

Biodegradace polyesterů a kopolyesterů s biodegradabilními plnivý

Bc. Jarmila Nováková

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Jarmila Nováková
Osobní číslo: T11085
Studijní program: N2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor: Inženýrství ochrany životního prostředí
Forma studia: prezenční
Téma práce: Biodegradace polyesterů a kopolyesterů
s biodegradabilními plnivými

Zásady pro vypracování:

1. Vypracovat literární rešerši, která se bezprostředně týká daného tématu.
2. Provést biodegradční experimenty se vzorky Ecoflexu (vzorky bez plniva, vzorky s plnivem) v prostředí různých půd a v kompostu.
3. V závislosti na časových možnostech uskutečnit další experimenty se vzorky.
4. Teorii, metodiku, výsledky experimentů a diskusi sepsat do formy DP.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vědecké databáze (Web of Science), vědecká a odborná literatura.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Petra Jančová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

8. února 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

17. května 2013

Ve Zlíně dne 8. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Přijetí a jméno: ...NOVÁKOVÁ JARMLA.....

Obor: CHTM-1027.....

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 obhajoby¹⁾;
- 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. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ 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 § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit 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 ...5.5.2013.

.....
NOVÁKOVÁ JARMLA

²¹⁾ 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 nevdělečně 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.

²²⁾ 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 vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

²³⁾ 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). Odpírá-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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Komerčně dostupné biologicky rozložitelné aromaticko-alifatické kopolyestery Ecoflex a Ecoflex s plnivem, jsou určeny pro výrobu mulčovacích filmů v oblasti zemědělství a navíc jsou používány i v mnoha dalších aplikacích. Tyto materiály ve formě fólií byly podrobeny biodegradačním testům za aerobních podmínek v půdním prostředí a v prostředí kompostu, s cílem porovnat míru biodegradace u obou vzorků.

Biodegradační testy probíhaly 99 dní (14 týdnů) a biodegradace byla hodnocena metodou plynové chromatografie s teplotně vodivostní detekcí (GC/TCD), měřením produkce oxidu uhličitého (CO₂).

Z výsledků biodegradačních testů bylo potvrzeno, že Ecoflex s přídavkem škrobového plniva je lépe biologicky rozložitelný. Nejvyšší biodegradace, cca 55 %, bylo dosaženo u vzorků Ecoflexu s plnivem v prostředí nejenom kompostu, ale i v prostředí zemědělských půd. Biodegradace Ecoflexu bez plniva dosahovala cca 15 % v prostředí kompostu a cca 8 % v prostředí zemědělských půd. Následně byl také proveden mikrobiologický rozbor půd a kompostu. Vliv půdního prostředí na povrch testovaných fólií byl zkoumán pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), kterou byly závěry z biodegradačních testů o lepší biodegradovatelnosti Ecoflexu s plnivem potvrzeny.

Klíčová slova: Biodegradace, Aromaticko-alifatický kopolyester, Ecoflex, Škrob, Půda, Kompost, Plynová chromatografie

ABSTRACT

A pure Ecoflex and Ecoflex with starchy filler are commercial biodegradation aliphatic-aromatic copolyesters which have been developed for an industrial production of mulch films in agriculture and moreover these materials can be use in many other applications. The pure Ecoflex and Ecoflex with starchy filler in form of films were subjected to biodegradation tests. Biodegradation tests were performed under aerobic conditions in soil environment and an environment of compost. The goal of these biodegradation tests was to compare a biodegradation rate for both Ecoflex materials.

Biodegradation tests were performed for 99 days (14 weeks). Biodegradation was evaluated by measuring of carbon dioxide production using gas chromatography with thermal conductivity detection (GC/TCD).

It was confirmed by the biodegradation tests that the Ecoflex with starchy filler was more biodegradable than the pure Ecoflex. In a case of the Ecoflex with a starchy filler, there was achieved the highest biodegradation rate about 55 %. This biodegradation took place in an environment of compost and the agricultural soil as well. Biodegradation of the pure Ecoflex reached roughly 15 % in a case of compost and about 8 % in a case of agricultural soil. Microbiological analysis of soils and compost was carried out subsequently. Influences of the biological environment on surface of films were investigated by using scanning electron microscopy (SEM). This method confirmed better degradation abilities of the Ecoflex with filler than without.

Keywords: Biodegradation, Aromatic-aliphatic copolyester, Ecoflex, Starch, Soil, Compost, Gas chromatography

Motto:

Není důležitá kvantita ale kvalita vědomostí. Je možné mít více množství vědomostí, ale neznat to nejdůležitější.

Tolstoj Lev Nikolajevič

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí paní Mgr. Petře Jančové, Ph.D., za odborné vedení, ochotu a cenné připomínky, které mi poskytla při vypracování této diplomové práce. Taktéž všem zaměstnancům ÚIOŽP Fakulty technologické UTB ve Zlíně, za ochotu a pomoc při práci. Zároveň děkuji své rodině za trpělivost a velkou podporu v celém průběhu mého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BIODEGRADACE, BIODEGRADABILNÍ POLYMERY	13
1.1 MECHANISMY BIODEGRADACE.....	15
1.2 STUPNĚ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI.....	15
1.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BIOLOGICKÝ ROZKLAD	15
2 BIOLOGICKY ROZLOŽITELNÉ POLYESTERY A KOPOLYESTERY	17
2.1 KYSELINA POLYMLÉČNÁ (PLA)	20
2.2 POLY-ε-KAPROLAKTON (PCL).....	20
2.3 POLY-B-HYDROXYALKANOÁTY (PHAS)	21
3 AROMATICKO-ALIFATICKÝ KOPOLYESTER	22
3.1 ECOFLEX	22
3.1.1 Struktura.....	23
3.1.2 Zpracování.....	24
3.1.3 Vlastnosti.....	24
3.1.4 Aplikace	25
3.2 ECOFLEX S PLNIVEM	25
4 BIODEGRADACE POLYESTERŮ A KOPOLYESTERŮ V PROSTŘEDÍ	28
5 CÍL PRÁCE	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
6 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ, CHEMIKÁLIE, PLYNY, ROZTOKY	35
6.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	35
6.2 CHEMIKÁLIE.....	35
6.3 PLYNY	36
6.4 ROZTOKY	36
6.4.1 Zásobní roztoky použity na přípravu minerálního média	36
6.4.2 Roztok stopových prvků	37
6.4.3 Minerální médium	38
6.4.4 Suspendační roztok (médium).....	38
6.4.5 Fyziologický roztok	39
6.4.6 Chloroformový roztok Ecoflexu	39
6.5 TUHÁ ŽIVNÁ MÉDIA	39
6.5.1 Tryptone yeast extract agar (TYA agar)	39
6.5.2 Glycerol – dusičnanový agar (GD agar)	39
6.5.3 Půdní agar s bengálskou červení a chloramfenikolem.....	40
6.5.4 Minerální agar	41
7 METODIKA A PRACOVNÍ POSTUPY	42
7.1 CHARAKTERISTIKA PŮD A KOMPOSTU	42
7.1.1 Půdní substrát	42
7.1.2 Substrát kompostu.....	43
7.1.3 Stanovení pH.....	43

7.1.4	Stanovení sušiny půd a kompostu	43
7.1.5	Stanovení spalitelného podílu půd a kompostu.....	44
7.2	MIKROBIÁLNÍ ROZBOR PŮD A KOMPOSTU	45
7.2.1	Příprava půdní suspenze mikroorganismů a suspenze mikroorganismů kompostu (extrakce vzorků půd a kompostu do suspenzačního média).....	46
7.2.2	Desetinné ředění	46
7.2.3	Očkování živných půd i kompostu, ředění na živných půdách a inkubace	46
7.2.4	Stanovení počtu mikroorganismů	47
7.2.5	Záchyt degradačních mikroorganismů na minerálním agaru.....	48
7.2.5.1	Příprava tenkého filmu Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem	48
7.3	CHARAKTERISTIKA ECOFLEXU A ECOFLEXU S PLNIVEM	48
7.4	BIODEGRADAČNÍ EXPERIMENT	49
7.4.1	Příprava biometrických lahví	49
7.4.2	Příprava obsahu bioreaktoru	50
7.5	ANALÝZA PRODUKOVANÉHO CO ₂ POMOCÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRRAFIE.....	53
7.5.1	Provzdušňování bioreaktorů (biometrických lahví).....	55
7.5.2	Vyhodnocení biodegradačních testů	56
7.5.3	Zpracování naměřených dat	57
7.6	SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE	58
7.7	MECHANICKÉ VLASTNOSTI ECOFLEXU A ECOFLEXU S PLNIVEM	59
7.7.1	Tahová zkouška (pevnost v tahu).....	61
III	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	64
8	CHARAKTERISTIKA PŮD, KOMPOSTU A VZORKŮ	65
8.1	STANOVENÍ PH, SUŠINY A SPALITELNÉHO PODÍLU PŮD A KOMPOSTU.....	65
8.2	STANOVENÍ POČTU MIKROORGANISMŮ V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ A V PROSTŘEDÍ KOMPOSTU	65
8.3	POKUS O VÝSKYT DEGRADAČNÍCH MIKROORGANISMŮ NA MINERÁLNÍM AGARU.....	67
8.4	VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI	69
8.5	SLEDOVÁNÍ POVRCHOVÝCH ZMĚN U VZORKŮ ECOFLEXU A ECOFLEXU S PLNIVEM POMOCÍ SKENOVACÍ ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE (SEM)	74
8.6	SLEDOVÁNÍ VIZUÁLNÍCH ZMĚN NA POVRCHU FILMŮ PO ODEBRÁNÍ TESTOVANÝCH VZORKŮ Z PŮDNÍCH REAKTORŮ A Z REAKTORŮ S KOMPOSTEM	79
	ZÁVĚR	82
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	83
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	88
	SEZNAM OBRÁZKŮ	90
	SEZNAM TABULEK.....	92
	SEZNAM PŘÍLOH.....	93

ÚVOD

Přírodní materiály byly nahrazeny syntetickými polymery již před několika lety. Plasty jsou používány v různých průmyslových oblastech, a tudíž se staly nepostradatelnou součástí našeho života. Postupným vývojem se zvýšila jejich životnost, stabilita a odolnost vůči životnímu prostředí; staly se odolnějšími vůči vodě (vlhkosti) i mikroorganismům (biodegradaci).

