného anaerobního biologického rozkladu a rozklad při anaerobních vyhnívacích podmínkách
ISO 17088	Specifikace pro kompostovatelné plasty
DIN 10210	Příprava zkušebního materiálu pro přípravu biodegradačního testu

2 KOMPOSTOVÁNÍ [3, 6]

Kompostování je přírodní proces recyklace, který využívá mikroorganismy k rozkladu organického materiálu. Aby tento proces fungoval co nejlépe, je důležité, aby mikroorganismy měly nepřetržitou dodávku živin, vody a kyslíku. Kompost můžeme vyrobit z většiny organických produktů – hnůj, kejda, odpady zpracovaných potravin, odpadní voda z čistíren, listy, piliny, tráva a další.

2.1 Definice

Podle US Environmental Protection Agency (EPA) kompostování je biologický rozklad organického materiálu v přítomnosti vzduchu do formy humusu, který je konečným materiálem.

ISO norma kompostování definuje jako termofilní biologický rozklad biologického odpadu (organického odpadu) za přítomnosti kyslíku v přítomnosti mikroorganismů a makroorganismů za vzniku kompostu. Kompost je definován jako organický půdní kondicionér získaný biodegradací směsi skládající se převážně z rostlinných zbytků a příležitostně z jiných organických materiálů, které mají omezený obsah minerálních látek.

Britský standard (PAS 100) definuje kompostování jako proces řízeného biologického rozkladu biologicky rozložitelných materiálů za řízených podmínek, které jsou převážně aerobní a které umožňují vzrůst teploty v důsledku biologicky vyrobeného tepla za vzniku kompostu, který je hygienizovaný a stabilní.

2.2 Metody kompostování

V průběhu kompostování mikroorganismy rozkládají organickou hmotu a produkují oxid uhličitý (CO_2), vodu (H_2O), teplo a kompost dle rovnice /1/:

organická hmota + mikroorganismy + O₂ (vzduch) →

H₂O + CO₂ + kompost + teplo /1/

Existuje mnoho způsobů kompostování organických materiálů a odpadů, zde jsou uvedeny tři základní typy:

- **Metoda v nádobě** – materiál je kompostován uvnitř bubnu, sila, kontejneru nebo jiných struktur. Technologické podmínky jsou sledovány a kontrolovány, materiál se provzdušňuje mechanickým otáčením nebo se rozrušuje.
- **Metoda provzdušňování statické hromady** – formuje kompostovatelný materiál na velké hromady, které jsou provzdušňovány vzduchem, hromada se neobrací.
- **Metoda odpadu soustředěného do podélných hromad** – kompostovatelný materiál je tvořen v podélných hromadách, které jsou mechanicky obraceny.

2.3 Podmínky kompostování

Důležitými parametry jsou teplota, pH, vlhkost a převod kyslíku, který je regulován provzdušňováním, volným vzdušným prostorem a mícháním.

2.3.1 Poměr C/N

Hlavní vlastností je dodávání surovin v poměru C/N. Uhlík a dusík jsou dva nejdůležitější prvky v procesu kompostování, jeden nebo druhý je obvykle limitujícím faktorem. Uhlík slouží jako zdroj energie pro mikroorganismy a část je začleněna do jejich buněk. Dusík je rozhodující pro mikrobiální růst, je složkou proteinu, který tvoří více než 50% bakteriální buněčné hmoty. Jestliže je dusík omezen, mikrobiální populace zůstávají malé a déle jim trvá, než rozloží dostupný uhlík. Doporučený poměr C:N je 25:1 až 40:1.

2.3.2 Vlhkost

Vlhkost vyžaduje rovnováhu mezi mikrobiální aktivitou a obsahem kyslíku. Vlhkost je nezbytná pro proces rozkladu, protože většina rozkladu se děje na povrchu ve formě tenkého kapalného filmu. Přebytečná vlhkost vyplní póry a omezí přenos kyslíku. Vlhkost 40 až 55% se doporučuje pro kompostování.

2.3.3 Kyslík a teplota

Kyslík a teplota jsou spojeny společným mechanismem – provzdušňováním. Zásobuje systém kyslíkem a zároveň odvádí přebytek tepla. Nedosta- tečná hladina kyslíku vede k růstu anaerobních mikroorganismů. Koncentra- ce kyslíku by měla být alespoň 12-14%. Teploty 45°C až 59°C poskytují nej- vyšší rychlost rozkladu, s teplotami nad 59°C se snižuje rychlost rozkladu v důsledku snížení mikrobiální rozmanitosti.

Tab. 2 Optimální podmínky pro aerobní kompostování [6]

Podmínka	Přijatelné	Ideální
Poměr C:N	20:1 až 40:1	25:1 až 35:1
Koncentrace kyslíku	> 5%	> 10% a víc
Obsah vlhkosti	40 - 65%	45 - 60%
pH	5,5 - 9,0	6,5 - 8,0
Teplota	43- 66°C	54-60°C

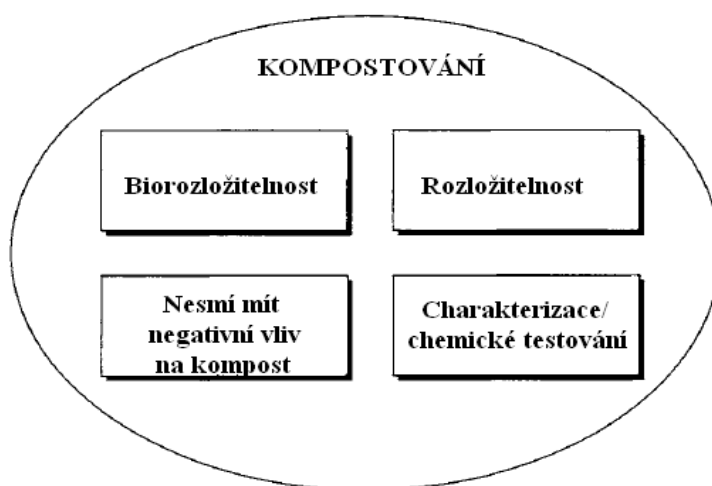
2.4 Kvalita kompostu

Kvalita kompostu odkazuje na celkový stav kompostu s ohledem na fyzikální, chemické a biologické vlastnosti, které ukazují na konečný vliv kompostu na životní prostředí. Kritéria pro kvalitu kompostu závisí na tom, pro jaký účel se kompost bude používat.

Kompost lze použít v mnoha aplikacích v závislosti na kvalitě výrobků a produktů. Vysoce kvalitní kompost je používán v zemědělství, zahradnictví a zahrádkářství. Středně kvalitní kompost může být použit na protierozní a silniční úpravy. Dokonce i málo kvalitní kompost můžeme používat na krytí skládek nebo v rámci projektu rekultivace půdy.

Kritéria kvality zahrnují celou řadu parametrů jako distribuční velikost částic, vlhkost, obsah uhlíku v organické hmotě, koncentrace a složení humusu jako je obsah dusíku a forem dusíku, fosforu a draslíku, těžké kovy, slanost a povaha iontů odpovídající za kationtovou kapacitu, pórovitost, objemová hmotnost, inertní kontaminanty, patogeny a stav zralosti a stability. Nejdůležitější z hlediska norem pro ochranu životního prostředí a zdraví člověka i zvířat jsou údaje týkající se patogenů, organických a anorganických potenciálně toxických látek (těžké kovy, ftaláty, PCB) a stability, dusíkové imobilizace a fytotoxicity.

Stabilita a zralost jsou termíny používané k charakterizaci kompostu. Stabilita ukazuje na odolnost kompostu k dalšímu rozkladu, lze ji měřit respirometrickou metodou. Zralost kompostu se týká vhodnosti pro růst rostlin, někteří autoři tvrdí, že souvisí s humifikací.



Obr. 2 Kritéria pro kompostování [6]

2.5 Účinky skladování vyzrálého kompostu na biologickou rozložitelnost

Kompost byl skladován při teplotách -20°C , 4°C a 20°C pro období 30, 60 a 90 dnů [7].

2.5.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti kompostu

Čerstvý kompost byl sklizen 1 týden po vzniku dozrávací fáze a byl uložen při různých teplotách. Čerstvý kompost obsahoval 65 hm.% vody, po 90 dnech skladování se obsah vody snížil na 59 hm.% bez ohledu na teplotu skladování. Po 30 a 60 dnech se obsah vody stále pohyboval kolem 65 hm%. S dobou skladování se snížil celkový obsah uhlíku a pH. Pokles byl více významný při 20°C než při teplotách 4°C a -20°C . To je dáno fyziologickou aktivitou mikroorganismů. Při teplotě 20°C je větší mineralizace bioasimilovaného uhlíku než při ostatních dvou teplotách.

2.5.2 Mikroorganismy v kompostu

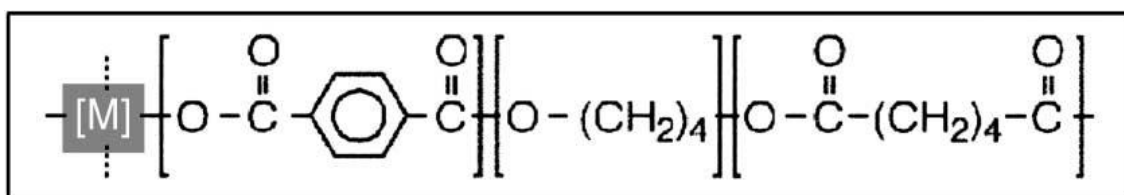
V kompostu uloženém po dobu 30 dní počet mezofilních bakterií klesl dvakrát až třikrát ve srovnání s čerstvým kompostem. Při teplotě skladování -20°C byly pozorovány ledové krystalky, které zvyšují koncentraci solí v kapalně fázi a způsobují osmotický stres na mikroorganismy. Proto se dá očekávat, že životaschopné buňky při teplotě 20°C by měly být četnější než ty uložené při -20°C . Avšak mezofilní bakterie i aktinomyce měly nižší zastoupení v kompostu skladovaném při 20°C než v kompostu skladovaném při dalších dvou nižších teplotách. Buňky termofilních bakterií a termofilních aktinomycet se méně vyskytovaly u kompostu skladovaném při -20°C než v kompostu skladovaném při 20° .

3 ECOFLEX

Firma BASF v roce 1998 uvedla na trh nový typ biologicky rozložitelného kopolyesteru na bázi syntetických surovin pod obchodním názvem Ecoflex. Tento kopolyester, jak tato firma uvádí, je za podmínek kompostování během několika týdnů rozložen, přičemž by neměl zanechávat žádné škodlivé rezidua [8, 9].

Ecoflex splňuje požadavky evropské normy DIN EN 13432, Americké normy ASTM D 6400-04 a japonského GreenPla standardu pro kompostovatelné a biodegradovatelné polymery, protože může být narušen mikroorganismy [9, 10].

Ecoflex je alifaticko aromatický kopolyester založený na monomerech kyseliny tereftalové, kyseliny adipové, 1,4 butandiolu a modulární jednotky (Obr. 3) [8, 9].



Obr. 3 Chemická struktura materiálu Ecoflex (M-modulární jednotka)[8]

3.1 Biodegradace Ecoflexu

Plasty, jako Ecoflex jsou zcela biologicky odbouratelné dle EN 13432, pokud alespoň 90% organického uhlíku v materiálu bylo převedeno v průběhu zkušební doby nepřesahující 180 dnů. Testy biodegradace ukazují, že Ecoflex se rozkládá z 90% za 80 dní [12]. Na základě poznatků z práce [13] alifaticko-aromatický polyester není rozložitelný za anaerobních podmínek pouze za podmínek aerobních.

K biodegradaci Ecoflexu dochází pomocí enzymatické degradace esterových vazeb. Enzymy se váží na polymerní substrát a následně katalyzují hydrolytické štěpení. Polyesterové řetězce musí být dost mobilní, aby dosáh-

ly aktivního místa lipáz, které je obvykle umístěno hluboko v dutině struktury. Vyloučením extracelulárních hydroláz (lipáz) dojde k depolymerizaci polymeru, kdy je molekulární hmotnost polymeru snížena, vytvoří se ve vodě rozpustné produkty (oligomery, dimery, monomery), které jsou přijaty buňkami a metabolizovány na konečné produkty. Není jasné, zda existují enzymy, které jsou schopny štěpit i esterové vazby tereftalové kyseliny. Při štěpení těchto oligomerních meziproductů hraje pravděpodobně velkou roli chemická hydrolýza. [14, 15, 16, 17, 18].

3.2 Faktory ovlivňující biodegradaci

Biologická rozložitelnost polymeru je ovlivněna nejen chemickou strukturou polymerů, přítomností funkčních skupin, rovnováhou mezi hydrofilitou a hydrofobitou, ale také uspořádáním struktury jako je orientace, mobilita, krystalinita, teplota a další morfologické vlastnosti [14].

Protože biodegradace je hydrolytické povahy, jakákoliv změna v krystalinitě a morfologii může ovlivnit degradaci polymerů. Polyestery získané z aromatických dikarboxylových kyselin jsou mnohem méně elektrofilní a tedy mnohem méně citlivé na hydrolýzu než alifatické polyestery [14].

3.2.1 Obsah kyseliny tereftalové

V této práci [18] se uvádí, že obsah kyseliny tereftalové asi 30 mol% snižuje degradační rychlost až o jeden řád při porovnání s čistým poly(butylenadipátem). Pokusy prováděné Müllerem ukazují, že biologická rychlost rozkladu klesá s přibývajícím množstvím kyseliny tereftalové. Nad 60 mol% kyseliny tereftalové rychlost rozkladu klesne tak, že se takový kopolymer může označit jako biologicky nerozložitelný [16].

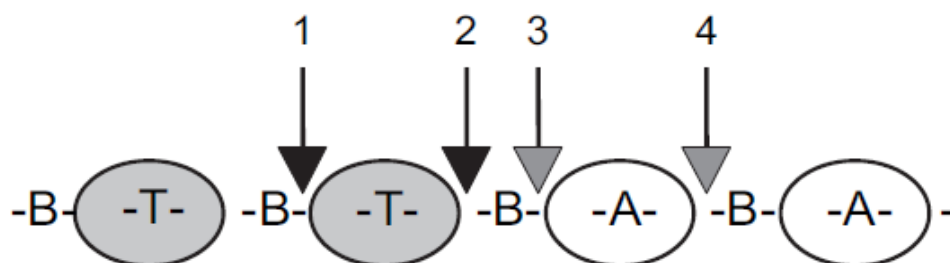
Vliv obsahu kyseliny tereftalové byl také prokázán v práci [20], kdy byly připraveny kopolyestery s obsahem kyseliny tereftalové 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 a 90 mol%. Následně byla sledována biodegradace

v kompostu a bylo pozorováno, že kopolyester s obsahem 10 a 20 mol% byl rozložen za 2 týdny zatímco kopolyester s obsahem 30 % za 4 týdny. Biodegradace u polymerů s obsahem 70 mol% a výše byla prakticky nulová.

3.2.2 Struktura polymerního řetězce

Pro zkoumání vlivu struktury kopolyesteru na biologickou rozložitelnost byly v této práci [18] syntetizovány speciální modely alifaticko-aromatického kopolyesteru. Polymerní materiál byl připraven ze směsi v poměru 50:50 kyseliny tereftalové a adipové, z něho byl připraven střídavý pravidelný BTA_{alter} 50:50, náhodný kopolyester BTA 50:50 a blokový kopolyester BTA_{block} 50:50. Tento postup nabízí možnost porovnat polymery se stejnou celkovou strukturou, ale s různým typem esterových vazeb.

Při pohledu na mikrostrukturu polyesteru můžeme pozorovat čtyři různé ester vazby, určitý podíl se nachází mezi dvěma aromatickými kyselinami, další jsou v okolí pouze mastných kyselin a dva druhy ester vazeb spojují alifatické a aromatické regiony v polymeru (obr. 4). V kopolyesteru BTA_{alter} 50:50 existují pouze 2 typy ester vazeb typ 2 a typ 3, BTA_{block} obsahuje dlouhé alifatické a aromatické oblasti dlouhých délek, kde dominují alifaticko-alifaticko ester vazby (typ 4) a aromaticko-aromaticko ester vazby (typ 1).



Obr. 4 Příklad čtyř odlišných ester vazeb v náhodném BTA kopolyesteru. B: 1,4- butandiol, T: tereftalová kyselina A: adipová kyselina [18]

Provedené experimenty ukazují, že rychlost rozkladu nutně nesouvisí s počtem alifatico-alifatico ester vazeb v polymeru. BTA_{block} , kde tento typ (4) dominoval, ukázal jen malou degradaci jak při 50°C tak i při 37°C. Náhodný kopolyester vykazoval srovnatelnou degradační rychlost, i když měl výrazně méně těchto vazeb než blokový kopolyester.

Výsledky této práce ukazují, že délka alifatických sekvencí v kopolymeru nesouvisí s biodegradační rychlostí.

3.2.3 Mobilita a délka polymerních řetězců

Pohyblivost polymerních řetězců je hlavní a obecný kontrolní faktor pro biologickou rozložitelnost polyesteru [18].

V práci [14, 16] se uvádí, že dlouhé aromatické sekvence jsou biologicky neodbouratelné, proto se předpokládá, že aromatické oligomery mohou zůstat při mikrobiálním útoku nerozložené. Rozložitelnost aromatických oligomerů neklesá neustále s délkou sekvence, ale oligomery obsahující jednu nebo dvě tereftalové kyseliny mohou být rychle degradovány a metabolizovány. V pokusech popsanych v této práci se uvádí, že dlouhé aromatické sekvence zůstaly téměř nedotčené, což se vysvětluje vztahem rozpustnosti a dostupnosti oligomerů různých délek pro intracelulární procesy.

Degradační testy s oligomery syntetizovanými z 1,4-butandiolu (B) a tereftalové kyselin (T) ukazují, že BTB a BTBTB sekvence jsou rychleji degradovány mikroorganismy, zatímco dlouhé aromatické oligomery vykazují velkou rezistenci [21].

3.2.4 Hydrofilita a hydrofobita polymeru

Hydrofilní a hydrofobní charakter syntetických polymerů výrazně ovlivňuje jejich biodegradabilitu. Autoři práce tvrdí, že polymery, které obsahují jak hydrofilní tak hydrofobní segmenty mají vyšší biologickou rozložitelnost než ty, které obsahují pouze jeden z těchto segmentů [19].

3.2.5 Krystalinita polymeru a bod tání

Stupeň krystalinity je jedním z hlavních faktorů určující biodegradaci. Ta začíná ve fázi amorfni a pokračuje do fáze krystalické. Struktura tohoto polymeru ukazuje, že krystalická oblast je tvořena kyselinou tereftalovou a amorfni oblast je tvořena kyselinou adipovou [14].

Syntetické polymery mají většinou krátké opakující se jednotky, které zvyšují pravidelnost krystalizace i hydrolizovatelných skupin nepřístupných enzymům. Syntetické polymery s dlouhými jednotkami opakování by měly méně krystalizovat a proto být lépe rozložitelné [19].

Dle studie [18] má také významný vliv na rozložitelnost, jak pevně je polymerní řetězec vázán v krystalické oblasti. To ovlivňuje teplotu tání (T_m) daného materiálu. Délka alifatických segmentů neurčuje rychlost biodegradace, ale řídicím faktorem je délka aromatických řetězců. Dlouhé aromatické sekvence mají za následek vysokou T_m a proto nízkou biodegradaci rychlost.

V následující práci [20] byl připraven BTA s různým obsahem kyseliny tereftalové od 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 a 90 mol.%. Pro jednotlivé kopolymery byla měřena T_m , která při obsahu 10 a 20 hm% kyseliny tereftalové klesala a následně došlo k jejímu nárůstu. Naměřené hodnoty ukazují, že čím je větší obsah kyseliny tereftalové v kopolyesteru, tím roste T_m pro daný kopolyester.

Také rozdíl mezi T_m a teplotou při které probíhá biodegradace (T_t), může být použita ke stanovení biologické rozložitelnosti. To je dáno tím, že T_m charakterizuje polymerní řetězec a T_t je spojená se schopností polymerních řetězců proniknout dočasně k mikroorganismům.

3.2.6 Molekulová hmotnost

Plasty zůstávají relativně imunní vůči mikrobiálnímu útoku, pokud jejich molekulová hmotnost zůstává vysoká [18, 19]. Naopak monomery, dimery a oligomery polymerů jsou velmi snadno degradovány a mineralizovány. Vysoká molekulová hmotnost má za následek pokles rozpustnosti, což je

nepříznivé pro mikrobiální útok, protože bakterie vyžadují substrát, aby prošly skrz membránu a byly dále degradovány buněčnými enzymy [18].

Například polyetylen, který je odolný vůči mikrobiálnímu útoku, se stává biologicky rozložitelný při molekulové hmotnosti nižší než 500. Jestliže molekulová hmotnost překročí kritickou hodnotu (cca $4,0 \cdot 10^4$), její vliv na biodegradaci se zmenší [20].

3.3 Vlastnosti

Aromatické polymery sice vykazují vynikající materiálové vlastnosti, ale ukazují se být odolné vůči mikrobiálnímu útoku. Naopak alifatické polyesteru jsou biologicky rozložitelné, ale postrádají vlastnosti důležité pro aplikace. Většina konvenčních biologicky rozložitelných plastů na bázi alifatických polyesterů vykazují nižší T_g a vyšší T_m a tak jejich zpracovatelnost někdy nestačí na splnění požadavků, i když mají dobrou biologickou rozložitelnost. Proto vědci pracovali na rozvíjení nových biodegradabilních plastů, kdy je spojená biologická rozložitelnost s dobrými materiálovými vlastnostmi. Tak byly vyvinuty alifaticko-aromatické kopolyestery [14,18].

Směs dvou nebo více složek polyesteru může být upravena do bloků nebo náhodně umístěna v závislosti na stupni transesterifikačních reakcí za zvýšené teploty v přítomnosti katalyzátoru. Pomocí této metody mohou být segmenty biologicky rozložitelného materiálu zavedeny do biologicky nerozložitelných polymerů a průměrné délky jednotlivých sekvencí mohou být kontrolovány [14].

Vlastnosti jsou navrženy tak, aby splňovaly požadavky pro biologicky rozložitelné plasty, to znamená spojení zpracovatelnosti, využitelných vlastností a biologické rozložitelnosti [8].

Mechanické vlastnosti Ecoflexu jsou srovnatelné s nízko hustotním polyetylenem (LDPE). Folie z tohoto materiálu jsou odolné proti roztržení, jsou flexibilní a také odolné vůči vodě a kolísání vlhkosti. Hustota tohoto materiálu je $1,25 \text{ g/cm}^3$, což přesahuje hustotu LDPE o 35%. Viskozita taveniny je 2,5 - 4,5 ml/10 min a tedy výrazně vyšší než u LDPE (0,8 - 1,2 ml/10

min). Oba plasty jak Ecoflex tak LDPE mají teplotu tání v rozmezí 110 - 120°C. Propustnost pro vzduch je u LDPE přibližně dvakrát větší než u Ecoflexu, ale naopak propustnost vodní páry je u Ecoflexu vyšší, jedním z důvodů je vyšší polarita tohoto materiálu [8, 9]. Tabulka (Tab.3) shrnuje základní vlastnosti materiálu Ecoflex.

Tab. 3 Základní vlastnosti materiálu Ecoflex [10]

Vlastnost	Hodnota pro Ecoflex	Jednotka
Hustota	1,25 - 1,27	g/cm ³
Bod tání	110 - 120	°C
Teplota skelného přechodu	-30	°C
Tvrдость dle Shorea	32	-
Průhlednost	82	%
Pevnost v tahu	35/44	N/mm ²
Mez pevnosti v tahu	36/45	N/mm ²
Protažení při přetržení	560/710	%
Objemová rychlost tání	2,5 – 4,5	ml/10min
Rychlost toku taveniny	2,7 - 4,9	g/10min
Propustnost kyslíku	1200	cm ³ /m ² .d.bar
Propustnost vodní páry	135	g/m ² .d

3.4 Aplikace

Čistý Ecoflex je vhodný pro přípravu folií, především pro oblast obalů a zemědělských mulčovacích folií. Ecoflex může být zpracován běžným vyfukováním folií jako LDPE, tyto folie následně mohou být potištěny a svařovány konvenčním zařízením používané pro LDPE [8, 9].

Obaly vytvořené z Ecoflexu zaručují vysokou odolnost proti vlhkosti, tukům a kolísání teploty, proto jsou ideální pro potahování papírových obalů, kelímky na pití, obaly z rychlého občerstvení a obaly pro mražené potraviny [9].

Dalším využitím jsou také pytle pro organický odpad, které se mohou rovnou kompostovat. Ecoflex splňuje požadavky pro tyto kompostovací pytle jako odolnost proti vlhkosti a doba po kterou zůstává stabilní vůči organickému odpadu [8].

Folie z Ecoflexu mohou být použity v zemědělství jako mulčovací folie, kde se po sklizni jednoduše zaorají a poté se biologicky rozloží. Použití těchto folií zaručuje vyšší výnosy, časnější sklizeň a lepší kvalitu úrody [8, 9].

Ecoflex může být také používán jako pleteniny, kde je jejich biologická rozložitelnost výhodou. Vyfukováním se dají rovněž připravit průhledné folie, které mohou být použity pro různé balení potravin [8].

Biologicky rozložitelné kompozita (např. bramborový nebo kukuřičný škrob, polymléčná kyselina (PLA)) v kombinaci s Ecoflexem zlepšují vlastnosti obalových materiálů. Obaly na potraviny vyrobené z těchto obnovitelných surovin jednoduše přejdou do kompostu, kde jsou kompletně biologicky rozloženy [9].

3.5 Toxicita alifaticko-aromatického kopolyesteru

Pro ekologicky bezpečné použití plastů, které podléhají degradaci, je důležité prokázat, že meziprodukty degradace nemají žádný ekotoxický účinek. Ekologické vlastnosti Ecoflexu byly zkoumány v rozsáhlých testech s verdiktem, že nemá žádné negativní důsledky pro přírodu a životní prostředí. Ekologické testy (test s ječmenem letním, perloočkou *Daphnia magna* a *Photobacterium phosphoreum*) prokázaly, že Ecoflex nezanechává žádná toxická rezidua [9, 21].

3.5.1 Test s ječmenem letním

Tento test se zaměřuje na účinek zkoumané látky na růst ječmene letního. Pro testování byly připraveny dva vzorky, jeden obsahoval 75% referenční půdy a 25% kompostu s přídavkem Ecoflexu a druhý vzorek obsahoval 50% referenční půdy a 50% kompostu s Ecoflexem. Oba komposty byly kompostovány po dobu 12 týdnů [9].

Testování kompatibility je zde klíčovým parametrem. Kompost je uznán jako kompatibilní k rostlině, pokud je dosaženo 90% výnosu ječmene. V tomto testu se neprokázaly žádné negativní vlivy na výnos ječmene [9].

3.5.2 Test s perloočkou *Daphnia magna*

V tomto testu se stanovuje toxicita ve vodě rozpustných produktů, což je obzvlášť důležité, protože se mohou dostat do podzemních vod nebo snadněji vstřebávat do organismů. Test je založen na sledování imobilizace perlooček v různých koncentracích testované látky při pH 7 a teplotě 20°C. Do každého vzorku je umístěno 10 perlooček, po 24 hodinách se počítá počet plovoucích jedinců. I v případě nízkého ředění ještě 9 perlooček plavalo, tento test byl úspěšný a neprokázal žádné toxické vlivy [9, 21].

3.5.3 Test s *Photobacterium phosphoreum*

Photobacterium phosphoreum je luminiscenční bakterie. Zde se stanovuje snížení fotoemise po 30 minutách inkubace Ecoflexu s touto bakterií. Snížení fotoemise bylo nižší než 20% a tudíž se usoudilo, že Ecoflex není toxický [21].

4 BIOLOGICKÁ DEGRADACE ALIFATICKO- AROMATICKÉHO KOPOLYESTERU ECOFLEXU

4.1 Mezofilními mikroorganismy

Mezofilní mikroorganismy vyžadují pro svůj optimální růst teploty 30 - 37°C. Vyskytují se nejčastěji ve vodách a v půdách.