Spotřeba polymerních materiálů v roce 1990 byla odhadnuta na přibližně 150 milionů tun, 80 – 100 kg na obyvatele v průmyslově vyspělých zemích. Přibližně 40 % z celkové výroby je zlikvidováno na skládkách.

Biologicky rozložitelné plasty získaly velký zájem; patří mezi ně např. polyestery: polyhydroxybutyrát (PHB), polykaprolakton (PCL) a kyselina polymléčná (PLA). Vzhledem k omezeným materiálovým vlastnostem alifatických polyesterů, byly vyvinuty nové biologicky rozložitelné alifaticko-aromatické kopolyestery a uvedeny na trh pod obchodním názvem Ecoflex německou společností BASF.

Tyto kopolyestery podstupují řízené degradaci pomocí mikroorganismů v přirozeném prostředí. Polymery s heteroatomy v hlavním řetězci jsou náchylnější k hydrolytickému štěpení. Biologicky rozložitelné polymery mohou být rozloženy mikroorganismy v přírodním prostředí na oxid uhličitý (CO_2) a vodu (H_2O). Používají se jako obalový materiál, kompostovací pytle a nyní začaly poskytovat nové výhody v zemědělství jako mulčovací fólie. Použití polymerů v různých aplikacích je omezené, kvůli vysoké ceně a snížením vlastností (fyzikálních, mechanických, zpracovatelských). Před několika lety k biodegradačním materiálům se začaly přidávat plniva (např. škrob, celulóza, karboxymethylcelulóza). Materiály na bázi škrobu jsou často velmi citlivé na vlhké podmínky, výrazně snižují mechanické vlastnosti v suchém a vlhkém prostředí, ale zároveň zlepšují biodegradabilitu. Materiál se stane mnohem více náchylný k mikrobiálnímu napadení.

Hlavní výhodou biodegradabilních polymerů je, že mohou být zahrnuty do procesu kompostování, čímž se sníží náklady na odstranění plastových odpadů v životním prostředí, a tím se sníží i objem odpadu.

TEORETICKÁ ČÁST

1 BIODEGRADACE, BIODEGRADABILNÍ POLYMERY

Biodegradace je proces, který je ovlivněn množstvím, druhem dostupných mikroorganismů (bakterií, plísní) a jejich mikrobiální činností, která je citlivá na změnu prostředí (teplota, vlhkost, pH, poměr C:N (uhlík:dusík)) a množství kyslíku. Biodegradace může probíhat u přírodních látek i látek antropogenního původu. Způsobuje přeměnu, rozklad organické hmoty na oxid uhličitý (CO_2), vodu (H_2O), soli a vede k tvorbě biomasy. Proces může probíhat buď mimo buňku, uvnitř buňky nebo i kombinací těchto dvou mechanismů [1, 2, 3, 32].

Mikrobiální vlastnosti enzymů vyplývají z distribuce, druhů mikroorganismů, růstových podmínek (např. vlhkost, pH, kyslík, teplota, živiny) a na typu enzymu (intracelulární a extracelulární). Biodegradaci hlavně ovlivňuje chemická struktura a povrch (plocha povrchu, hydrofilní, hydrofobní vlastnosti) polymerů [5].

Biologický rozklad umožňující maximální degradaci, lze měřit třemi parametry:

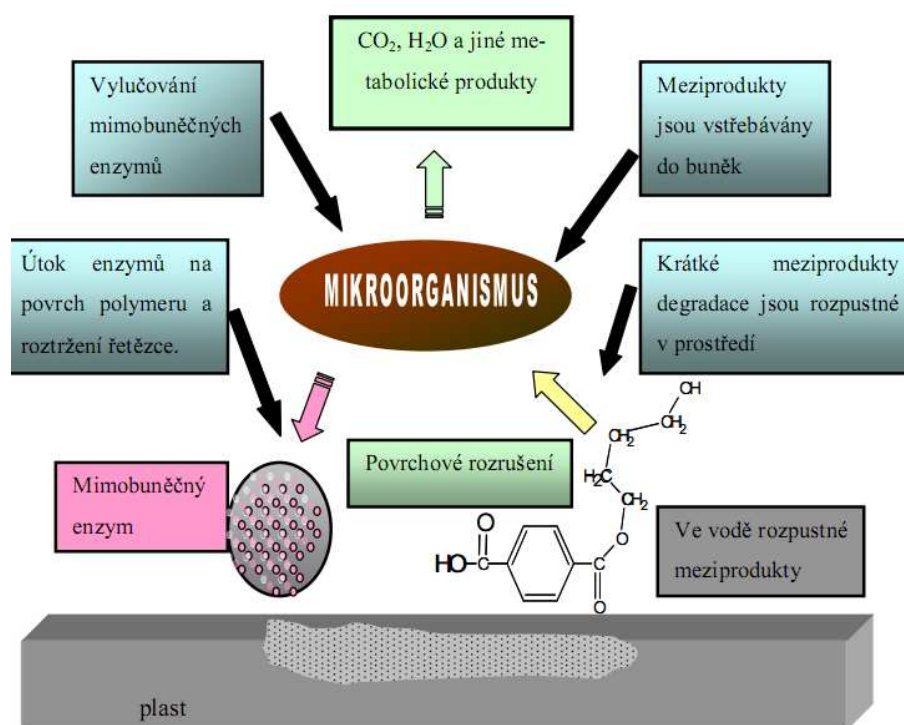
- Produkci oxidu uhličitého (CO_2).
- Chemickou nebo biochemickou spotřebou kyslíku (CHSK, BSK).
- Snížením rozpustnosti organického uhlíku (DOC) [1].

Rozeznáváme čtyři stupně rozkladu organických látek:

- Primární rozklad – minimální stupeň rozkladu pro změnu struktury sloučeniny.
- Částečný rozklad – tvoří se jednodušší, biochemicky již stabilní sloučeniny.
- Přijatelný rozklad – rozkladem se odstraní škodlivé vlastnosti organické látky (pěnivost).
- Úplný rozklad – přeměna prvků (C, H, N, O, S, P) vázaných v organických sloučeninách na CO_2 , H_2O , NH_3 , H_2 , SO_3^- , PO_4^- v aerobních podmínkách [30].

Biodegradace se řídí typem organismů a různými vlastnostmi polymerů jako jsou molekulová hmotnost, krystalinita, přítomnost funkčních skupin a substituentů ve struktuře. Přísady přidávané do polymerů hrají rovněž důležitou roli při biodegradaci. Stupeň krystalinity je jedním z hlavních faktorů určující rychlost biologické rozložitelnosti polymerů, protože rozklad začíná v amorfni oblasti, a pak pokračuje do krystalické oblasti [3, 7].

Organické sloučeniny se rozkládají na oxid uhličitý (CO_2), vodu (H_2O) za aerobních podmínek a methan (CH_4), oxid uhličitý (CO_2) za anaerobních podmínek. Biodegradace byla definována různými způsoby v různých výzkumech. Je definována jako změna povrchových vlastností, ztrátou mechanické pevnosti, asimilací mikroorganismy, degradací enzymy, rozkladem základního řetězce a snížením průměrné molekulové hmotnosti polymerů. Degradace může nastat některým z výše uvedených mechanismů nebo jejich kombinací (viz Obr. 1) [20].



Obr. 1: Postup biologické rozložitelnosti [3]

Biotické a abiotické faktory působí synergicky k rozkladu organického materiálu. Abiotické podmínky (sluneční záření, teplo, vzduch, voda, půda) mohou působit na polymerní materiály, a tudíž přispívat k degradaci. Abiotický rozklad předchází mikrobiální asimilaci [2].

Podle výchozích surovin lze biodegradabilní polymery dělit do tří skupiny:

1. Biodegradabilní polymery na syntetické bázi (zemní plyn, ropa).
2. Biodegradabilní polymery na bázi obnovitelných zdrojů (škrob, celulóza).
3. Kombinace biodegradabilních polymerů [6, 22].

1.1 Mechanismy biodegradace

Biologicky rozložitelné polymery jsou ve vodě nerozpustné. Extracelulární enzymy z mikroorganismů rozkládají složité polymery na krátké řetězce nebo na menší molekuly např. monomery, dimery a oligomery, které mohou projít vnější bakteriální polopropustnou membránou. Tento proces se nazývá depolymerizace. Následně jsou tyto řetězce nebo molekuly mineralizovány na CO_2 , H_2O , CH_4 a jsou využívány jako zdroj uhlíku a energie [3].