V práci [15] bylo 29 různých aerobních bakterií, kvasinek a plísní izolovaných z půdy pěstováno na různých médiích v přítomnosti alifatickoaromatické kopolyesteru Ecoflex. Ecoflex pro tento pokus poskytla firma BASF ve formě granulí, které byly následně zpracovány na folie pomocí odlévání. Inkubace byla prováděna při 30°C v rotační třepačce při 200 ot/min po dobu 21 dní. Degradace byla sledována úbytkem hmotnosti materiálu. Po ukončení inkubace byly folie odstraněny z nádob pro biodegradaci a opláchnuty destilovanou vodou a etanolem pro odstranění případné biomasy. Folie byly nechány po 24 hodin uschnout a následně byly váženy na kalibrovaných elektronicko-analytických vahách k určení jejich hmotnosti po expozici každého mikrobiálního kmene. Změny v hmotnosti ukazují, že některé mezofilní mikroorganismy jsou schopny degradovat polymerní folie. Nejvíce patrná byla tato změna u bakterie *Paecilomyces lilacinus*, kdy byla pozorována i vizuální změna. Podrobnější studie byla provedena s bakterií *Bacillus subtilis*, aby se izolovaly případné meziprodukty rozkladu. Gelová permeační chromatografie (GPC) použita pro měření molekulové hmotnosti, prokázala úbytek nízkomolekulární frakce polymeru po inkubaci s touto bakterií. Enzymy přednostně degradovaly složky s nižší molekulovou hmotností ve směsi ve srovnání s delšími řetězci. Podobné záznamy byly získány i pro *Penicillium pinophilum* a *Paecilomyces lilacinus*. Sloučeniny vzniklé degradací byly sledovány plynovou chromatografií (GC). Očekávané produkty rozkladu jako kyselina adipová a kyselina tereftalová byly pozorovány, ale butanol, který by se dal také očekávat, nebyl pozorován. Avšak žádný z těchto 29 kmenů nebyl schopen po 21 dnech způsobit rozsáhlý biologický rozklad, to bylo přisuzováno teplotě, při které byl pokus prováděn.

Ve studii [22] byla zkoumána degradační činnosti mezofilních kmenů, které měly schopnost tvořit jasné zóny na misce obsahující emulgovaný alifaticko-aromatický kopolyester a to poly(butylenadipát-co-butylenetereftalát) (PBAT) při 30°C. Tyto kmeny zahrnovaly 3 plísňové kmeny (NKCM1712, NKCM1713, NKCM 2510) a 2 gram pozitivní bakteriální kmeny (NKCM2511 a NKCM2512). Výsledky analýz naznačují, že všechny 3 druhy plísní patří do kmene *Ascomycota*. Kmeny hub patřící do tohoto kmene *Ascomycota* byly hlavní skupinou, která může rozkládat PBAT v mezofilním prostředí. Bylo zjištěno, že rychlost degradace těmito kmeny byla mnohem pomalejší než při degradaci termofilními mikroorganismy. Za účelem prověření přínosu NKCM1712 k degradaci v půdě byla provedena zkouška s nesterilní půdou, která obsahuje nebo ji chybí tento kmen při 30°C. V půdě obsahující kmen se zvýšila rychlost degradace filmu lineárně po dobu 5 dní, po době inkubace 20 dní se film začal rozpadat. Po 30 dnech byla ztráta hmotnosti zhruba 40% ($2,0 \pm 0,2 \text{ mg.cm}^{-2}$). V půdě bez tohoto kmene byla rychlost degradace podstatně nižší ($0,5 \pm 0,1 \text{ mg.cm}^{-2}$), než u půdy která tento kmen obsahovala. To znamená, že míra rozkladu v půdě byla přidáním tohoto kmene NKCM1712 zrychlena přibližně čtyřikrát.

4.2 Termofilními mikroorganismy

V tomto testu byla sledována biodegradace Ecoflexu ve formě folie o tloušťce 50 μm s termofilní aktinomycetou druhu *Thermobifida fusca* (*T. fusca*), pokus probíhal po dobu 21 dní a již po 4 dnech rozklad alifaticko-aromatického kopolyesteru mohl být pozorován vizuálně. Pomocí GC analýzy bylo sledováno složení rozpustných meziproductů. Bylo detekováno jen nevýznamné množství rozpustných diolů a dvojsytných kyselin, aromatické a alifatické oligomery se vyskytly jen v malé míře. Prokázalo se, že samotná *T. fusca* špatně degraduje vzniklé oligomery a monomery. Tento poznatek byl demonstrován na pokusu, ve kterém probíhala degradace s čistou kulturou aktinomycety po 7 dní, poté test pokračoval po další 2 týdny se směsnou kulturou. Na chromatogramu zmizely všechny peaky ve vodě rozpustných meziproductů. Tento test byl potvrzen testem, ve kterém byl 1,4-butandiol, adipát sodný a

tereftalát sodný rozpuštěn v syntetickém médiu naočkovaném směsnou kulturou z kompostu. Degradace byla sledována pomocí vývoje CO₂. Po lagové fázi byly všechny látky rychle mineralizovány směsnou mikrobiální kulturou. V dalším pokusu byl kopolyester Ecoflex použit v pětinasobné koncentraci. Degradace pomocí aktinomycet se zastavila po změně pH způsobené produkcí kyselin. Výsledky ukazují, že během degradace s kmenem aktinomycety byly uvolněny alifatické a aromatické oligomery a ty byly následně hydrolyzovány na monomery, které byly ochotně metabolizovány směsnou kulturou [21].

V práci [17] syntetizovali náhodný alifaticko-aromatický kopolyester složený z kyseliny tereftalové, adipové a 1,4-butandiolu, ze kterého připravili folie o tloušťce 100 μm. Byly připraveny kopolyestery BTA 40:60 (40 mol% kyseliny tereftalové a 60hm.% kyseliny adipové) a BTA 60:40. Z přibližně 6 měsíců starého vyzrálého kompostu byly izolovány aerobní degradační kmeny, které byly použity pro rozklad BTA filmů. Termofilní aktinomycety mezi těmito mikroorganismy mají významnou roli a zdá se, že ovládají první krok degradace. Ukazatelem pro rozklad byl opět stanoven úbytek polymerního materiálu po 14 dnech inkubace. Inkubace byla prováděna se směsí mikroorganismů při teplotách 20°C, 40°C a 50°C. Při teplotách vyšších než 40°C vyšly nejlepší výsledky, proto se Kleeberg a spol. zaměřili především na termofilní mikroorganismy. Z 30 bakterií, které byly hlavně aerobní endosporové tyčky, bylo jen 5 kmenů, které byly schopny rozkládat BTA 40:60 kopolyester. Tři z těchto kmenů prokázaly jen slabou degradaci (ztráta hmotnosti 0,06 až 0,15 mg/týden.cm²) a dva kmeny byly schopny rozložit tento kopolyester. V rámci skupiny termofilních aktinomycet pouze 4 z 29 izolátů neprokázaly výraznou degradační činnost. Dvě nejaktivnější z těchto aktinomycet vykazovaly asi dvacetkrát větší degradaci než ostatní kultury a byly identifikovány jako *T. fusca*. Proto tato aktinomyceta byla použita pro další pokusy, kdy po 7 dnech inkubace došlo k 90 % rozpadu polymerní folie. Bylo prokázáno, že rychlost degradace polymeru s *T. fusca* byla až desetkrát vyšší než s použitím adaptované směsné kultury z kompostu. Rozklad folie BTA 60:40 nebyl tak výrazný

Následující práce [8] taktéž ukazuje, že mikroorganismy (*T. fusca*) mohou rozštěpit polymerní vazby Ecoflexu, ale nejsou schopny metabolizovat vzniklé degradační meziprodukty. Po 22 dnech při 55°C bylo více jak 99,9% polymeru

depolymerizováno. Vzniklé produkty a meziprodukty byly detegovány pomocí plynové chromatografie, byla zjištěna přítomnost 1,4-butandiolu, tereftalátu a adipátu.

V Kanadě prováděli pokus [15], kdy byl připraven náhodný kopolyester polymerizací z diesterů kyselina adipová/butandiol a kyselina tereftalová/butandiol. Degradace tohoto kopolyesteru byla zkoumána v prostředí kompostu nebo s izoláty z kompostu. Pokus s kompostovými izoláty byl prováděn za zvýšené teploty s *T. fuscou* a hydrolázami izolovanými z tohoto kmene. Výsledky testů prokázaly rychlý rozklad alifaticko - aromatického kopolyesteru, který během 21 dnů dosáhl v podstatě kompletní degradace.

II. MATERIÁLY A METODIKA

5 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

5.1 Chemikálie

Použité chemikálie v laboratorních testech byly čistoty p. a.

$(C_6H_{10}O_5)_n$	Celulosa mikroskopická
$Na_4P_2O_7$	Difosforečnan sodný
KH_2PO_4	Dihydrogenfosforečnan draselný
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	Dusičnan kobaltnatý hexahydrát
$NaNO_3$	Dusičnan sodný
CH_3CH_2OH	Etanol
CH_2O	Formaldehyd
$C_6H_{12}O_6$	Glukosa
$C_5H_8O_2$	Glutaraldehyd
$C_3H_5(OH)_3$	Glycerol
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát
$Ba(OH)_2$	Hydroxid barnatý
$NaOH$	Hydroxi sodný
NH_4Cl	Chlorid amonný
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Chlorid vápenatý dihydrát
$NaCl$	Chlorid sodný
H_3BO_3	Kyselina boritá
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	Molybdenan amonný tetrahydrát
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Síran hořečnatý heptahydrát
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	Síran manganatý pentahydrát

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Síran měďnatý pentahydrát
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Síran zinečnatý heptahydrát
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Síran železnato-amonný hexahydrát
Směsný syntetický plyn obsahující	CH_4 (4,04 obj.%)
	CO_2 (0,799 obj.%)
	N_2 (95,161 obj.%)

5.2 Roztoky

Minerální médium se sníženým obsahem hořčnatých solí

Minerální médium (MM) slouží mikroorganismům jako zdroj živin a také zvlhčuje prostředí. Na přípravu 100 ml MM byly použity následující roztoky o daných koncentracích:

Roztok A (KH_2PO_4)	4,0 ml
Roztok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)	16,0 ml
$\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (c = 10g/l)	0,2 ml
NH_4Cl (c = 30g/l)	1,0 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (c = 1g/l)	1,0 ml
NaCl (c = 50g/l)	1,0 ml
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (c = 10g/l)	1,0 ml
Roztok stopových prvků	0,1ml

Vzniklý roztok byl doplněn destilovanou vodou na celkový objem 100 ml a následně sterilizován v autoklávu při 125°C po dobu 30 minut.

Roztok stopových prvků

Pro přípravu 1000ml roztoku stopových prvků bylo použito:

MnSO ₄ · 5H ₂ O	0,043 g
H ₃ BO ₃	0,057 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,043 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,037 g
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,025 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,040 g

Fyziologický roztok (c = 8,5 g.l⁻¹)

Pro přípravu 100 ml fyziologického roztoku bylo do odměrné baňky diferencně naváženo 0,85 g NaCl a doplněno po rysku destilovanou vodou a následně byl roztok vysterilizován při 125°C po dobu 30 minut v autoklávu.

Suspendační roztok

Pro přípravu 100 ml suspenčního roztoku bylo použito:

Tween 80	0,15 g
Na ₄ P ₂ O ₇	0,40 g
NaCl	0,50 g

Navážené množství bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody a sterilizováno při 125°C po dobu 30 minut v autoklávu.

Fixační roztok

Tento roztok byl použit pro zafixování vzorku folií Ecoflexu k mikroskopii. Pro přípravu 50 ml roztoku bylo použito:

CH ₂ O	5,5 ml
C ₅ H ₈ O ₂	1 1 ml
Fyziologický roztok	43,5 ml

5.3 Živná média

Trypton Yeast agar (TYA)

Trypton Yeast agar patří mezi univerzální živná média. Pro přípravu 1000 ml bylo naváženo 21 g TYA agaru a rozpuštěno v 1000 ml destilované vodě a sterilizováno při 125°C po dobu 30 minut v autoklávu. Po ochladnutí byla živná půda krouživým pohybem promíchána a rozlita do Petriho misek.

Actinomycete isolation agar

Pro přípravu 500 ml bylo použito:

Agar	11,0 g
C ₃ H ₅ (OH) ₃	2,5 ml

Všechny složky byly smíchány doplněny destilovanou vodou a sterilizováno při 125°C po dobu 30 minut v autoklávu. Po ochladnutí byla živná půda krouživým pohybem promíchána a rozlita do Petriho misek

Půdní agar s bengálskou červení

Pro přípravu 200 ml bylo použito:

Základ	6,0 g
C ₆ H ₁₂ O ₆	2,0 g
NaNO ₃	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g

Chloramfenikol	0,012 g
Agar	3,6 g
Bengálská červeň 1%	1,4 ml
Trypton	200 mg

Všechny složky byly smíchány doplněny destilovanou vodou a sterilizováno při 125°C po dobu 30 minut v autoklávu. Po ochladnutí byla živná půda krouživým pohybem promíchána a rozlita do Petriho misek.

5.4 Použité přístroje a zařízení

Analytické váhy KERN 770, Německo

Aseptický laminární box Telstar, Španělsko

Elektronový mikroskop VEGA LMU, Tescan s.r.o.

Hlubokomrazící box Biotech, Dánsko

Diferenční skenovací kalorimetr Pyris 1, USA

Laboratorní autokláv LaM-320 Sanoclav, Německo

Mikroskop CX 41 Olympus, Japonsko

Plynový chromatogram Agilent 7890 A, USA

Plynotěsná dávkovací stříkačka Hamilton o objemu 100 µl, USA

Tedlarový vak o objemu 0,6 l

Laboratorní autokláv LaM-320 Sanoclav, Německo

Laboratorní pec LH09MT LAC, Německo

Další běžně používané skla a přístroje, které jsou běžným vybavením laboratoří.

6 CHARAKTERISTIKA TESTOVANÉHO MATERIÁLU

6.1 Referenční materiál

Jako referenční látka byla použita **mikrokrystalická celulosa**.

6.2 Testovaný materiál

Testovaný materiál **Ecoflex** byl dodán společností BASF spol. s.r.o. ve formě bílých granulí. Tyto granule byly zpracovány a připraveny z nich různé formy materiálu.

Formy materiálu Ecoflex:

- Folie o tloušťce 100 – 150 μm
- Folie o tloušťce 150 – 300 μm
- Prášek
- Tenký povlak na perlitu

6.3 Příprava různých forem materiálu Ecoflex

Všechny tyto formy materiálu Ecoflex byly připraveny Ing. Petrem Stloukalem.

Folie o tloušťce 100 – 150 μm

Tato forma materiálu se připravuje za použití ručního etážového lisu. Teplota pro přípravu byla 140°C. Navážka granulí Ecoflex o tloušťce 100 – 150 μm byla vypočtena:

$$m = a \cdot b \cdot c \cdot \rho \quad /1/$$

kde	m	navážka Ecoflexu	[g]
	a,b	rozměry lisovací desky	[cm]
	c	požadovaná tloušťka folie	[cm]
	ρ	hustota materiálu Ecoflex	[g . cm ⁻³]

Takto připravené folie byly za aseptických podmínek práce nastříhané na kousky o rozměrech cca 4 x 8 mm. Tloušťka této folie je minimální, kterou jsme schopni připravit.

Folie o tloušťce 150 – 300 μm

Tato forma materiálu se připravuje za použití ručního etážového lisu. Teplota lisování byla 140°C. Navážka granulí Ecoflex o tloušťce 150 – 300 μm byla vypočtena dle vzorce /2/.

Takto připravené folie byly za aseptických podmínek práce nastříhané na kousky o rozměrech cca 4 x 8 mm.

Prášek

Vzorek Ecoflexu ve formě prášku byl připraven pomocí vysrážení. Do chloroformového roztoku Ecoflexu byl přidáván nadbytek etanolu v dvojnásobném množství než byl objem chloroformového roztoku. Vzniklá sraženina byla přefiltrována a takto vzniklý prášek byl po dobu 24 hodin nechán v digestoři pro odpaření rozpouštědla.

Tenký povlak na perlitu

Nejdříve byl připraven chloroformový roztok Ecoflexu o koncentraci 50 mg/ml navážením 2,5 g granulí a rozpuštěním v 50 ml chloroformu. Následně bylo 10 ml chloroformového roztoku dávkováno do lahví s obsahem 6,67 g perlitu a důkladně promícháno. K odstranění přebytečného rozpouštědla byla láhev vyfoukávána vzduchem po dobu 24 hodin.

7 CHARAKTERISTIKA SUBSTRÁTU

V našem případě sloužily jako substrát dva druhy kompostu, které se od sebe lišily dobou zrání a zastoupením mikroorganismů. Pro první pokus byl použit průmyslový kompost od firmy AGRO CS, a.s. Tento kompost byl skladován po dobu jednoho roku. Druhý kompost byl zahradnický kompost bez bližší specifikace, skladován byl podobu půl roku.

7.1 Sušina kompostu

Na předem zváženou Petriho misku bylo naváženo $5 \text{ g} \pm 0,0001$ kompostu a sušeno při 105°C do konstantní hmotnosti. Po vychladnutí na pokojovou teplotu v exsikátoru byla miska zvážena $\pm 0,0001$ a z rozdílu hodnot byla vypočtena sušina. Pro každý vzorek kompostu byly stanoveny sušiny 3 krát vedle sebe.

7.2 Spalitelný podíl

Do zváženého a vyžíhaného kelímku bylo naváženo $0,6 \text{ g}$ kompostu $\pm 0,0001 \text{ g}$, který byl následně žihán v muflové peci při 550°C po dobu 2 hodin. Po žihání byl kelímek nechán zhládnout v exsikátoru a zvážen, z úbytku hmotnosti byl vypočten spalitelný podíl.

7.3 Mikrobiální rozbor kompostu

Rozbor kompostu byl proveden u obou druhů použitých kompostů, účelem bylo zjistit počet psychrotrofních, termofilních a mezofilních bakterií, termofilních aktinomycet a vláknitých plísní.

Do 100 ml sterilního suspenzačního roztoku bylo naváženo 10 g kompostu a 15 minut protřepáváno, aby se buňky mikroorganismů uvolnily z částic kompostu. Po uplynutí této doby byl kompost ze směsi nechán sedimentovat a supernatant byl ředěn desetinou řadou od 10^{-1} až do 10^{-5} .

Stanovení termofilních a mezofilních bakterií a celkového počtu bakterií

Pro kultivaci byl použit Trypton Yeast agar. Na jednotlivé kultivační misky bylo očkováno 100 μl ze zkumavek s ředěním 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Tímto dávkováním bylo dosaženo ředění 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Pro každé ředění byly použity vždy dvě misky vedle sebe. Kultivace byla prováděna při 58°C po dobu 14 dní pro termofilní bakterie, při 37°C po dobu 7 dní pro mezofilní bakterie a při 25°C po dobu 7 dní pro psychrofilní počet bakterií.

Stanovení počtu aktinomycet

Kultivace byla prováděna na Actinomycete isolatio agaru. Na Petriho misky bylo očkováno 100 μl ze zkumavek s ředěním 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , kdy bylo dosaženo ředění 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Pro každé ředění bylo očkování provedeno 2krát vedle sebe. Kultivace probíhal při 58°C a při 37°C po dobu 7 dní.

Stanovení počtu plísní

Kultivace probíhala na půdním agaru s bengálskou červení. Na Petriho misky bylo očkováno 100 μl ze zkumavek s ředěním 10^{-1} , 1 ml neředěného supernatantu a 0,1 ml neředěného supernatantu, vždy 2 krát vedle sebe. Bylo dosaženo ředění 10^{-1} , 10^{-2} , kultivace probíhala při 25°C po dobu 14 dní.

8 DIFERENCIÁLNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE (DSC)

Tato metoda byla použita, pro zjištění krystalinity vzorku. Snahou bylo zjistit zastoupení krystalické a amorfni fáze v jednotlivých formách vzorku, zda se od sebe jednotlivé formy liší nebo zda mají podobnou krystalinitu.

8.1 Princip DSC

DSC je termoanalytická metoda založená na měření přísunu tepelné energie, tak aby teplota vzorku a referenčního vzorku byla stejná. Výsledkem je závislost rozdílu tepelného toku uvolňovaného z měřeného a referenčního vzorku na teplotě. Ohřev vzorku probíhá při konstantní rychlosti. Měření bylo prováděno na DSC Pyris 1, na tomto přístroji je možné měřit v rozsahu teplot od -50 do 730 °C.

8.2 Postup měření DSC

Měřeny byly vzorky ve formě prášku, tenké folie a tlusté folie, navážka vzorků se pohybovala kolem 10 mg \pm 0,001mg. Vzorky byly uzavřeny v hliníkových nádobkách, vloženy do kalorimetru a ohřívány z 50°C na 200°C rychlostí 10°C/min. měření bylo prováděno v inertní atmosféře za průtoku dusíku rychlostí 20ml/min.

9 AEROBNÍ BIODEGRADACE

9.1 Obsah bioreaktorů pro aerobní biodegradaci

Pro vlastní biodegradační test byl použit bioreaktor a objemu plynné fáze 580ml, které byly uzavřeny uzávěrem, ve kterém byl otvor pro patronu se septem. Sterilizace uzávěrů probíhala pod UV světlem v aseptickém laminárním boxu po dobu 30 minut. Bioreaktory byly sterilizovány při 125°C po dobu 30 minut.

Obsah bioreaktoru:

- Perlit
- Minerální medium
- Vzorek Ecoflexu
- Substrát (kompost)

Příprava perlitu

Perlit je lehká, zrnitá, pórovitá hmota bílé barvy. Použitý perlit vyrobený firmou AGRO CS, a.s. (Agroperlit), udržuje v bioreaktoru vlhkost a slouží k provzdušňování. Před použitím byl perlit 3 krát promyt destilovanou vodou a vysušen při 105°C. Do bioreaktorů byl dávkován v množství 6,67 g.

Příprava minerálního media

Minerální medium slouží pro mikroorganismy jako zdroj živin. Příprava je popsána v kap. 5.2. Do reaktorů bylo dávkováno v objemu 6,67 ml.

Příprava substrátu

Pro pokusy byly použity dva různé komposty, které byly skladovány při 58°C za neustálého provzdušňování a zvlhčování. Před vlastním použitím byly komposty prosety sítím o velikosti ok 2 mm a byla stanovena sušina kompostu.

9.2 Příprava pokusu pro aerobní biodegradaci

9.2.1 Příprava vzorků Ecoflexu pro biodegradaci v prvním kompostu

První pokus byl nasazen z důvodu ověření výsledků z předešlé diplomové práce napsané Ing. Zuzanou Konečnou, byly použity vzorky Ecoflexu ve formě folií o tloušťce 100-150 μm a 150-300 μm , prášku a tenkého povlaku na perlitu.

Tab. 4 Navážky materiálů pro první pokus

Označení bioreaktorů	Forma materiálu	Navážka materiálu [g]	Navážka perlitu	Navážka kompostu
SL 1	slepý pokus	-----	6,67	3,01
SL 2		-----		
SL 3		-----		
P 1	prášek	0,20590	6,67	3,01
P 2		0,20153		
P 3		0,20156		
TP 1	tenký povlak na perlitu	0,50000	6,67	3,01
TP 2		0,50000		
TP 3		0,50000		
TE 1	tenká folie 100-150 μm	0,50829	6,67	3,01
TE 2		0,50474		
TE 3		0,50568		
TL 1	tlustá folie 150-300 μm	0,50014	6,67	3,01
TL 2		0,50201		
TL 3		0,50551		
CEL	celulosa	0,20643	6,67	3,01

Postupně bylo připraveno 16 bioreaktorů, do kterých bylo naváženo 3,14 g vyzrálého kompostu a 6,67 g perlitu. Do každého reaktoru byly dávkované různé formy Ecoflexu. Každý pokus se vzorkem byl prováděn 3x vedle sebe až na kontrolní vzorek celulosy, který byl připraven jen jednou. Folie byly naváženy v množství $0,5 \text{ g} \pm 0,00001$ na analytických vahách, prášek a celulosa v množství $0,2 \text{ g} \pm 0,00001$. Vzorek ve formě tenkého povlaku byl dávkován ve formě chloroformového roztoku o objemu 10 ml, postup přípravy je uveden v kap. 6.3. Všechny obsahy bioreaktorů byly zvlhčeny MM o objemu 6,67 ml. Slepý pokus byl připraven stejným způsobem, jen zde nebyla přidána žádná forma materiálu Ecoflex. Jednotlivé navážky a popisy vzorků jsou zobrazeny v následující tabulce (Tab.4).

Jednotlivé bioreaktory byly důkladně promíchány a inkubovány ve tmě při 58°C.

9.2.2 Příprava vzorků Ecoflexu pro biodegradaci v druhém kompostu

Důvodem nasazení druhého pokusu bylo ověření výsledků při použití prvního kompostu. Pro tento pokus byly také použity vzorky Ecoflexu ve formě folií o tloušťce 100-150 μm a 150-300 μm , prášku a tenkého povlaku na perlitu.

Bylo připraveno 18 bioreaktorů, do kterých byl navážen vyzrálý kompost v trojnásobku oproti předešlému kompostu v množství 9,04 g a 6,67 g perlitu. Do každého reaktoru byly dávkované různé formy Ecoflexu, každý pokus se vzorkem byl prováděn 3x vedle sebe. Folie byly naváženy v množství $0,5 \text{ g} \pm 0,00001$ na analytických vahách, prášek a celulosa v množství $0,2 \text{ g} \pm 0,00001$. Vzorek ve formě tenkého povlaku byl dávkován ve formě chloroformového roztoku o objemu 10 ml, postup přípravy je uveden v kap. 6.3. Všechny obsahy bioreaktorů byly zvlhčeny MM o objemu 6,67 ml. Slepý pokus byl připraven stejným způsobem, jen zde nebyla přidána žádná forma materiálu Ecoflex. Jednotlivé navážky a popisy vzorků jsou zobrazeny v následující tabulce (Tab.5).

Jednotlivé bioreaktory byly důkladně promíchány a inkubovány ve tmě při 58°C.

Tab. 5 Navážky materiálů pro první pokus

Označení bioreaktorů	Forma materiálu	Navážka materiálu [g]	Navážka perlitu	Navážka kompostu
SL 1	slepý pokus	-----	6,67	9,03
SL 2		-----		
SL 3		-----		
P 1	prášek	0,20821	6,67	9,03
P 2		0,20577		
P 3		0,20167		
TP 1	tenký povlak na perlitu	0,50000	6,67	9,03
TP 2		0,50000		
TP 3		0,50000		
TE 1	tenká folie 100-150 µm	0,49901	6,67	9,03
TE 2		0,50040		
TE 3		0,50800		
TL 1	tlustá folie 150-300 µm	0,50427	6,67	9,03
TL 2		0,50074		
TL 3		0,50660		
CEL 1	celulosa	0,20984	6,67	9,03
CEL 2		0,19943		
CEL 3		0,20491		

9.3 Hodnocení aerobní biodegradace plynovou chromatografií

Biodegradace byla hodnocena pomocí plynové chromatografie (GC) na chromatografu značky GC Agilent 7890, kdy byla sledována produkce CO₂ a úbytek O₂. Produkce CO₂ slouží k posouzení biodegradace vzorku, který je v tomto prostředí jediným zdrojem uhlíku. Množství O₂ je ukazatelem, zda je zachováno aerobní prostředí v bioreaktoru.

Chromatografie je proces, který umožňuje dělení směsi na jednotlivé složky. Prvním krokem při použití metody GC je odpaření vzorku v temperovaném dávkovacím zařízení (injektoru), následuje oddělení jednotlivých složek směsi v chromatografické koloně, detekce každé složky a její vyhodnocení. Vzorek z injektoru je zaveden do proudu nosného plynu, který protéká kolonou se stacionární fází umístěnou v termostatu. Při průtoku plynu kolonou se jednotlivé složky směsi pohybují různými rychlostmi ovlivněnými mírou interakce se stacionární fází. V důsledku toho se jednotlivé složky směsi oddělují a při výstupu z kolony mohou být kvantifikovány vhodným detektorem.

V našem případě byla analýza prováděna pomocí dvou skleněných náplňových kolon o délce 1,829 m zapojených do série. Na první koloně s náplní Porapak Q (velikost částic 80/100 MESH) byl analyzován CO₂ a po přepnutí ventilu byl analyzován O₂ na koloně s molekulovým sítem (velikost částic 60/80 MESH). Jako nosný plyn byl použit helium čistoty 4.6.

K detekci složek byl použit tepelně vodivostní detektor (TCD). TCD je založený na principu tepelné vodivosti. Měřený plyn spolu s nosným plynem prochází měřicí celou. Druhá cela slouží jako referenční a protéká jí pouze čistý nosný plyn. V obou celách je umístěno žhavicí vlákno. Pokud je tepelná vodivost měřeného plynu vyšší než plynu referenčního, teplota vlákna se sníží a naopak. Změna teploty způsobí měřitelnou změnu elektrického odporu, která je přímo úměrná koncentraci stanovené látky ve vzorku.

K vyhodnocení signálů byl použit program GC ChemStation. Jako standard sloužil kalibrační syntetický plyn Linde Gas, a.s. Praha (složení viz kap. 5.1) a pro analýzu O₂ byl používán jako kalibrační plyn obsah kyslíku ve vzduchu. V Tab. 6 jsou uvedeny parametry pro GC analýzu.

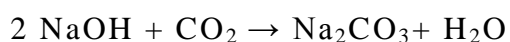
Tab. 6 Parametry pro GC analýzu

Parametr	Hodnota	Jednotka
Teplota termostatu	60	°C
Teplota injektoru	200	°C
Teplota detektoru	250	°C
Průtok nosného plynu	53	ml/min
Čas přepínání ventilu	0,9	min
	2,0	

9.3.1 Postup měření

Měření bylo prováděno vždy v pravidelných intervalech jedenkrát týdně. Po vyjmutí vzorků z termostatu byly bioreaktory nechány zchladnout na pokojovou teplotu. Před vlastním měřením byly reaktory důkladně kruživým pohybem promíchány v rukách a následně byla plynná fáze dávkována injekční stříkačkou Hamilton o objemu 100 μ l do plynového chromatografu.