1.2 Stupně biologické rozložitelnosti

- Biodeteriorace (biologické znehodnocení) – rozštěpení materiálu na zlomkové části za působení mikrobiálních společenstev, jiných rozkládajících organismů a abiotických faktorů.
- Depolymerizace – působením mikroorganismů a jejich katalytických látek (volné radikály, enzymy) dochází k štěpení polymerních molekul na monomery, oligomery a dimery.
- Asimilace – receptory mikrobiálních buněk rozpoznávají molekuly procházející přes plazmatickou membránu, zatímco nerozpoznané zůstávají v extracelulárním okolí. V cytoplasmě dochází k začlenění přepravovaných molekul a aktivaci buněčného metabolismu – je produkována energie, nová biomasa a dochází k četným primárním a sekundárním metabolickým přeměnám.
- Mineralizace – do prostředí jsou uvolňovány jednoduché molekuly jako N_2 , CO_2 , CH_4 , H_2O a další soli intracelulárních metabolitů [2, 29].

1.3 Faktory ovlivňující biologický rozklad

Biodegradaci ovlivňuje především teplota, pH, vlhkost, přítomnost kyslíku, světlo a přítomnost mikroorganismů. Mikroorganismy produkující enzymy značně ovlivňují biologickou rozložitelnost. V aerobním prostředí se pH zvyšuje, např. v prostředí kompostu se pH zvýší na hodnotu 8 – 9, v anaerobním prostředí dochází ke snížení pH, jelikož mikroorganismy produkují organické kyseliny [5].

Struktura polymerů je spojena s biologickou rozložitelností. Biodegradaci ovlivňují chemické i fyzikální vlastnosti: stav povrchu (hydrofilní a hydrofobní vlastnosti), chemická struktura (složení a druh vazeb), molekulová hmotnost (se vzrůstající molekulovou hmotností, klesá biodegradabilita), stupeň a typ větvení, polymerační stupeň, teplota skelného přechodu, teplota tání (ovlivňuje enzymatickou degradaci polymerů; vyšší teplota tání představuje nižší biodegradabilitu), modul pružnosti a krystalická struktura (enzymy nejprve napadnou amorfni část, protože je méně odolná biodegradaci na rozdíl od části krystalické; s nárůstem krystalinity polymeru, rychlost rozkladu klesá) polymerů hrají důležitou roli v biodegradabilních procesech [5].

2 BIOLOGICKY ROZLOŽITELNÉ POLYESTERY A KOPOLYESTERY

Biologicky rozložitelné plasty zvyšují úrodnost půdy, redukují objem těchto plastových materiálů v životním prostředí a snižují náklady na nakládání s odpadem [5].

Jde především o polymery, jež mají ve svém hlavním řetězci heteroatom. Hydrolytickému rozkladu podléhají vazby esterové, etherové a amidové. Biologicky odbouratelné polymerní materiály jsou schopné rozkladu na oxid uhličitý (CO_2), metan (CH_4), vodu (H_2O), anorganické sloučeniny nebo biomasu [5, 6].

Faktory, jako jsou krystalinita, krystalová struktura, molekulární orientace, teplota skelného přechodu (T_g) a teplota tání (T_m), přispívají k degradační rychlosti alifatických polyesterů. Na degradaci polyesterů má zásadní vliv chemická struktura a stav povrchu [16].

Trh biologicky rozložitelných materiálů výrazně roste každý rok, a proto by měly být splněny následující požadavky:

- Nové materiály by měly být testovány a následně splňovat podmínky podle standardních zkušebních metod (DIN 54900, JIS, ASTM, CEN, ISO).
- Nové biodegradabilní plasty by měly mít dobré vlastnosti a jejich zpracovatelnost by měla být srovnatelná s konvenčními plasty.
- Tyto materiály by měly být ekonomicky výhodnější (konkurenční cena, dodávky v dostačujícím množství) [4].

Pokud je materiál označen jako biologicky rozložitelný, splňuje za podmínek kompostování následující podmínky:

- Zkušební polymer je ve formě filmu, prášku nebo granulí převeden z 90 % na CO_2 , vodu a biomasu prostřednictvím mikrobiální asimilace.
- Testovaný materiál musí mít stejné tempo biologického rozkladu jako přírodní materiály (tráva, listy, papír nebo zbytky potravin).
- Zkušební materiál by měl být podroben procesu kompostování 180 dní nebo méně (ASTM D6400) [6].

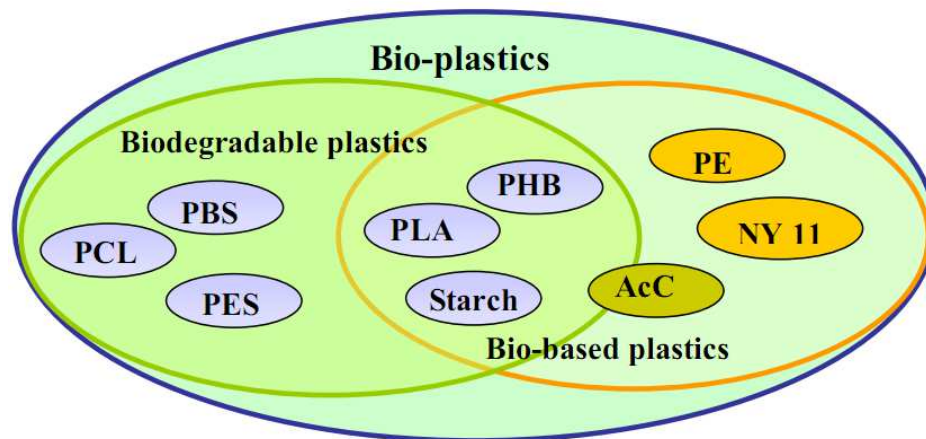
Po 90 denní expozici v procesu kompostování můžeme rozdělit materiály podle rozdílné rychlosti degradace do tří skupin:

- Materiály rychle degradovatelné, jako je škrob nebo rostlinná vlákna, kdy dochází během těch 90 dnů k 80 % hromadné ztrátě.
- Materiály středně degradovatelné (dřevní vlákno na bázi papíru a kokosové vlákno), kdy dochází k cca 40 % hromadné ztrátě.
- Materiály pomalu degradovatelné (PLA, PP a PCL), kdy dochází k zanedbatelné ztrátě hmotnosti (cca 5 %) [6].

Mezi nejpoužívanější standardní metody určující biodegradaci patří:

- Vizuální pozorování, kdy je možné pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) pozorovat např. zdrsnění povrchu, tvorbu děr nebo prasklin, změnu barvy v důsledku biodegradace.
- Sledování ztráty hmotnosti, kdy je stanoven zbytek polymeru. Sledování úbytku hmoty vzorků ve formě filmů je široce používáno v rozkladných testech.
- Studium změn mechanických vlastností a molární hmotnosti.
- Měření produkce/spotřeby plynů (CO_2 , O_2) za aerobních podmínek, kdy mikroby využívají kyslík k oxidaci uhlíku a CO_2 je jedním z hlavních metabolických konečných produktů [3].

Čtyři hlavní alifatické polyestery (viz *Obr. 2*) byly vyvinuty jako biologicky odbouratelné plasty. Jsou jimi: PHB (polyhydroxybutyrát), PCL (polykaprolaktonová kyselina), PBS (polybutylén sukcinát), PLA (polymlečná kyselina). PHB se nepoužívá pro rozsáhlejší aplikace kvůli vysoké ceně. Biodegradční mechanismy polyesterů hrají významnou roli ve vývoji biologicky rozložitelných plastů. Pochopením biologické rozložitelnosti se minimalizovaly škodlivé účinky polyesterů v prostředí. Stanovení počtu a rozmanitosti degradujících mikroorganismů v různých ekosystémech je nezbytně nutné, protože tyto jsou zodpovědné za rozklad polyesterů v životním prostředí. $\text{PHB} = \text{PCL} > \text{PBS} > \text{PLA}$. Procento degradujících mikroorganismů pro PHB, PCL, PBS, PLA v půdním prostředí byl odhadnut na 0,2 – 11,4; 0,66 – 11,0; 0,2 – 6,0 a 0 – 0,04 % z celkového počtu kolonií v uvedeném prostředí. Bod tání alifatických polyesterů je závislý na jeho struktuře [12, 16].



Obr. 2: Biologicky rozložitelné plasty [5]

Vysvětlivky:

PBS – polybutylén sukcinát; PCL – polykaprolaktonová kyselina; PES – Polyester; PHB – polyhydroxybutyrát; PLA – kyselina polymléčná; Starch – Škrob; PE – Polyethylen; NY 11 – Nylon 11; AcC – Acetyl celuloza [5].

Syntetické alifatické polyestery jako PBA, PBS, PCL mají hodnotu teploty skelného přechodu (T_g) pod $0\text{ }^\circ\text{C}$ a teplotu tání (T_m) mezi 40 a $115\text{ }^\circ\text{C}$. Enzymatická rozložitelnost syntetických alifatických polyesterů se snížila se zvýšením teploty tání (T_m). Pohyb v polymerním řetězci v amorfní oblasti je mnohem vyšší, než v krystalické oblasti [16].