Po každém měření byly bioreaktory provzdušňovány pomocí vzduchu, který byl vháněn pomocí hadiček, které byly napojeny na čerpadlo. Vzduch procházel přes promývací láhve s NaOH, kde probíhalo odstranění CO₂ dle rovnice /3/. Dále vzduch procházel přes láhev s Ba(OH)₂, která zde byla umístěna pro případ, kdy by došlo k vyčerpání NaOH s první láhve. Během provzdušňování byly reaktory promíchávány, aby docházelo k homogenizaci celého prostředí. Vháněný vzduch zabezpečuje přísun kyslíku pro aerobní prostředí a současně unáší CO₂ vyprodukovaný mikroorganismy.



/3/

9.4 Zpracování naměřených hodnot

Při zpracovávání naměřených hodnot byly použity tyto vzorce [23]:

Denní produkce uhlíku ve formě CO₂

$$m_{\text{d)C}} = \frac{M_c \cdot p}{R \cdot T} \cdot \frac{V_g}{1000} \cdot w(\text{CO}_2) \cdot \frac{V_{st}}{S_{st}} \cdot \frac{S_{vz}}{V_{vz}} \cdot 1000 \quad /4/$$

$m_{\text{(d)C}}$	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]
V_g	plynný objem láhve	[ml]
$w(\text{CO}_2)$	množství CO ₂ v kalibračním plynu	[%]
V_{st}	dávkový objem plynné fáze standardu	[μl]
S_{st}	signál detektoru pro standard	[μV.s]
V_{vz}	dávkový objem plynné fáze vzorku	[μl]
S_{vz}	signál detektoru pro vzorek	[μV.s]

Kumulativní produkce uhlíku ve formě CO₂

Pokud neprovzdušňujeme bioreaktory, kumulativní produkce je rovna produkci denní. Pokud je ovšem systém provzdušňován, je kumulativní produkce uhlíku ve formě CO₂ dána vztahem:

$$m_{\text{C}2} = m_{\text{C}1} + m_{\text{d)C}2} \quad /5/$$

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

Procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO₂

$$D_c = \frac{m_{(s)C}}{m_c \cdot TC} \quad /6/$$

D _c	procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO ₂	[%]
m _{(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

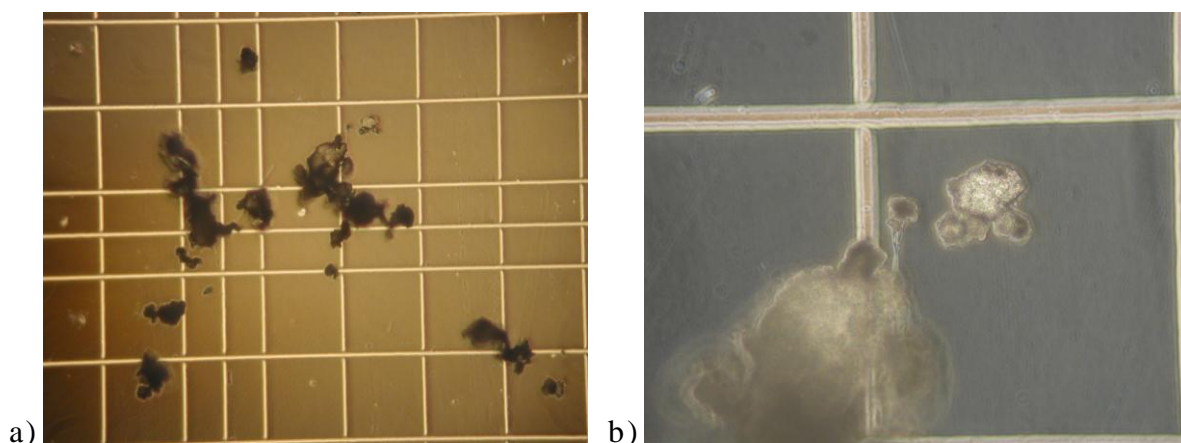
$$\% O_2 = \frac{w_{O_2} \cdot S_{vz}}{S_{st}} \cdot \frac{V_{st}}{V_{vz}} \quad /7/$$

% O ₂	aktuální procento kyslíku obsaženého v láhvi	[%]
w _(O₂)	obsah kyslíku ve vzduchu	[%]
S _{st}	signál detektoru pro standard	[μV.s]
S _{vz}	signál detektoru pro vzorek	[μV.s]
V _{st}	dávkovaný objem plynné fáze standardu	[μl]
V _{vz}	dávkovaný objem plynné fáze vzorku	[μl]

10 VÝSLEDKY A DISKUZE

10.1 Charakteristika vzorku

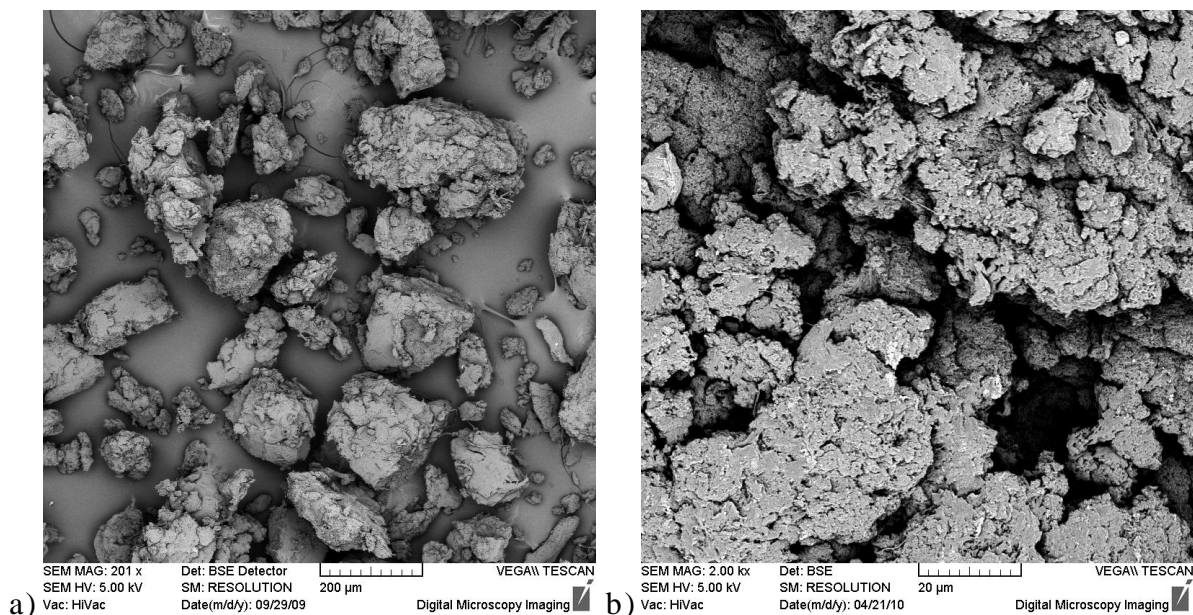
U vzorků Ecoflexu ve formě prášků byla před vlastním pokusem provedena mikroskopie při různých zvětšení. Prášky tvořily agregáty, které jsou znázorněny na Obr. 5 a) při zvětšení 100x. Na následujícím Obr. 5 b) při zvětšení 400x můžeme pozorovat vzorek Ecoflex ve formě prášku, jsou zde patrná jednotlivá zrníčka prášku.



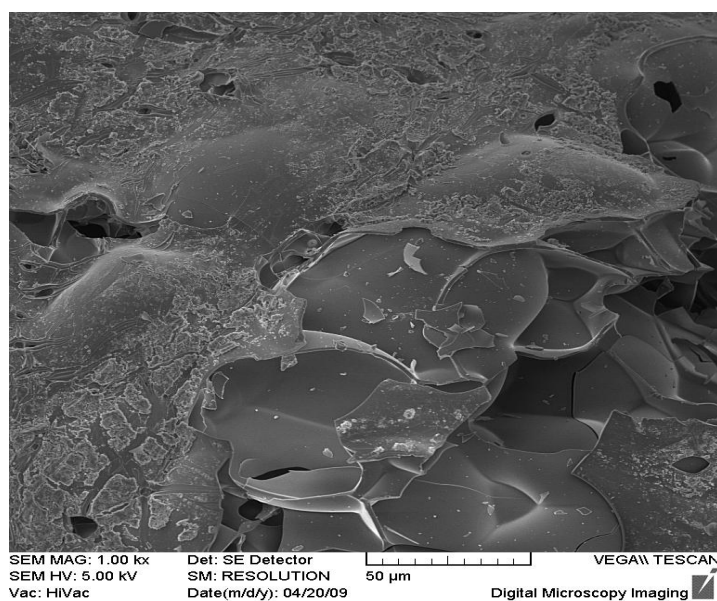
Obr. 5 Mikroskopické snímky Ecoflexu ve formě prášku a) zvětšení 100x; nejmenší komůrka $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$, střední komůrka $50\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ a největší komůrka $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ b) zvětšení 400x ; rozměr komůrky $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$

Dále byla provedena skenovací elektronová mikroskopie u vzorků ve formě prášku při různých zvětšení na elektronovém mikroskopu VEGA LMU. Na Obr. 6 je znázorněn prášek a) zvětšený 200x a b) zvětšený 2000x. Na snímku a) můžeme pozorovat jednotlivé částice prášku, které mají nepravidelný tvar, jejich velikost se pohybuje do $200\mu\text{m}$. Na snímku b) je znázorněn povrch částic, ten není hladký a nachází se na něm pukliny. Ze snímků provedených elektronovou mikroskopií můžeme pozorovat, že tato forma materiálu má větší specifický povrch, což může mít za následek lepší biodegradaci v prostředí kompostu než u ostatních forem materiálu Ecoflex.

Po biodegradačním pokusu byly vzorky prášku rozloženy z větší části a zřejmě byly rozpadnuty. V kompostu nebyly pozorovány, proto jsme nebyli schopni provést mikroskopii těchto vzorků po ukončení pokusu.



Obr. 6 Elektronová mikroskopie vzorku ve formě prášku a) zvětšení 200x b) zvětšení 2000x



Obr. 7 Elektronová mikroskopie vzorku ve formě tenkého povlaku na perlitu zvětšení 1000x

Mikroskopie byla provedena u vzorku ve formě tenkého povlaku při zvětšení 1000x, na tomto snímku lze vidět, že Ecoflex tvoří na perlitu tenký povlak. Tato forma materiálu by měla mít také větší specifický povrch než vyrobené folie o různých tloušťkách.

10.2 Charakteristika použitých kompostů

Pro sledování biodegradace alifaticko-aromatického v kompostu byly použity komposty, u kterých byla stanovena sušina a spalitelný podíl, výsledky jsou shrnuty v Tab. 7. Jednotlivé komposty se od sebe lišily zejména dobou zrání. První kompost byl skladován po delší dobu (12 měsíců) a byl použit i pro biodegradaci uskutečněnou v minulém roce [23], druhý kompost byl skladován po kratší dobu 6 měsíců. Komposty se nechávaly dozrávat při 58°C ve vodní lázni a za stálého udržování vlhkosti.

Tab. 7 Charakteristické vlastnosti pro použité komposty

Vlastnost	Jednotka	Kompost 1	Kompost 2
Doba zrání	měsíc	12	6
Sušina	%	55,56	44,29
Spalitelný podíl	%	70	56

Tab. 8 Mikrobiální rozbor kompostu

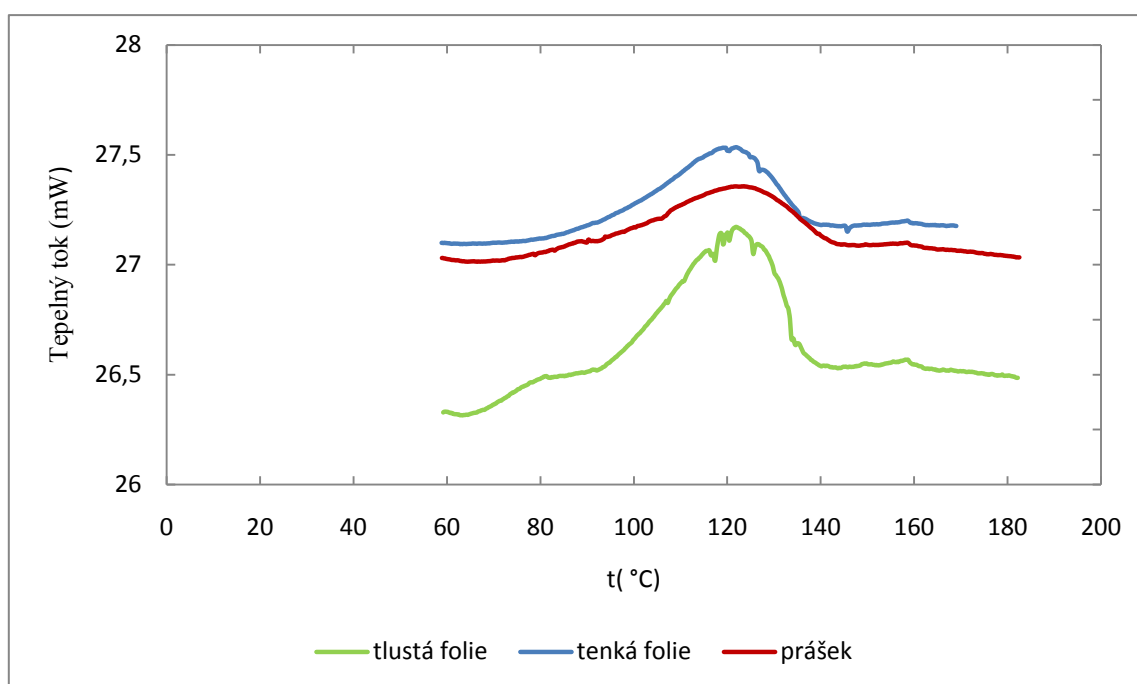
Počet kolonií [CFU/g suš.]	Kompost 1	Kompost 2
Termofilní bakterie	$2,9 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^9$
Mezofilní bakterie	$5,5 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^8$
Psychrotrofní bakterie	$1,1 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^7$
Termofilní Aktinomycéty	$1,2 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$
Vláknité plísně	0	$8,9 \cdot 10^2$

Pro stanovení mikrobiálního rozboru byly po ukončení inkubace spočteny kolonie mikroorganismů na miskách s agarem. Postup je uveden v kapitole 7.3. V Tab. 8 jsou zaznamenány výsledky rozboru v počtech kolonií přepočtený na jeden gram sušiny. Z hodnot uvedených v této tabulce (Tab. 8) můžeme usoudit, že kompost 2 má větší mikrobiální oživení než kompost použitý pro první pokus. Kompost 2 také obsahoval vláknité plísňe, které se v kompostu 1 vůbec nevyskytovaly.