Různé polyestery hrají významnou roli v souvislosti s průmyslem. Již od roku 70., byla vyvinuta výroba a zpracování biologicky rozložitelného plastu polyhydroxybutyrátu (PHB). PHB je přírodní alifatický polyester a patří do skupiny polyhydroxyalkanoát. K dispozici na trhu je pod obchodním názvem „Biopol“. V současnosti nejdůležitější alifatický biodegradabilní polyester je poly(ϵ -kaprolakton) (PCL). PCL vykazuje značné nevýhody, např. nízká teplota tání (T_m) cca $60\text{ }^\circ\text{C}$ [8].

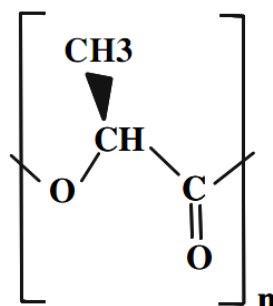
Na rozdíl od většiny alifatických polyesterů, aromatické polyestery jako poly(ethyltereftalát) (PET) nebo poly(buthyltereftalát) (PBT) zajišťují vynikající vlastnosti materiálu, a proto mají široké použití (např. láhve). Tyto polymery jsou odolné proti mikrobiálnímu napadení. Kyselina tereftalová, adipová a 1,4-butandiol se ukázaly být nejvhodnější kombinací pro biodegradaci, s ohledem na vlastnosti materiálu a cenu. Aromatické polyestery jsou odolné vůči hydrolýze za mírných podmínek [8].

Rychlost biologické degradace klesá, se zvýšením obsahu nad 60 mol% kyseliny tereftalové v kopolymeru, a proto nejsou tyto materiály vhodné pro degradaci za kompostovacích podmínek [8].

Účelem úpravy alifatického polyesteru je zavedení aromatické složky (kyseliny tereftalové), čímž dojde ke zlepšení tepelných a mechanických vlastností materiálů, zejména s ohledem na jejich technické aplikace [9].

2.1 Kyselina polymléčná (PLA)

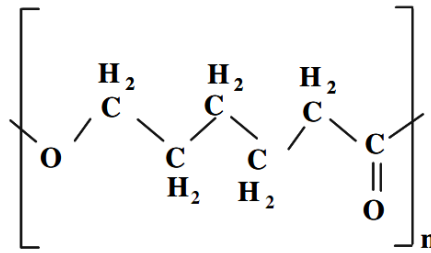
Komerčně se PLA vyrábí většinou jako kopolymer dvou isomerních monomerů kyseliny D-mléčné a L-mléčné (viz *Obr. 3*). PLA je polymer z kyseliny mléčné, připraven fermentací z obnovitelných zdrojů, jako je škrob a glukosa. Polykondenzací pak vzniká biodegradabilní plast s teplotou tání cca 170 °C a s teplotou skelného přechodu cca 55 °C. PLA se používá pro lékařské aplikace, jako jsou vstřebatelné šicí materiály, a proto jsou hydrolyzovány v lidském těle [16].



Obr. 3: Chemická struktura L-PLA [16]

2.2 Poly-ε-kaprolakton (PCL)

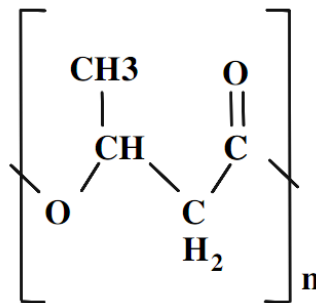
PCL je biologicky odbouratelný syntetický semikrystalický alifatický polyester (viz *Obr. 4*) vyrobený z ropy. Připravuje se katalytickou polymerací otevřením kruhu ε-kaprolaktonu. Nízký bod tání 58 – 60 °C umožňuje lepší vlastnosti v obalové technice. Směs PCL se škrobem se používá k výrobě biologicky rozložitelných odpadkových pytlů. PCL se rozkládá hydrolyzou esterové vazby. Pomocí *Penicillium sp.* byla studována mikrobiální degradace PCL. Polykaprolakton byl používán pro medicínské účely v některých zemích [16].



Obr. 4: Chemická struktura PCL [16]

2.3 Poly- β -hydroxyalkanoáty (PHAs)

PHAs jsou přirozeně se vyskytující alifatické polyestery (viz Obr. 5), které slouží jako intracelulární zásobní látky. Průmyslově se vyrábí fermentací v bioreaktorech, ve stopovém množství se vyskytuje v živočišných i rostlinných buňkách. PHB (polyhydroxybutyrát) je nejběžnějším zástupcem PHAs. Jeho materiálové vlastnosti jsou: vysoký stupeň krystalinity, křehkost, tuhost a vysoký bod tání 175 °C; jsou srovnatelné s konvenčními plasty. Mohou být degradovány mikroorganismy na CO₂ a H₂O za aerobních podmínek nebo na CH₄ za anaerobních podmínek v různém prostředí. Širokému uplatnění PHB brání křehkost a vysoké výrobní náklady. Ke zlepšení vlastností může dojít smísením polyesterů s jinými biodegradabilními polymery např. PCL [16].



Obr. 5: Chemická struktura PHB [16]

3 AROMATICKO-ALIFATICKÝ KOPOLYESTER

Tradiční plastové materiály se ukázaly být velmi odolné vůči vlivům prostředí, jako je vlhkost nebo mikrobiální napadení. Polymery s heteroatomy v hlavním řetězci jsou náchylné k hydrolytickému štěpení, např. amidové skupiny nebo esterové vazby [9].

Využití biodegradabilních materiálů jsou obaly, kompostovatelné pytle na bioodpad, zemědělské fólie a ochranné nátěry. Pokud mají tyto biodegradabilní materiály najít širší uplatnění na trhu, musí vyhovět standardním testovacím metodám (DIN 54900, CEN, ISO, ASTM, JIS), být lehce zpracovatelné, mít vlastnosti srovnatelné s běžnými druhy, konkurenceschopnou cenu a dobrou distribuční síť [26, 28].

Kopolyestery s aromatickou strukturou jsou biologicky rozložitelné a nemají žádné škodlivé účinky na životní prostředí [8].

Aromaticko-alifatické kopolyestery vykazují přijatelné tepelné a mechanické vlastnosti s 35 mol% kyseliny tereftalové, přičemž míra biodegradace rychle klesá, když je přítomno více než 55 mol% kyseliny tereftalové. Aby měl daný kopolyester optimální vlastnosti (biologickou rozložitelnost a užitečné vlastnosti) mělo by se množství kyseliny tereftalové pohybovat v rozmezí 35 – 55 mol% v BTA kopolyesterech (1,4-butandiol, kyselina adipová a tereftalová) [9].

Jedním z prvních výrobců těchto materiálu je komerční společnost BASF v Německu. Již v roce 1990 začala zpracovávat studii využitelnosti biodegradabilních a kompostovatelných materiálů. V roce 1998 začala vyrábět kopolyester BTA, který je nyní na trhu pod obchodním názvem Ecoflex. Společnost EASTMAN (USA) vyrábí kopolyester BTA pod názvem „Easter“ [8, 26, 28].

Chování aromatických meziproductů v kopolyesteru byly zkoumány použitím speciálně syntetizovaných aromatických modelových oligomerů [12].

3.1 Ecoflex

V roce 1998 německá komerční společnost BASF vyvinula biologicky rozložitelný kopolyester pod obchodním názvem Ecoflex. Produkt je certifikován podle německého standardu DIN V 54900 vzhledem k jeho biodegradovatelnosti a kompostovatelnosti. Vyhovuje přísným Evropským normám pro rozklad (EN 13432) [4, 15, 24, 25, 31].

Ecoflex je:

- Ideální směs pro bioplasty.
- Certifikovaný pro kompostování.
- Elastický a odolný proti roztržení.
- Zpracován konvenčním vyfukovacím zařízením.
- Svařitelný a tisknutelný.
- Vhodný pro kontakt s potravinami [10, 21].

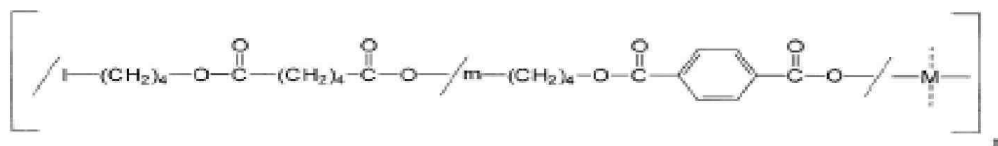
Ecoflex je používán v různých aplikacích, a proto musí splňovat následující mezinárodní, národní normy a předpisy pro průmyslové kompostování:

- European standard EN 13432.
- Australian standard AS 4736.
- Japanese standard GreenPla.
- American standard ASTM 6400 [10].

Ekologické vlastnosti Ecoflexu byly zkoumány v rozsáhlých zkouškách např. v testech na růst rostlin nebo *Daphnia* (perloočka) testu. Toxikologické zkoušky podle OECD směrnice prokázaly, že v praxi Ecoflex nemá žádné negativní dopady na životní prostředí. Navíc, Ecoflex je ve svém složení jedním z mála kompostovatelných polymerů, které splňují požadavky evropského nařízení ve styku s potravinami US Food Contact Substance Notification [10, 21].

3.1.1 Struktura

Ecoflex je aromaticko-alifatický kopolyester složený z kyseliny tereftalové, kyseliny adipové, 1,4-butandiolu a modulárních jednotek (*Obr. 6*). Připravuje se transesterifikací poly(butyltereftalátu) (PBT), kyseliny adipové a 1,4-butandiolu. Modulární systém umožňuje začlenění hydrofilních monomerů s větvením, což vede k prodloužení řetězce [4, 20, 26, 28].



Obr. 6: Chemická struktura aromaticko-alifatického kopolyesteru Ecoflex [4]

3.1.2 Zpracování

Vytlačené filmy z Ecoflexu lze zpracovávat běžným vyfukovacím zařízením jako LDPE (Low-density polyethylen). Výborné tažné vlastnosti Ecoflexu vedou k vytvoření velmi tenkých fólií < 20 μm . Filmy vyrobené z Ecoflexu mohou být svařovány konvenčním zařízením [4].

3.1.3 Vlastnosti

Aromaticko-alifatické kopolyestery spojují biodegradabilitu alifatických polyesterů s fyzikálními vlastnostmi a tepelnými vlastnostmi aromatických polyesterů [4].

Mechanické vlastnosti Ecoflexu jsou srovnatelné s LDPE (nízkohustotní polyethylen). Filmy jsou odolné proti mechanickému poškození, jsou flexibilní, odolné proti vodě a změnám vlhkosti. Fólie z Ecoflexu jsou prodyšnější, díky své mírné propustnosti vodních par a jsou mnohem pevnější než LDPE filmy [4, 26, 28].

Tab. I.: Základní materiálové vlastnosti materiálu Ecoflex (50 μm fólie) [4]

Vlastnosti	Ecoflex
Hustota	1,25 – 1,27 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
Teplota tání T_m	110 – 115 $^{\circ}\text{C}$
Teplota skelného přechodu T_g	-30 $^{\circ}\text{C}$
Tvrдость (podle Shorea)	32
Průzračnost	82%
Pevnost v tahu	32/36 $\text{N}\cdot\text{mm}^{-2}$
Mez pevností	32/36 $\text{N}\cdot\text{mm}^{-2}$
Propustnost kyslíku	1600 cm^3 ($1/\text{m}^2\cdot\text{d}\cdot\text{bar}$)
Míra pronikání vodní páry	140 g ($1/\text{m}^2\cdot\text{d}$)

3.1.4 Aplikace

Typické aplikace Ecoflexu jsou kompostovací pytle pro organický odpad, filmy pro zemědělství, domácí filmy, laminátový povlak a na nádobí ze stravovacího občerstvení (např. talíř, lžička) [4, 21, 26, 28]:

- Kompostovatelné pytle pro organický odpad – Ecoflex splňuje požadavky na kompostovací pytle, mezi které patří pevnost, odolnost vůči vodě a doba, po kterou zůstávají stabilní, a poté mohou být zpracovány v kompostovacím zařízení.
- Mulčovací filmy – použití těchto fólií vede k dřívější sklizni, vyšším výnosům a lepší kvalitě úrody. Výhodou je, že filmy jsou vyrobeny z biodegradabilního materiálu a mohou být po sklizni společně s rostlinami zaorány do půdy.
- Potažené nebo laminované materiály (povlaky) – použití zejména na obalové materiály, kelímky na pití, obaly z rychlého občerstvení, krabice a různé nádoby pro mražené výrobky.
- Transparentní fólie pro balení potravin – přidáním speciálních přísad a optimalizováním podmínek zpracování lze získat i průhledné fólie. Tyto filmy mohou být využity pro balení potravin např. masa, zeleniny a ovoce.

Za kompostovacích podmínek se fólie z Ecoflexu odbourávají ve vyzrálém kompostu při 58 °C během 14 dní více než z 50 %. Mulčovací fólie vyrobené z tohoto materiálu je možno po sklizni jednoduše zaorat společně se zbytky rostlin do země, kde se fólie postupně zcela rozloží [26].

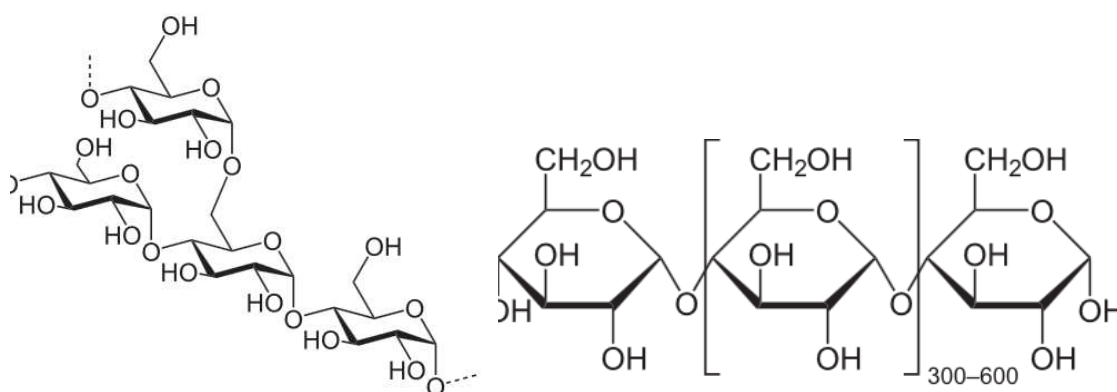
3.2 Ecoflex s plnivem

K Ecoflexu se mohou přidávat různé směsi např. kyselina polymléčná (PLA), ale i škrob, aby se dosáhlo určitých vlastností pro konečné aplikace. Vysoký obsah Ecoflexu je vhodný zejména pro výrobu pružných filmů v obalové technice. Mechanické vlastnosti, jako je pevnost nebo odolnost proti roztržení, mohou být různě upraveny [27, 31].

Zcela biodegradabilní polymery se získají smícháním hydrofilního škrobu s hydrofobními biodegradabilními polymery (např. Ecoflex), což vede k lepším mechanickým vlastnostem: vyšší pevnost a tažnost při přetržení, antistatičnost, propustnost kyslíku, vodních par a jsou příjemné na dotek [4].

Ceny biologicky rozložitelných plastů jsou ve srovnání se spotřebními plasty značně vyšší. Výrobci se snaží zvýšit biodegradabilitu mísením se škrobem, což je levná a dostupná surovina, přesto jsou finální produkty drahé [4].

Nejvíce používaným biodegradabilním plnivem je škrob. Škrob je semikrystalický polymer. Např. granule kukuřičného škrobu obvykle obsahují přibližně 70 % amylopektinu a 30 % amylosy (struktura viz *Obr. 7*). Poměr těchto dvou složek charakterizuje materiály s velmi odlišnými vlastnostmi. Škrob je lehce dostupný a relativně levný. Avšak nevýhodou je, že přírodní škrob nemůže být zpracován jako termoplastický materiál. Má omezený rozsah použití, kvůli jeho vysokým vodním absorpčním vlastnostem. Základním zdrojem škrobu jsou kukuřice, brambory, pšenice a rýže. Rychlost jeho biologického rozkladu je dána jeho vlastnostmi: velikostí částice (malé částice se v plastru lépe dispergují a jsou přístupnější mikroorganismům), teplotou zpracování a vlhkostí. Velmi důležitý je také obsah vody v použitém škrobu. Škrob jako aditivum je nejčastěji používán při výrobě polyolefinů, zejména LDPE [2, 14, 22, 27].



Obr. 7: Amylopektin a amylosa [36]

Aplikace škrobu do bioplastů je provedena buď ve formě plniva (může být zachována struktura škrobového zrna), nebo je škrob začleněn přímo do matrice kompozitu, kdy se jedná o tzv. termoplastický škrob [23].

Plniva v polymerních materiálech mají různou úlohu, ovlivňují elektrickou či tepelnou vodivost, pevnost, cenu, a navíc umožňují nebo zlepšují mikrobiální rozklad biologicky rozložitelného polymeru [23].

Výhodou jemnozrnného škrobu je, že menší zrna se v plastu lépe dispergují a jsou mnohem lépe přístupnější pro mikroorganismy. Z toho vyplývá, že škrobová zrna menší velikosti zlepšují biologickou rozložitelnost a tažné vlastnosti filmů. Jemné frakce pšeničného škrobu vytváří podstatně tenčí filmy než frakce kukuřičného škrobu [23].

Přírodní škrob v polymerech snižuje pevnost a odolnost vůči vodě, což jsou omezující faktory pro praktické použití. Esterifikace škrobu umožňuje zvýšit tepelnou odolnost, hydrofobicitu a krystalinitu těchto materiálů [23].

4 BIODEGRADACE POLYESTERŮ A KOPOLYESTERŮ V PROSTŘEDÍ

Publikace zde uvedeny jsou seřazeny podle roku, kdy experimenty probíhaly.

Ve studii [8] z roku 2001 se její autoři zabývali aktivními mikrobiálními kmeny, u kterých bylo možné provádět degradační experimenty na minerálním médiu v závislosti na čase. Autoři popsali rozpad filmů Ecoflexu o tloušťce 90 μm na agarových plotnách při 55 °C během 7 dnů. Bylo prokázáno, že rychlost degradace byla za těchto podmínek přibližně 20 krát vyšší než rychlost degradace v kompostu.