Pokus s kompostem 2 byl použit pro ověření výsledků pokusu při použití kompostu 1, zde stáří kompostu a jeho mikrobiální oživení může mít vliv na biodegradaci materiálu Ecoflex.

10.3 Hodnocení diferenční skenovací kalorimetrie

Cílem této analýzy bylo sledovat vliv krystalinity na biodegradaci různých forem materiálu. Měření bylo prováděno na DSC Pyris 1 za pomoci doc. Ing. Petra Slobodiana, Ph.D., Ústav inženýrství polymerů, FT UTB Zlín.



Obr. 8 Závislost tepelného toku na teplotě pro vzorek ve formě tenké a tlusté folie a prášku

Na obrázku (Obr.8) můžeme sledovat závislost tepelného toku při zvyšování teploty. Křivky dosáhly maxima v oblasti kolem 120°C, což odpovídá teplotě tání materiálu Ecoflex. Přesnější hodnoty jsou shrnuty v tabulce (Tab. 9)

Tab. 9 Hodnoty odečtené z křivky závislosti tepelného toku na teplotě

Hodnoty	Jednotka	Formy materiálu Ecoflex		
		Tenká folie	Tlustá folie	Prášek
delta H	J/g	12,74	8,97	8,448
t _{max}	°C	119,09	121,928	123,608

U jednotlivých forem vzorků se delta H pohybovala prakticky ve stejných hodnotách, to znamená, že všechny formy mají téměř podobnou krystalinitu. Obecně by měla být krystalinita Ecoflexu malá, polymer je z velké části amorfni, čemuž odpovídají naměřené hodnoty. Čím nižší hodnota krystalinity, tím snadněji by měla probíhat biodegradace daného materiálu.

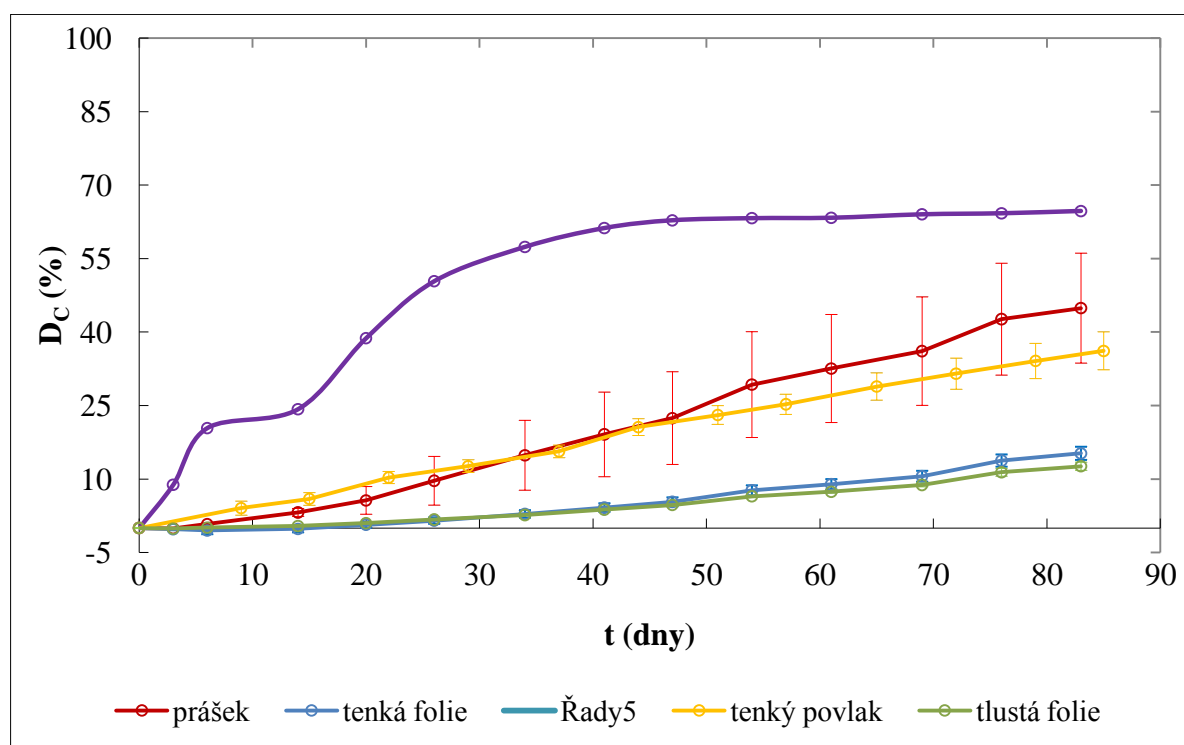
10.4 Hodnocení biodegradace pomocí měření produkce CO₂

10.4.1 Prostředí prvního kompostu

Úkolem prvního pokusu s kompostem 1 bylo ověřit výsledky dosažené v diplomové práci Ing. Zuzany Konečné. Nasazeny byly vzorky ve formě tenké folie (100-150µm), tlusté folie (150-300µm), tenkého povlaku na perlitu a prášku. Produkce CO₂ byla měřena po dobu 83 dní. V tomto kompostu degradoval z větší míry jen prášek, proto byl nasazen nový vzorek ve formě tenkého povlaku na perlitu, u kterého byla doba inkubace 85 dní.

Na Obr. 9 jsou znázorněna procenta mineralizace uhlíku ve formě CO₂ pro jednotlivé testované materiály. Jednotlivé body znázorněné na grafu jsou průměrem ze třech měření, kromě celulosy, pro kterou byl zhotoven pouze jeden bioreaktor.

Z Obr. 9 je zřejmé, že procenta mineralizace mají větší hodnoty pro vzorek Ecoflexu ve formě prášku a tenkého povlaku než u obou druhů folií. Tenká folie (100-150 μm) a tlustá folie (150-300 μm) mají jen nepatrné rozdíly v procentech mineralizace a jejich křivky se zpočátku prakticky překrývají, zhruba od 46. dne křivka pro tenkou folii nepatrně roste a konečná hodnota mineralizace je 15,2%. Tlustá folie dosahuje konečné mineralizace o 2,6 % nižší než tenká folie, což činí 12,6 %. V případě prášku a tenkého povlaku na perlitu, biodegradační rychlost tenkého povlaku byla ze začátku rychlejší než biodegradační rychlost prášku. 30. den inkubace došlo ke změně, kdy se křivky obou vzorků Ecoflexu zhruba 16 dní překrývaly a následně, to je 46. den, prášek dosáhl vyšší degradační rychlosti a konečná hodnota mineralizace dosáhla 44,9%. Konečná hodnota mineralizace pro vzorek tenkého povlaku na perlitu byl 85 den 36,2 %. K biodegradaci referenční látky celulosy, což je látka, která je charakterizovaná jako snadno rozložitelná, došlo k biodegradaci ze 44,9%. Celulosa nebyla rozložena z větší části zřejmě i díky tomu, že uhlík byl využit mikroorganismy pro tvorbu biomasy, a tudíž se všechn nespotřeboval na oxid uhličitý.

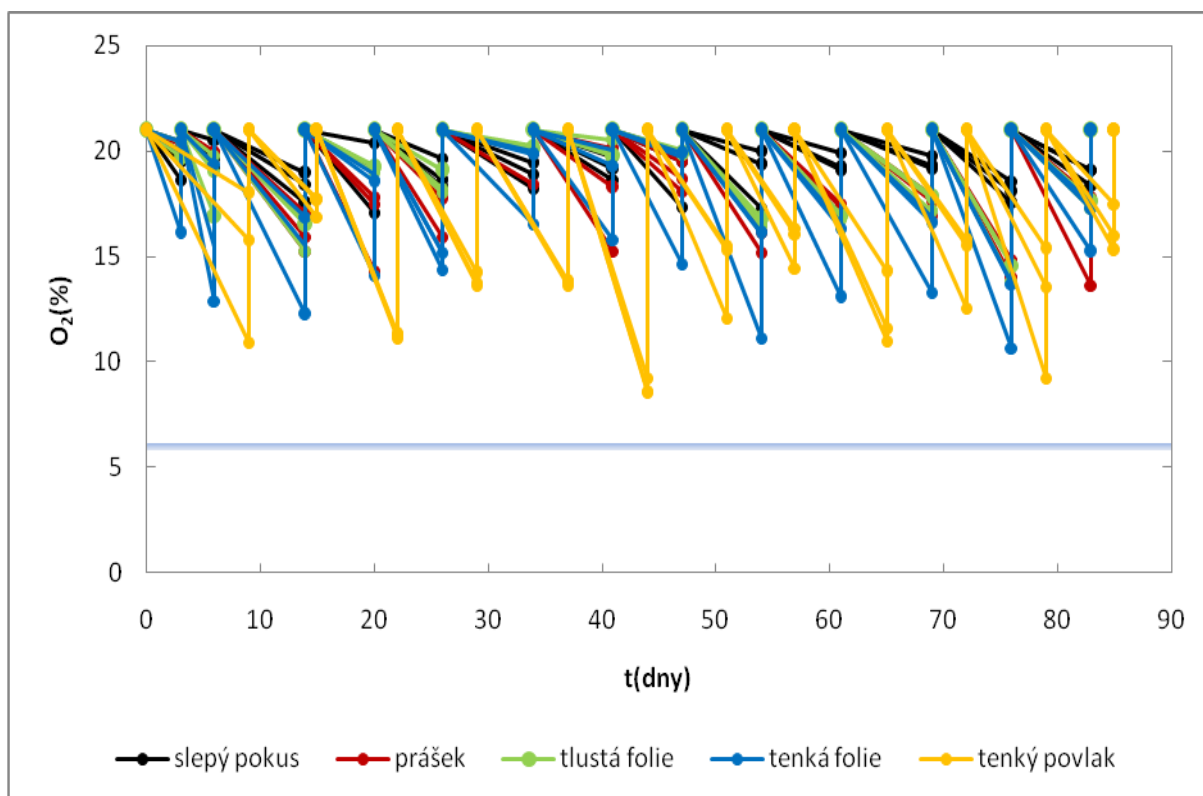


Obr. 9 Procenta mineralizace uhlíku ve formě CO₂ vzorku Ecoflex v prostředí vyžralého kompostu 1

Dosažená procenta mineralizace jsou shrnuta v Tab. 10. Formy vzorku jsou zde seřazeny od toho, který dosáhl nejvíce procent mineralizace po vzorek, u kterého byla biodegradace nejpomalejší.

Tab. 10 Souhrn výsledků biodegradace pro pokus s kompostem 1

Forma vzorku	Doba inkubace [dny]	Mineralizace [%]
Prášek	83	44,9
Tenký povlak na perlitu	85	36,2
Tenká folie	83	15,2
Tlustá folie	83	12,6



Obr. 10 Koncentrace O₂ v jednotlivých bioreaktorech v prostředí kompostu 1

Na Obr. 10 je znázorněn graf množství kyslíku v jednotlivých bioreaktorech. Modře je vyznačena čára pro hranici 6% kyslíku, která by neměla být

překročena v rámci zachování aerobních podmínek. Graf má tento tvar díky počáteční hodnotě kyslíku, která činí 20,95% kyslíku, následně je kyslík spotřebováván mikroorganismy. Díky provzdušňování se hladina kyslíku vždy vrátí na původní hodnotu. V našem případě nedošlo k poklesu kyslíku pod tuto hranici, kdyby došlo k takovému problému tak by byla prodloužena doba provzdušňování, nebo by měření bylo prováděno v častějších intervalech.

Různá rychlost biodegradace byla nejspíše způsobena různým specifickým povrchem. Jak již bylo v předchozí diplomové práci [24] zmíněno, nízká biologická degradace vzorků ve formě folií může být způsobeno jejich malým specifickým povrchem.

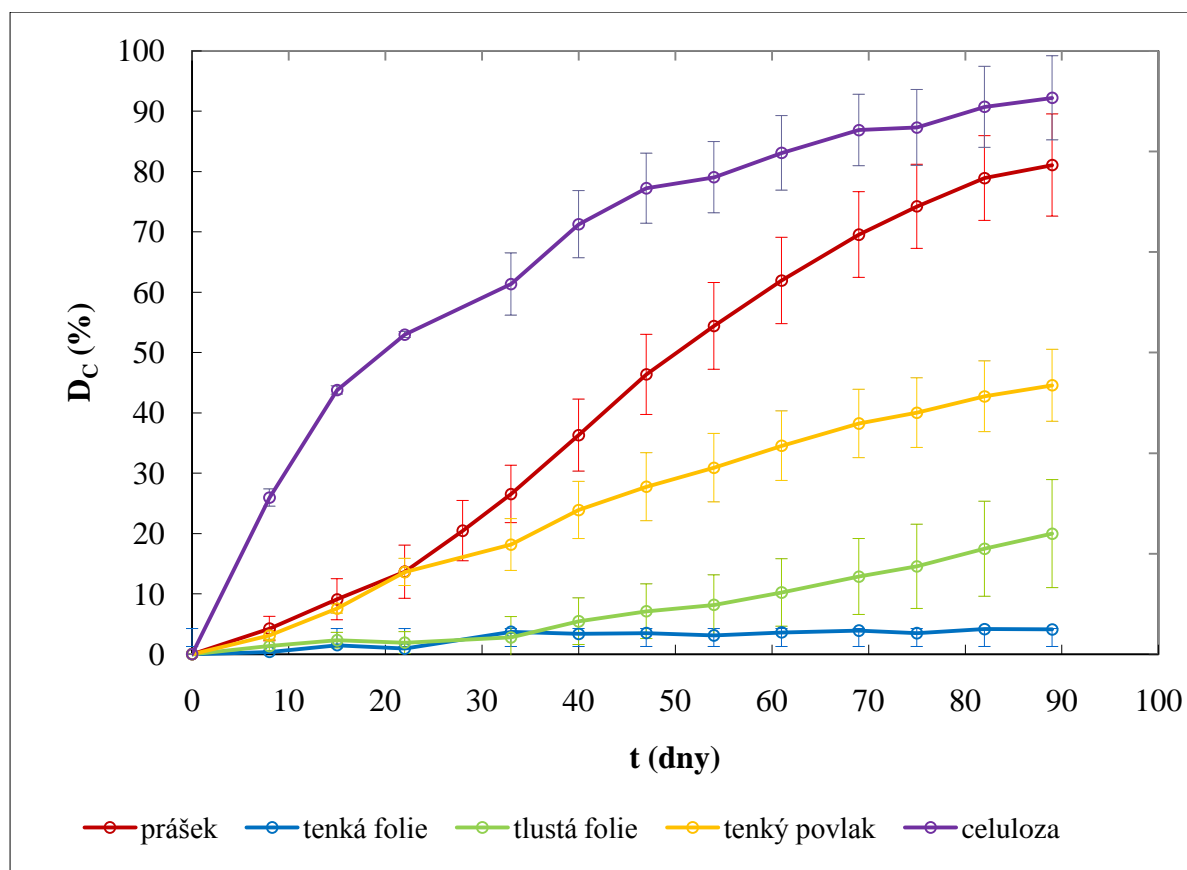
10.4.2 Prostředí druhého kompostu

Biodegradace v prostředí kompostu 2 probíhala po dobu 89 dní, tento pokus byl nasazen pro ověření biodegradace v kompostu 1. Otázkou bylo, zda se stejné formy materiálu budou rozkládat stejnou rychlostí, nebo zda biodegradční rychlost ovlivní stáří a mikrobiální oživení kompostu.