Test na biodegradaci probíhal po dobu 21 dnů při teplotě 55 °C. Na počátku byly identifikovány různé alifatické a aromatické oligomery, ale na konci těchto pokusů byly pozorovány pouze monomery kyseliny adipové, tereftalové a 1,4-butandiol. Výsledky ukazují, že meziprodukty nevykazují žádné toxické účinky, a to i v případě vyšší koncentrace. Míra biodegradace se výrazně snížila s rostoucím podílem cca 60 mol% kyseliny tereftalové. Na degradaci aromaticko-alifatických kopolyesterů se podílí právě skupina aktinomycet. Nejvíce účinným mikroorganismem byla shledána *Thermomonospora fusca* a extracelulární hydrolasa (TfH), jež štěpí polyestery během biologického rozkladu. TfH hydrolyzuje rozpuštěné estery, což je většinou úlohou esterasy, tudíž extracelulární hydrolasa je kombinací lipasy a esterasy [8].

V publikaci [15] byly provedeny testy na biodegradaci kopolyesteru Ecoflex za použití termofilní aktinomycety *Thermomonospora fusca*.

Ecoflex byl dodán ve formě granulí a pomlet s kapalným dusíkem na prášek. Velikost částic frakce byla 100 – 250 μm . Polymer byl složen z kyseliny tereftalové (22,2 mol%), kyseliny adipové (27,8 mol%) a 1,4-butandiolu (50 mol%). Ecoflex ve formě prášku byl následně přidán asepticky do kapalného minerálního média. Ty byly inokulovány suspenzí mycelií *T. fusca*. Inkubace probíhala při 55 °C, po 21 dnů. Po 4 dnech inkubace byla zaznamenána biodegradace [15].

Degradační produkty a meziprodukty byly sledovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem (GC-MS) a gelové permeační chromatografie (GPC). Pomocí plynové chromatografie nebylo detekováno významné množství rozpustných diolů a dvojsytných kyselin, ani aromatické a alifatické oligomery. Metodou GPC nebyly pozorovány žádné zbytky polymeru ani hromadění aromatických oligomerů. Více

než 99 % výchozího polymeru bylo depolymerizováno na monomery (tereftalát, adipát, 1,4-butandiol). Delší aromatické sekvence kopolyesteru nezůstávaly ve formě nerozpustných nebo rozpustných zbytků polymeru, ale byly enzymaticky rozštěpeny. Krátké rozpustné oligomerní meziproducty byly hydrolyzovány na monomery během 3. týdnů a byly snadno metabolizovány v přítomnosti mikroorganismů. Ukázalo se, že *T. fusca* snadno depolymerizuje Ecoflex, ale není schopna snadno metabolizovat vzniklé monomery a oligomery. Monomery jsou hlavními produkty polymerů a byly intenzivně zkoumány s ohledem na jejich toxikologické účinky. Z testů s *Daphnia*, *P. phosphoreum* vyplynulo, že nevykazují žádné kritické toxické chování [15].

Ve studii [11] byly použity tři biodegradabilní mulčovací filmy z Ecoflexu, Ecoflexu s plnivem a LDPE o různé tloušťce a barevnosti. Tloušťka biologicky rozložitelných filmů byla 25 μm , 35 μm pro bílý film a 35 μm pro černý film. Součástí testu byl i materiál LDPE ve formě mulčovacích filmů. Tyto filmy byly použity na pokrytí záhonů rajčat ve státě Michigan v měsíci květnu až září, kvůli teplotě vzduchu, půdy, půdní vlhkosti, relativní vlhkosti a slunečnímu záření. Každý týden byly pozorovány změny na filmech a každé dva týdny byly odebrány vzorky filmů a byly stanovovány jejich mechanické, optické, fyzikální a tepelné vlastnosti v závislosti na čase. Experiment probíhal ve vyzrálém zahradnickém kompostu při 58 °C s 50 – 60% vlhkostí. Jakmile rajčatová sklizeň byla dokončena, závlahové zařízení bylo odstraněno a všechny rostliny rajčat se zlikvidovaly. Potom byly tyto biodegradabilní mulčovací fólie zorány do půdy [11].

Bílé filmy byly více poškozeny než černé filmy. U bílých filmů se vytvořily praskliny během prvních dvou týdnů testování, zatímco u černých filmů bylo poškození mnohem pomalejší, projevilo se až kolem 8. týdne. Konvenční mulčovací filmy (LDPE) nevykazovaly žádné změny na povrchu filmů během zkušební doby. Ukázalo se, že došlo k poklesu pevnosti v tahu pro všechny biologicky rozložitelné filmy, zejména během prvních dvou týdnů pro bílé filmy. Naopak, žádné změny neproběhly u mulčovací fólie z LDPE. Všechny biologicky odbouratelné filmy byly křehčí po expozici. Černý biodegradabilní film měl schopnost potlačit růst plevelů. Byla měřena produkce oxidu uhličitého pomocí plynové chromatografie. Během 120 denní inkubace bylo dosaženo u všech testovaných biodegradabilních fólií více než 60 % mineralizace uhlíku a u filmu s plnivem (kukuřičný škrob) bylo dosaženo více než 70 % mineralizace [11].

Ve studii [10] probíhal aerobní biologický rozklad kopolyesteru Ecoflex s využitím mezofilních mikroorganismů (bakterií, hub a kvasinek). Ecoflex byl použit ve formě tenkých filmů a naočkován suspenzí půdních mikroorganismů. Inkubace probíhala při 30 °C po dobu 21 dní na Petriho miskách s minerálním agarem. Dále byl proveden pokus v biometrických lahvích s kopolyesterem Ecoflex ve formě granulí, i v tomto případě byly láhve naočkovány půdní suspenzí mikroorganismů. Inkubace probíhala při 22 °C po dobu 30 dní. Byly sledovány viditelné změny degradovaných filmů a zaznamenány jejich váhové úbytky. Jako nejlepším degradérem z 29 nalezených mikroorganismů byla bakterie *Bacillus subtilis*, která vykazovala zjevné známky degradace filmu a i největší úbytek hmotnosti filmu až 2 mg. Degradční meziprodukty byly sledovány pomocí GC/FID a GC-MS, kdy bylo v médiu po degradaci nalezeno menší množství tereftalové kyseliny a přítomnost adipové kyseliny. Vzorky, které vykazovaly známky degradace, byly dále testovány gelovou permeační chromatografií k zjištění molekulových hmotností zbytků degradace. Nebyly zde nalezeny žádné nízkomolekulární polymerní molekuly.

Výsledky pokusů prováděných s mezofilními bakteriemi ukazují, že Ecoflex může podléhat biodegradaci i za mírných podmínek, ale rychlost degradace je o mnoho pomalejší než u kompletní biodegradace pomocí *T. fusca*. Ze studie vyplývá, že vyšší teplota 55 °C ovlivňuje rychlost biodegradace. U kyseliny adipové a kyseliny tereftalové bylo prokázáno, že mají nízkou akutní toxicitu a jsou snadno biologicky rozložitelné [10].

Ve studii [13] byly použity mulčovací fólie z PLA, Ecoflexu a modifikované škrobu na polích mandarinek. Tyto směsi materiálů jsou komerčně dostupné, biologicky rozložitelné a používané. Vzhledem k rozdílům v biologické rozložitelnosti, jsou vlastnosti mulčovacích filmů postupně měněny. Změny v propustnosti vodních par měly pozitivní vliv na růst mandarinek. Testy na biodegradabilitu filmů byly provedeny v roce 2004 – 2005 na polích s mandarinkami. Byly použity fólie o rozměrech 4 x 4 m kolem stromu. V raném období, dešťová voda neprošla skrz mulčovací film, tím zůstala půda stále suchá. Po střední době dešťová voda prosakovala přes mulčovací fólie, protože ta byla částečně degradována, a tím se v půdě udržovala vlhkost. Teplota u mulčovací půdy je vyšší a drží se kolem teploty cca 40 °C. Archy vytváří tzv. „skleníkový efekt“ (viz Obr. 8). Fyzikální vlastnosti mulčovacích fólií před a po sklizni ukázaly, že pevnost v tahu klesá s časem, z čehož vyplývá, že filmy jsou biologicky rozložitelné. Degradace modifikovaného škrobu je rychlejší než u PLA a Ecoflexu. PLA a Ecoflex jsou biologicky odbouratelné, avšak tento proces na povrchu půdy je pomalý, tudíž fólie udrží svůj tvar po dobu i pěti měsíců.

Tyto výsledky ukázaly, že modifikovaný škrob je degradován téměř okamžitě. To znamená, že se úbytkem modifikovaného škrobu vytvořily póry ve filmu.

Použitím mulčovacích filmů se zvýšil růst mandarinek a také jejich kvalita. Bylo prokázáno, že degradace modifikovaného škrobu vyvolaná vlivem vlhkosti je vhodná pro růst mandarinek. Biologicky rozložitelné mulčovací filmy se použily s cílem snížit odpad po použití. Po skončení testů se filmy staly biologicky odbouratelnými a mohly být rozkládány na CO_2 a H_2O [13].