Měření produkce oxidu uhličitého a spotřeba kyslíku byla sledována opět u všech čtyř forem materiálu Ecoflex jako v případě prvního kompostu. Jedná se o vzorky ve formě prášku, tenkého povlaku na perlitu, tenké folie (100-150 μ m) a tlusté folie (150-300 μ m).

Na Obr. 11 jsou naznačeny procenta mineralizace všech forem materiálu. Podobně jako v předcházejícím pokusu s kompostem 1, vzorky folií se držely při nízkých procentech mineralizace a vyšších hodnot dosáhly vzorky ve formě prášku a tenkého povlaku na perlitu. V tomto pokusu oproti předešlému má větší procento mineralizace vzorek tlusté folie, který dosáhl konečné mineralizace 19,9%. Biodegradční rychlost tenké folie se pohybovaly téměř v konstantních hodnotách, která dosáhla konečné hodnoty 4,1%. V předešlém pokusu tyto formy materiálu dosahovaly téměř stejných hodnot, ovšem v případě kompostu 2 došlo k velkému nárůstu biodegradční rychlosti u tlusté folie a o 15,8% měl větší procenta mineralizace. Vzorek ve

formě prášku v prvních 21 dnech měl téměř totožnou křivku s tenkým povlakem, ovšem pak došlo k prudkému nárůstu biodegradční rychlosti a konečná hodnota mineralizace prášku činila 81,1%. Tenký povlak na perlitu dosáhl konečné hodnoty mineralizace 44,6%. V Tab. 11 jsou shrnuty konečné procenta mineralizace uhlíku po ukončení pokusu.



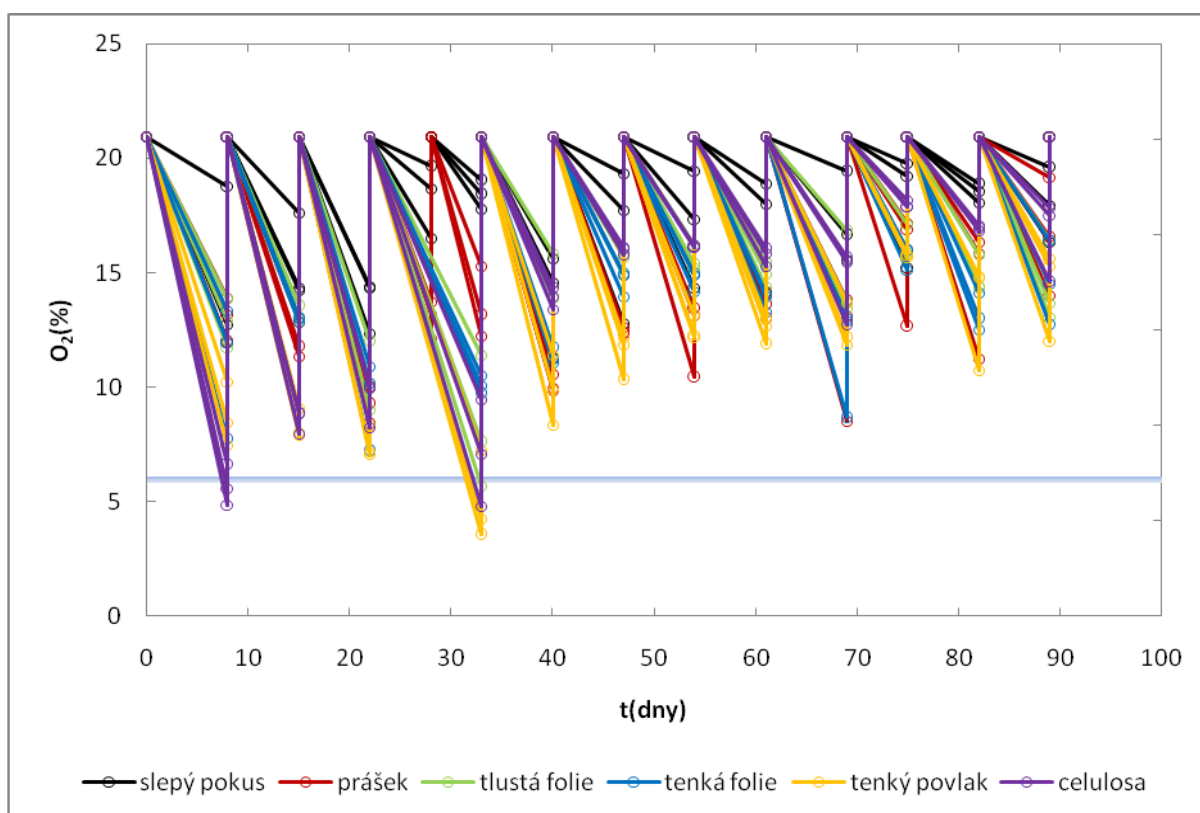
Obr. 11 Procenta mineralizace uhlíku ve formě CO_2 vzorku Ecoflex v prostředí vyzrálého kompostu 2.

Rozdíly v mineralizaci celulosy, která dosáhla mineralizace 92,2%, oproti kompostu 1, kde byla mineralizace 44,9% lze také přisuzovat vyššímu oživení druhého kompostu oproti prvnímu.

Tab. 11 Souhrn výsledků biodegradace pro pokus s kompostem 2

Forma vzorku	Doba inkubace [dny]	Mineralizace [%]
Prášek	89	78,9
Tlustá folie	89	19,9
Tenká folie	89	4,1
Tenký povlak na perlitu	89	44,6

Rozdíly v mineralizaci celulosy, která dosáhla mineralizace 92,2%, oproti kompostu 1, kde byla mineralizace 44,9% lze také přisuzovat vyššímu oživení druhého kompostu oproti prvnímu.

Obr. 12 Koncentrace O₂ v jednotlivých bioreaktorech v prostředí kompostu 2

Na předchozím Obr. 12 je znázorněn úbytek kyslíku v jednotlivých reaktorech. V několika případech zde došlo poklesu kyslíku pod hranici 6%. V prvním případě (7. den) byl pokles zřejmě způsoben nedokonalým provzdušněním, kdy došlo k velkému nárůstu mineralizace uhlíku u celulosy oproti ostatním vzorkům, která se projevovala rychlým nárůstem křivky. Aby bylo zabráněno dalšímu nežádoucímu poklesu kyslíku, prodloužila se doba provzdušňování. V druhém případě, který nastal 33. den, došlo k poruše plynového chromatografu, tudíž vzorky byly měřeny o 5 dní později a z tohoto důvodu došlo k poklesnutí kyslíku pod tuto hranici 6%.

10.4.3 Porovnání stupně biodegradace v prvním a druhém kompostu

Pro tento pokus byly použity dva druhy kompost první kompost průmyslový pocházel od firmy AGRO CS a druhý kompost byl zahradnický. Oba komposty se značně lišily počtem mikroorganismů viz Tab. 8, což mohlo mít vliv na průběh biodegradace. Biodegradace probíhala v obou kompostech po téměř stejnou dobu.

Vzorek ve formě prášku v prvním kompostu dosáhl celkové mineralizace ze 44,9% zatímco vzorek v druhém kompostu byl zdegradován až z 78,9%. Tato vyšší míra degradace u kompostu 2 může být přisuzována větší aktivitě mikroorganismů v kompostu 2 oproti prvnímu. Tenký povlak na perlitu se v obou druzích kompostu pohyboval téměř ve stejné hodnotě biodegradace v oblasti kolem 40%, přesnější hodnoty jsou uvedeny v Tab. 11. V případě vzorků ve formě folií v prvním kompostu byla konečná mineralizace po 83 dnech u obou druhů folií srovnatelná, naopak v druhém kompostu jsme dostali opačný výsledek, kdy byla rychlejší bioodegradace v 82. den u tlusté folie (17,5%) než u tenké folie (4,2%).

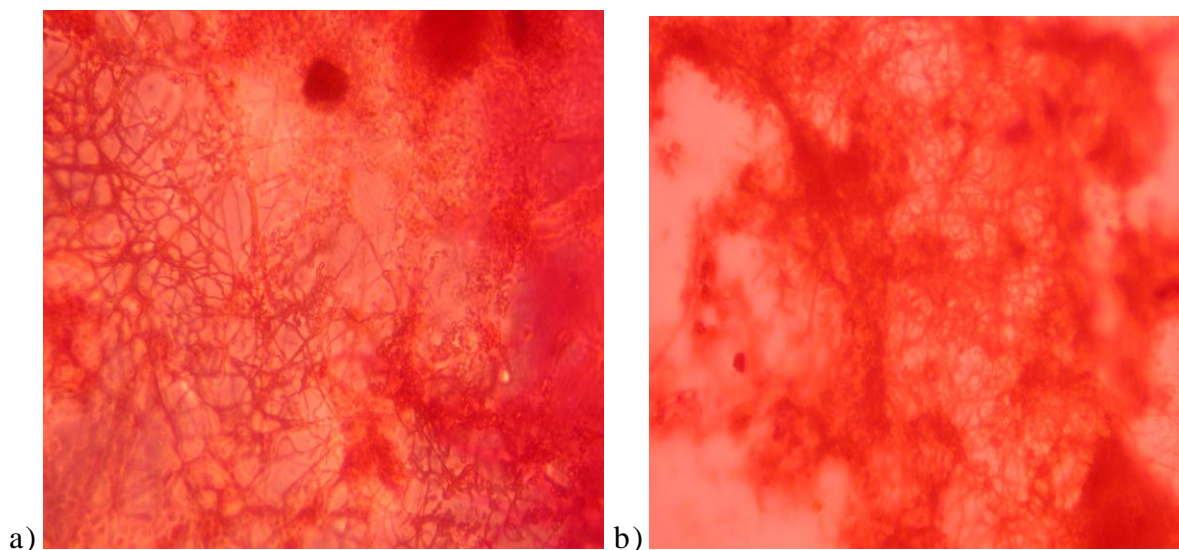
Z tabulky (Tab. 12) můžeme usoudit, že vzorky ve formě folií, ať už tenké nebo tlusté, byly jen minimálně rozkládány. Tato situace může být přisuzována nízkému specifickému povrchu těchto forem materiálu. Nejrychlejší biodegradace byla v obou druzích kompostu u vzorku prášku, který měl naopak největší specifický povrch.

Tab. 12 Shrnutí stupně mineralizace uhlíku pro oba druhy kompostu (pro lepší srovnání jsou zde u kompostu 2 uvedeny vzorky z 82. dne biodegradace)

Forma vzorku	Kompost 2		Kompost 1	
	Doba inkubace [dny]	Mineralizace [%]	Doba inkubace [dny]	Mineralizace [%]
Prášek	82	78,9	83	44,9
Tenká folie	82	4,2	83	15,2
Tlustá folie	82	17,5	83	12,6
Tenký povlak	82	42,7	85	36,2
Celulosa	82	90,7	83	44,9

10.5 Mikroskopie vzorků folií po ukončení biodegradace

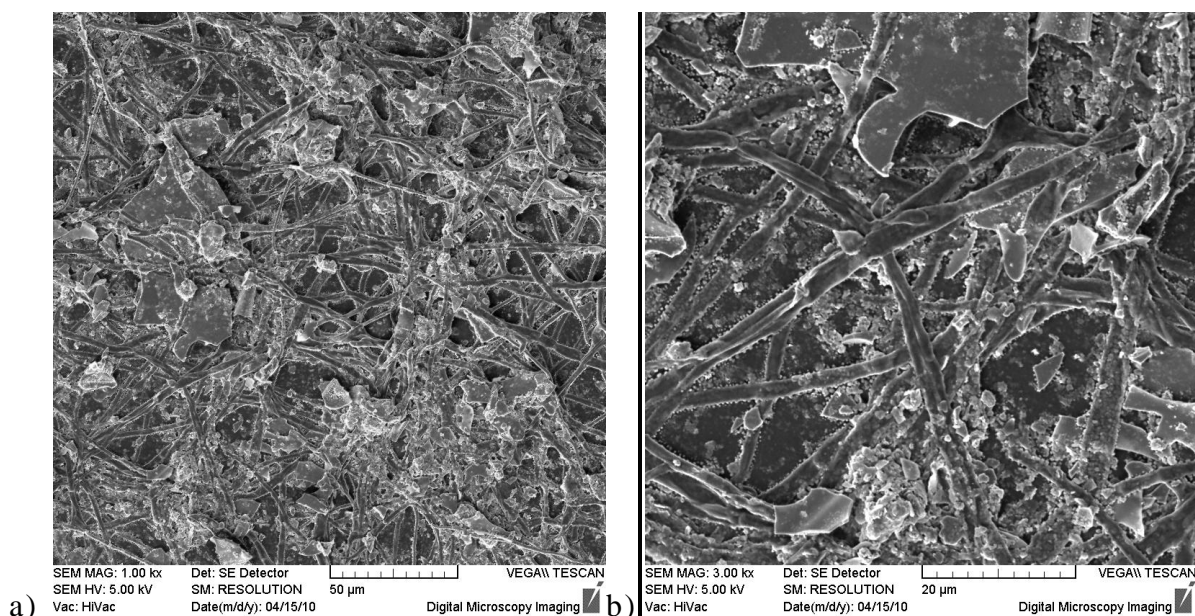
Po ukončení pokusu byla provedena mikroskopii u vzorků ve formě folií. Vzorky byly nechány po dobu 24 hodin ve fixačním roztoku, následně obarveny karbolfuchsinem a byla pozorována změna povrchu a přítomnost vláken aktinomycet.