Obr. 8: Vlivy působící na kompostovací fólie během testování [13]

I další studie, studie německých autorů [17], se zabývala alifaticko-aromatickým kopolyesterem Ecoflex. Experimenty byly provedeny v půdních podmínkách s 29 kmeny bakterií, plísní a kvasinek produkující enzymy. Výsledky ukázaly, že po 21 dnech expozice, byl polymer štěpen některými mikroorganismy. Jelikož doba trvání těchto testů byla poměrně krátká, navíc byly testy provedeny v prostředí za mírných podmínek, dala se zde předpokládat pouze omezená možnost biodegradace polymeru. Z výsledků tedy vyplynulo, že u Ecoflexu byla pozorována pouze částečná degradace, mikroorganismy přednostně degradovaly alifatické složky a hydrolyzovaly esterové vazby [17].

V práci [18] probíhala biodegradace Ecoflexu ve vodném aerobním a anaerobním prostředí. Tento materiál by testován ve čtyřech různých formách, ve formě: fólií o tloušťce 100 μm a 300 μm ; prášku s velikostí částic 200 μm a tenkého povlaku na inertním povrchu. Ecoflex ve vodném anaerobním prostředí byl studován v přítomnosti smíšené mikrobiální kultury dodávané ve formě stravitelného aktivovaného kalu z městské čistírny odpadních vod. Byly použity testovací láhve o objemu 300 ml. Naplněné láhve byly uloženy do vodní lázně temperované na teplotu 37 ± 1 °C. Biologická degradace byla hodnocena pomocí produkce CO_2 a CH_4 . U všech vzorků byla pozorována asi 10 denní fáze zpoždění. Proces rozkladu za anaerobních podmínek byl velmi pomalý cca 2 % po dobu 120 dní, ani

vyšší měrný povrch neměl vliv na biodegradabilitu. Biodegradace v aerobním prostředí dosáhla 1,79 % po 55 dnech. Zvýšení specifického povrchu testovaných vzorků v aerobním prostředí ovlivnilo stupeň biodegradace. Polymer byl pomalu degradovatelný ve vodném aerobním i anaerobním prostředí.

Ve studii [19] byly testovány filmy Ecoflexu, vystavené účinkům záření, v prostředí kompostu. Do 500ml biometrických nádob bylo naváženo 100 mg polymeru, 5 g perlitu a 2,5 g kompostu. Láhve byly uzavřeny zátkami se septy a inkubovány při 58 °C. Biodegradační test probíhal po dobu cca 100 dnů. Neozářený vzorek Ecoflexu s nižším specifickým povrchem dosáhl cca 25 % mineralizace uhlíku a u neozářeného vzorku Ecoflexu avšak s vyšším specifickým povrchem bylo dosaženo 50 % mineralizace uhlíku. U ozářeného vzorku po dobu 25 hodin byla hodnota biodegradace nejvyšší cca 70 %.

Kopolyester s nižším podílem aromatické složky dosáhl vyššího procenta mineralizace během experimentálních podmínek, čímž se potvrdila vyšší rozložitelnost materiálu. Specifický povrch značně ovlivnil rychlost biodegradace [19].

5 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo uskutečnit experimenty se vzorky Ecoflexu a Ecoflexu se škrobovým plnivem a doplnit tak poznatky v oblasti biodegradability těchto vzorků v prostředí kompostu a zemědělských půd. Snahou bylo zjistit, zda přítomnost škrobového plniva ovlivní biodegradaci Ecoflexu.

Záměrem práce tedy bylo provést experimenty a vyhodnotit výsledky biodegradčních testů. Dále provést mikrobiologický rozbor testovaných půd a kompostu a vyhodnotit vliv půdního prostředí na povrch testovaných fólií pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). V případě časových možností sledovat biodegradaci kopolyesterů (Ecoflexu a Ecoflexu se škrobovým plnivem) v půdním prostředí a prostředí kompostu z hlediska změn mechanických vlastností.

PRAKTICKÁ ČÁST

6 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ, CHEMIKÁLIE, PLYNY, ROZTOKY

6.1 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy KERN 770, Německo
- Aseptický laminární box Telstar Bio II A, Španělsko
- Elektrická laboratorní pec LH09MT
- Elektrická sušárna UM 100, Memmert, Německo
- Elektromagnetická míchačka MM2, Laboratorní přístroje, Praha
- Chladnička Ardo, Česká republika
- Chladnička Zanussi, Česká republika
- Laboratorní autokláv LAM-3-20-MCS-J Sonoclav, Německo
- Laboratorní váhy Kern EW 1500-2M, Německo
- Mikrodávkočče Biohit, Finsko
- Plynotěsná injekční stříkačka Hamilton (objem 100 µl), USA
- Plynový chromatogram Agilent 7890, USA
- Posuvné měřítko 150 mm, Jiangsu S. Ltd
- Skenovací elektronový mikroskop VEGA LMU, Tescan s. r. o., Česká republika
- Termostat Memmert, Německo
- Trouba 524 MORA, Česká republika
- Třepačka Promax 1020, Německo
- Vysekávací matrice o délce 7 cm, Svit, Zlín
- Vysekávací stroj, Svit, Zlín
- Vzduchový motorek HP 6000 ATMAN, Silenta, Česká republika
- Běžně využívané laboratorní sklo a pomůcky

6.2 Chemikálie

CHCl_3	Chloroform (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)
$\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$	Tween 80 (Polysorbate 80, Alfa Acsar, Německo)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Chlorid vápenatý dihydrát (Penta, Chrudim, Česká republika)
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Dusičnan kobaltnatý hexahydrát (Penta, Chrudim, ČR)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	Síran měďnatý pentahydrát (Lachema a. s., Brno, ČR)

H_3BO_3	Kyselina boritá (Lachema, a. s., Brno, Česká republika)
KH_2PO_4	Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema a. s., Brno, ČR)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Síran hořečnatý heptahydrát (Penta, Chrudim, ČR)
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Síran manganatý monohydrát (Penta, Chrudim, ČR)
NH_4Cl	Chlorid amonný (Lachema a. s., Brno, Česká republika)
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Síran železnato-amonný hexahydrát (Lachema a. s., Brno, ČR)
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	Molybdenan amonný tetrahydrát (Lachema a. s., Brno, ČR)
NaCl	Chlorid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lachema a. s., Brno, ČR)
$\text{Na}_4(\text{P}_2\text{O}_7) \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	Difosforečnan sodný dekahydrát (Fluka Chemika, Švýcarsko)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Síran zinečnatý heptahydrát (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)

6.3 Plyny

He	Helium – nosný plyn o čistotě 4.6 (Linde Technoplyn a. s., Praha, Česká republika)
Stlačený vzduch	(Linde Technoplyn a. s., Praha, ČR)
Standardní plyn	CO_2 (0,8 %), CH_4 (4,0 %), N_2 (95,2 %); (Linde Technoplyn a. s., Praha, ČR)

6.4 Roztoky

6.4.1 Zásobní roztoky použity na přípravu minerálního média

Roztok A

Pro přípravu 100 ml bylo naváženo 0,9 g KH_2PO_4 a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok B

Pro přípravu 100 ml bylo naváženo 2,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok C

Pro přípravu 100 ml bylo naváženo 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok D

Pro přípravu 100 ml bylo naváženo 0,3 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok E

Pro přípravu 100 ml bylo naváženo 1 g $\text{Mg}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok F

Pro přípravu 100 ml bylo naváženo 5 g NaCl a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok G

Pro přípravu 100 ml bylo naváženo 3 g NH_4Cl a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

6.4.2 Roztok stopových prvků

Pro přípravu 1 000 ml roztoku bylo naváženo:

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

Všechny navážky byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky; ta byla doplněna destilovanou vodou na požadovaný objem a její obsah byl důkladně promíchán.

6.4.3 Minerální médium

Minerální médium je zdrojem biogenních, makrobiogenních a stopových prvků potřebných pro životní pochody mikroorganismů.

Pro přípravu 500 ml bylo použito:

Roztok A	10 ml
Roztok B	40 ml
Roztok C	5 ml
Roztok D	5 ml
Roztok E	5 ml
Roztok F	5 ml
Roztok G	5 ml
Roztok stopových prvků	1ml

Složky byly smíchány, doplněny destilovanou vodou na celkový objem 500 ml, a pak byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

6.4.4 Suspendační roztok (médium)

K převedení mikroorganismů ze vzorků půd a kompostu do roztoku se využívá suspendační médium.

Na přípravu 200 ml bylo použito:

Fyziologický roztok (NaCl)	100 ml
Tween 80	0,2 ml
Destilovaná voda (H ₂ O)	100 ml

Suspendační médium bylo připraveno smícháním potřebného množství fyziologického roztoku, Tween 80 a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem a následně bylo rozlito do 4 skleněných lahví po 50 ml. Sterilizace byla provedena v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

6.4.5 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok o koncentraci $8,5 \text{ g.l}^{-1}$ byl připraven navážením $0,85 \text{ g NaCl}$, rozpuštěním navážky v malém množství destilované vody a následným doplněním destilované vody na požadovaný objem 100 ml . Sterilizace proběhla v autoklávu při teplotě $121 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut . Výsledná koncentrace fyziologického roztoku byla $8,5 \text{ g.l}^{-1}$.

6.4.6 Chloroformový roztok Ecoflexu

Chloroformový roztok Ecoflexu o koncentraci $0,010 \text{ g.l}^{-1}$, byl připraven navážením $0,5 \text{ g}$ vzorku Ecoflexu nebo Ecoflexu s plnivem a rozpuštěn v cca 30 ml rozpouštědla (chloroformu) a po rozpuštění doplněn chloroformem na celkový objem 50 ml .