Obr. 13 Mikroskopie vzorku Ecoflex ve formě folií zvětšeno 1000x a) tenká folie b) tlustá folie

Vzorek tenké folie byl křehčejší než před zahájením pokusu, snadněji se rozpadal než vzorek ve formě tlusté folie. Na Obr. 13 jsou znázorněny jednotlivé druhy folií. Na snímku a) je znázorněn vzorek ve formě tenké folie, kdy jsme pozorovali větší počet vláken, které patří nejspíše termofilním aktinomycetám, které by měly Ecoflex rozkládat. Snímek b) ukazuje povrch tlusté folie, u které byly také pozorovány vlákna, ale v menším množství než u vzorku tenké folie.

U těchto vzorků byla také provedena skenovací elektronová mikroskopie, snímky jsou znázorněny na Obr. 14. Na tomto snímku jsou také patrná vlákna zřejmě aktinomycet, která jsou silná asi 2 až 4 μm a nejsou příliš rozvětvená. V případě očištění povrchu, nebyly pozorované na tomto materiálu žádná přítomnost vláken. Z toho lze usoudit, že vlákna jsou narostlá na povrchu a nezasahují do samotného materiálu.



Obr. 14 Elektronová mikroskopie vzorku folií po biodegradaci a) 1000x b) zvětšení 3000x

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo ověřit schopnost aromaticko-alifatického kopolyesteru Ecoflex rozkládat se v podmínkách kompostování. Materiál Ecoflex byl dodán ve formě granulí, které byly následně upraveny na různé formy s různým specifickým povrchem, který podle prozkoumaných zdrojů má vliv na biodegradaci materiálu. Biodegradace byla sledována pomocí produkce oxidu uhličitého na plynovém chromatografu. Dále jsme sledovali krystalinitu různých forem materiálů pomocí DSC analýzy.

Krystalinita byla sledována u vzorků ve formě folií o tloušťkách 100-150 μm a 150-300 μm a prášku. Z naměřených hodnot jsme zjistili, že jednotlivé formy mají podobnou hodnotu krystalinity. V tabulce (Tab. 13) je shrnuta hodnota delta H, která charakterizuje krystalinitu materiálu. S klesající hodnotou delta H, by měla růst biodegradace materiálu, to by znamenalo, že všechny materiály by se měly rozkládat prakticky stejnou rychlostí. To ovšem nesouhlasí s výsledky získanými z biodegradačních testů, proto se domníváme, že velký vliv na biodegradaci bude mít právě specifický povrch.

Tab. 13 Hodnoty delta H pro jednotlivé formy materiálu

Hodnoty	Jednotka	Formy materiálu Ecoflex		
		Tenká folie	Tlustá folie	Prášek
delta H	J/g	12,74	8,97	8,448

Pro biodegradační testy byly připraveny vzorky ve formě prášku, tenkého povlaku na perlitu a ve formě folií o tloušťkách 100-150 μm a 150-300 μm . Testy biodegradace se prováděly ve dvou typech kompostu, kdy v obou případech jsme se dobrali podobných výsledků v procentech mineralizace uhlíku. V následující tabulce (Tab. 14) jsou shrnuty procenta mineralizace pro jednotlivé formy materiálů.

Tab. 14 Dosažená procenta mineralizace u jednotlivých forem materiálu pro kompost 1 i 2.

Forma vzorku	Kompost 1		Kompost 2	
	Doba inkubace [dny]	Mineralizace [%]	Doba inkubace [dny]	Mineralizace [%]
Prášek	83	44,9	89	81,1
Tenká folie	83	15,2	89	4,1
Tlustá folie	83	12,6	89	19,9
Tenký povlak	85	36,2	89	44,6

U folií připravených lisováním byla míra mineralizace nejnižší, zřejmě způsobena nízkým specifickým povrchem. Vzorek ve formě prášku vykazoval vyšší specifický povrch, tudíž dosáhl i vyššího stupně mineralizace. Kompost 2 oproti kompostu 1 byl v zastoupení mikroorganismů bohatší a byl skladován po kratší dobu, což se vše mohlo projevit v pokusu. Kdy téměř všechny vzorky dosáhly v kompostu 2 vyšších procent mineralizace než v kompostu 1 až na vzorek tenké folie, který se v druhém kompostu téměř nerozkládal, jeho procenta mineralizace se pohybovaly po celou dobu měření téměř ve stejných hodnotách.

Využití materiálu Ecoflex, by mělo být zejména jako kompostovací pytle pro organický odpad nebo jako mulčovací folie. Tyto materiály jsou ve formě folií, které ovšem jak se prokázalo v prováděném pokusu, špatně rozložitelné. Folie v našem případě byly připravované lisováním, ovšem kompostovací pytle se vyrábějí vyfukováním a jejich tloušťka je také menší. V našem pokusu byly připraveny tenké a tlusté folie pro porovnání vlivu tloušťky, v našem případě se vliv tloušťky neprokázal,

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Funabashi M., Ninomiya F., Kunioka M. *Biodegradability Evaluation of Polymers by ISO 14855-2*. International journal of molecular science 10 (2009). pg. 3635-3654.
- [2] Lucas N., Bienaime Ch., Belloy Ch., Queneudec M., Silvestre F., Nava-Saucedo J.D. *Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques*. Chemosphere 73 (2008). pg. 429–442.
- [3] [on-line]. [cit. 15.10.2009]. Dostupný z www:
< http://stary.biom.cz/clen/as/biodegr_test.html >.
- [4] Shah A. A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S. *Biological degradation of plastics: A comprehensive review*. Biotechnology Advances 26 (2008). pg. 246–265
- [5] Eubeler J.P., Bernhard M., Zok S, Knepper T. P. *Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures*. Trends in Analytical Chemistry 28 (2009).
- [6] Rudník E., *Composting methods and legislativ*. Compostable Polymer Materials (2008). pg. 88-110.
- [7] Hea-Sun Yang H.S., Yoon J.S., Kim M.N. *Effects of storage of a mature kompostbon its potential for biodegradation of plastics*. Polymer Degradation and Stability 84 (2004). pg. 411-417.
- [8] Yamomoto M., Witt U., Skupin G., Beimborn G., Müller R.J. *Biodegradable aliphatic aromatic polyester „Ecoflex“*. [on-line]. [cit.4.12.2009]. Dostupné z www:
<www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v04/bpol4011_299_305.pdf>
- [9] *Biodegradable Polymers – Inspired by Nature: Ecoflex, Ecovio*. [on-line]. [cit. 21.11.2009]. Dostupný z www:
<www.plasticsportal.net/wa/plasticsEU~en_GB/function/conversions:/publish/common/upload/biodegradable_plastics/Ecoflex_Brochure.pdf>.

- [10] Skupin G. *Product Information* [on-line]. [cit. 21.11.2009]. Dostupný z www: <www.plasticsportal.net/wa/plasticsEU~en_GB/function/conversions:/publish/common/upload/biodegradable_plastics/Ecoflex_F_BX7011.pdf>.
- [11] Kijchavengkul T., Auras R., Rubino M., Alvarado E., Camacho Montero J. R., Rosales J. M. *Atmospheric and soil degradation of aliphatic aromatic polyester films*. *Polymer Degradation and Stability* 95 (2010)
- [12] [on-line]. [cit. 15.10.2009]. Dostupný z www: <www.plasticsportal.net/wa/plasticsEU~en_GB/function/conversions:/publish/common/content/campaigns/Ecoflex_presentation/english/index.htm>.
- [13] Mohee R., Unmar G.D., Mudhoo A., Khadoo P. *Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions*. *Waste Management* 28 (2008). pg. 1624–1629.
- [14] Chen Y., Tan L., Chen L., Yang Y., Wang X. *Study on biodegradable aromatic/aliphatic copolyesters*. *Brazilian journal of chemical engineering* 25 (2008). pg. 321-325.
- [15] Tan F.T., Cooper D.G., Maric M., Nicell J.A. *Biodegradation of a synthetic co-polyester by aerobic mesophilic microorganisms*. *Polymer Degradation and Stability* 93 (2008). pg. 1479–1485.
- [16] Müller R.J., Kleeberg I., Deckwer W.D. *Biodegradation of polyesters containing aromatic Constituents*. *Journal of Biotechnology* 86 (2001). pg. 87–95.
- [17] Rosa D.S., Grillo D., Bardi M.A.G., Calil M.R., Guedes C.G.F., Ramires E.C., Frollini E. *Mechanical, thermal and morphological characterization of polypropylene/biodegradable polyester blends with additives*. *Polymer Testing* 28 (2009). pg. 836–842.
- [18] Marten E., Müller R.J., Deckwer W.D. *Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic aromatic copolyesters*. *Polymer Degradation and Stability* 88 (2005). pg. 371-381.

- [19] Chandra R. Rustgi R. *Biodegradable polymers*. Department of Polymer Technology and Applied Chemistry (1998).
- [20] Han L., Zhu G., Zhang W., Chen W. *Composition, Thermal Properties, and Biodegradability of a New Biodegradable Aliphatic/Aromatic Copolyester*. *Journal of applied polymer science* 113 (2009). pg. 1298-1306.
- [21] Witt U., Einig T., Yamamoto M., Kleeberg I., Deckwer W.D., Muller R.J. *Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates*. *Chemosphere* 44 (2001). pg. 289-299.
- [22] Kasuya K., Ishii N., Inoue Y., Yazawa K., Tagaya T., Yotsumoto T., Kazahaya J., Nagai D. *Characterization of a mesophilic aliphatic-aromatic copolyester-degrading fungus*. *Polymer Degradation and Stability* 94 (2009). pg. 1190–1196.
- [23] Konečná Zuzana. *Mikrobiologie biodegradace materiálu na bázi polyesteru*. Diplomová práce (2009)

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	adipová kyselina
AFM	mikroskopie atomárních sil
ATP	adenosintrifosfát
B	butandiol
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
EPA	Environmental Protection Agency
EPD	Evropská směrnice o obalech
FTIR	infračervená spektroskopie s Furierovou transformací
GC	plynová chromatografie
GPC	Gelová permeační chromatografie
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
LDPE	nízkohustotní polyethylen
MM	minerální medium
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAS	Britský standard
PBT	poly(butylentereftalát)
PBAT	poly(butylendipát-co-butylentereftalát)
PCB	polychlorované bifenily
PE	polyethylen
PET	poly(etylentereftalát)
PLA	polymléčná kyselina
POP	perzistentní organické polutanty
PP	polypropylen
PS	polystyren

PUR	polyuretan
PVC	poly(vinylchlorid)
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
T	tereftalová kyselina
TC	technický výbor
TCD	tepelně vodivostní detektor
T. fusca	Thermobifida fusca
Tg	teplota skelného přechodu
Tm	teplota tání
Tt	teplota, při které probíhá biodegradace
XRD	rentgenová difrakční analýza

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Schéma polymerní biodegradace.....	14
Obr. 2 Kritéria pro kompostování [6]	22
Obr. 3 Chemická struktura materiálu Ecoflex (M-modulární jednotka)[8]....	24
Obr. 4 Příklad čtyř odlišných ester vazeb v náhodném BTA kopolyesteru. B: 1,4- butandiol, T: tereftalová kyselina A: adipová kyselina [18]....	26
Obr. 5 Mikroskopické snímky Ecoflexu ve formě prášku a) zvětšení 100x; nejmenší komůrka 50 μ m x 50 μ m, střední komůrka 50 μ m x 100 μ m a největší komůrka 100 μ m x 100 μ m b) zvětšení 400x ; rozměr komůrky 100 μ m x 100 μ m	56
Obr. 6 Elektronová mikroskopie vzorku ve formě prášku a) zvětšení 200x b) zvětšení 2000x	57
Obr. 7 Elektronová mikroskopie vzorku ve	57
Obr. 8 Závislost tepelného toku na teplotě pro vzorek ve formě tenké a tlusté folie a prášku.....	59
Obr. 9 Procenta mineralizace uhlíku ve formě CO ₂ vzorku Ecoflex v prostředí vyzrálého kompostu 1	61
Obr. 10 Koncentrace O ₂ v jednotlivých bioreaktorech v prostředí kompostu 1.....	62
Obr. 11 Procenta mineralizace uhlíku ve formě CO ₂ vzorku Ecoflex v prostředí vyzrálého kompostu 2.	64
Obr. 12 Koncentrace O ₂ v jednotlivých bioreaktorech v prostředí kompostu 2.....	65
Obr. 13 Mikroskopie vzorku Ecoflex ve formě folií zvětšeno 1000x a) tenká folie b) tlustá folie	67
Obr. 14 Elektronová mikroskopie vzorku folií po biodegradaci a) 1000x b) zvětšení 1000x.....	68

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 ISO normy pro biodegradační testy [1]	18
Tab. 2 Optimální podmínky pro aerobní kompostování [6]	21
Tab. 3 Základní vlastnosti materiálu Ecoflex [10]	30
Tab. 4 Navážky materiálů pro první pokus	49
Tab. 5 Navážky materiálů pro první pokus	51
Tab. 6 Parametry pro GC analýzu	53
Tab. 7 Charakteristické vlastnosti pro použité komposty	58
Tab. 8 Mikrobiální rozbor kompostu	58
Tab. 9 Hodnoty odečtené z křivky závislosti tepelného toku na teplotě	60
Tab. 10 Souhrn výsledků biodegradace pro pokus s kompostem 1	62
Tab. 11 Souhrn výsledků biodegradace pro pokus s kompostem 2	65
Tab. 12 Shrnutí stupně mineralizace uhlíku pro oba druhy kompostu (pro lepší srovnání jsou zde u kompostu 2 uvedeny vzorky z 82. dne biodegradace)	67
Tab. 13 Hodnoty delta H pro jednotlivé formy materiálu	69
Tab. 14 Dosažená procenta mineralizace u jednotlivých forem materiálu pro kompost 1 i 2.	70

EVIDENČNÍ LIST DIPLOMOVÉ PRÁCE

Sigla (místo uložení diplomové práce)	Ústřední knihovna UTB ve Zlíně
Název diplomové práce	Studium biodegradace aromaticko – alifatického kopolyesteru v kompostu
Autor diplomové práce	Bc. Kateřina Foltýnová
Vedoucí diplomové práce	Doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
Vysoká škola	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Adresa vysoké školy	nám. T. G. Masaryka 5555 760 01 Zlín
Fakulta (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Fakulta technologická náměstí T. G. Masaryka 275 762 72 Zlín
Katedra (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
Rok obhájení DP	2010
Počet stran	77
Počet svazků	3
Vybavení (obrázky, tabulky...)	14, 14
Klíčová slova	aromaticko-alifatický kopolyester, biodegradace, Ecoflex, kompost