6.5 Tuhá živná média

6.5.1 Tryptone yeast extract agar (TYA agar)

Tryptone yeast extract agar patří mezi univerzální živná média. Na této živné půdě roste velký počet fyziologicky různorodých mikroorganismů (chemoorganotrofní bakterie, kvasinky, vláknité plísně).

Pro přípravu bylo naváženo $8,4 \text{ g}$ TYA agaru, který byl řádně rozmíchán ve 400 ml destilované vody (H_2O), poté byl vložen do autoklávu a sterilizován při $121 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut . Po sterilizaci se půda pomalými krouživými pohyby nechala ochladit cca na $50 \text{ }^\circ\text{C}$. V aseptickém boxu byl agar rozlit na Petriho misky a nechal se zatuhnout.

Složení TYA agaru [g.l^{-1}]:

Enzymatický hydrolyzát kaseinu	6,00 g
Kvasničný extrakt	3,00 g
Agar	12,00 g

6.5.2 Glycerol – dusičnanový agar (GD agar)

Na GD agaru rostou bakterie, aktinomycety i plísně. Mikroorganismy jsou schopné využívat dusičnany jako zdroj dusíku. Na tomto agaru byly v našem případě počítány pouze aktinomycety.

Na přípravu 300 ml bylo použito:

Základ	7,35 g
Destilovaná voda	300 ml
Glycerol	6,0 g

Základ:

NaCl	0,3 g
KNO ₃	0,75 g
CaCO ₃	0,03 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,03 g
K ₂ HPO ₄	0,24 g
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	stopy
Agar	6,0 g

Nejprve bylo naváženo 7,35 g základu, který byl smíchán s 300 ml destilované vody, a následně bylo přidáno 6 g glycerolu. Poté proběhla sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Po vyjmutí z autoklávu byl obsah láhve promíchán krouživým pohybem, po ochlazení na cca 50 °C byl agar rozlit na sterilní Petriho misky v laminárním boxu a nechal se zatuhnout.

6.5.3 Půdní agar s bengálskou červení a chloramfenikolem

Půdní agar s bengálskou červení a chloramfenikolem se používá se pro kultivaci půdních plísní a inhibuje růst bakterií.

Na přípravu 300 ml bylo použito:

Základ	9,0 g
Půdní extrakt	300 ml
Bengálská červeň 1 %	2,1 ml

Základ:

Glukosa	3,0 g
NaNO ₃	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
Chloramfenikol	0,018 g
Agar	5,4 g

Na přípravu 300 ml bylo naváženo 9,0 g základu, ten byl suspendován ve 300 ml půdního extraktu a nakonec bylo přidáno 2,1 ml roztoku bengálské červeně. Všechny složky byly smíchány v láhvi a sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Po vyjmutí z autoklávu byl obsah láhve promíchán krouživým pohybem a po ochlazení cca na 50 °C byl agar rozlit na sterilní Petriho misky a nechal se zatuhnout v laminárním boxu.

6.5.4 Minerální agar

Na přípravu 300 ml bylo použito:

KH ₂ PO ₄	0,3 g
NH ₄ Cl	0,33 g
Mg(SO ₄) * 7 H ₂ O	0,06 g
Fe(SO ₄) ₂ * 7 H ₂ O	0,003 g (stopy)
CaCl ₂	0,003 g (stopy)
Roztok stopových prvků	0,3 ml
Agar	6 g
Destilovaná voda	300 ml

Jednotlivé komponenty byly smíchány, doplněny destilovanou vodou na celkový objem 300 ml a sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Po vyjmutí z autoklávu byla láhev pomalými krouživými pohyby promíchána, po zchladnutí na cca 50 °C byl roztok rozlit na sterilní Petriho misky a nechal se zatuhnout.

7 METODIKA A PRACOVNÍ POSTUPY

7.1 Charakteristika půd a kompostu

Pro experimenty byl použit kompost a tři druhy zemědělských půd z lokality Iváň, Bratčice a Veverské Knínice, u kterých bylo stanoveno pH, sušina, spalitelný podíl a mikrobiální oživení. Půdy i kompost byly přesety přes síto o velikosti ok 2 mm do pytlů, uzavřeny a uchovány v chladné místnosti pro následná stanovení.

7.1.1 Půdní substrát

Vzorky zemědělské půdy pro dané experimenty byly získány od pana Ing. Jiřího Jandáka, CSc. z Mendelovy univerzity v Brně (MZLU). Poskytnul nám rovněž charakteristiky u všech půd jako je půdní druh, obsah částic, zrnitostní třída a organický podíl. Všechny informace jsou shrnuty v *Tab. II., III., IV.* U všech vzorků půd bylo stanoveno pH, sušina, spalitelný podíl a byl proveden mikrobiální rozbor (viz kap. 8.1, 8.2).

Tab. II.: Druhy půd z jednotlivých lokalit (informace získány od Ing. Jiřího Jandáka, CSc. MZLU Brno)

Lokalita odebraných půd	Horizont	Půdní druh
Iváň	Ah (humózní lesní)	Fluvizem modální na nevápni- tých aluviálních sedimentech
Bratčice	Ap (ornice)	Černozem modální na spraši
Veverské Knínice	Ap (ornice)	Hnědozem modální na spraši

Tab. III.: Zrnitostní charakteristika půd s obsahem částic (Ing. Jiří Jandák, CSc. MZLU Brno)

Lokalita	Obsah částic [%]			Zrnitostní třída
	2,00 - 0,05	0,05 - 0,002	< 0,002	
Iváň	17,68	57,55	24,77	Prachovitá hlína
Bratčice	20,24	53,48	26,28	Prachovitá hlína
Veverské Knínice	12,19	60,39	27,43	Prachovitá jílovitá hlína

Tab. IV.: Hodnoty organického podílu (Ing. Jiřího Jandák, CSc. MZLU Brno)

Lokalita odebraných půd	C _{OX} [%]	POH [%]
Iváň	2,50	4,30
Bratčice	1,77	3,05
Veverské Knínice	0,97	1,67

Legenda k Tab. IV.:

C_{OX} – obsah oxidovatelného uhlíku půdy v procentech

POH – obsah půdní organické hmoty v procentech

7.1.2 Substrát kompostu

Kompost byl použit již v diplomové práci Ing. Jaromíra Krumpolce v roce 2012 [38]. U kompostu byla rovněž stanovena sušina, spalitelný podíl, pH a byl proveden mikrobiologický rozbor.

7.1.3 Stanovení pH

Stanovení pH (ČSN ISO 10390) bylo provedeno v suspenzi půda ve vodě (pH-H₂O) a v roztoku chloridu draselného (pH-KCl) o koncentraci 1 mol.l⁻¹ (74,5 g KCl rozpuštěno v 1 000 ml destilované vody).

Do třech uzavíratelných lahví bylo naváženo 10 g použitých půd, do čtvrté láhve 10 g kompostu a následně bylo přidáno 50 ml demineralizované vody, stanovení pH-H₂O. Stejný postup byl proveden i u stanovení pH-KCl, akorát s přídatkem 50 ml roztoku chloridu draselného. Směs se pomocí třepacího zařízení nechala třepat po dobu 60 ± 10 minut. Po ustálení, nejméně po dobu 1 hodiny, bylo pomocí pH metru InoLab 730 změřeno pH.

7.1.4 Stanovení sušiny půd a kompostu

Do vysušených a předem zvážených misek byly s předností ± 0,0001 g naváženy na analytických vahách půdy a kompost. Sušení probíhalo v elektrické sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti (cca 4 hodiny). Po vysušení byly misky s půdou nebo kompostem vloženy do exsikátoru, a po vychladnutí na laboratorní teplotu byly zváženy. Stanovení bylo provedeno 3x vedle sebe. Dle rovnice /1/ byla vypočtena sušina půd a kompostu v procentech.

$$S_1 = \frac{m_{1MV P,K} - m_{1M}}{m_{1M P,K} - m_{1M}} \cdot 100$$

$$S_2 = \frac{m_{2MV P,K} - m_{2M}}{m_{2M P,K} - m_{2M}} \cdot 100$$

$$S_3 = \frac{m_{3MV P,K} - m_{3M}}{m_{3M P,K} - m_{3M}} \cdot 100$$

$$S_{\emptyset} = \frac{S_1 + S_2 + S_3}{3} \quad /1/$$

kde:

S_{\emptyset} průměrná hodnota sušiny půdy nebo kompostu; [%]

$S_{1,2,3}$ hodnoty sušin v jednotlivých stanoveních; [%]

$m_{1,2,3M}$ hmotnosti prázdných misek; [g]

$m_{1,2,3M P,K}$ hmotnosti misek s naváženou půdou nebo kompostem; [g]

$m_{1,2,3MV P,K}$ hmotnosti misek s naváženou vysušenou půdou nebo kompostem; [g]

7.1.5 Stanovení spalitelného podílu půd a kompostu

Půdy nebo kompost byly naváženy s přesností $\pm 0,0001$ g do předem vyžíhaných a zvažovaných porcelánových kelímků. Nejdříve byla u těchto vzorků stanovena sušina půd nebo kompostu, jejichž postup je uveden v kapitole 7.1.4, poté byly porcelánové kelímky s vysušenou půdou (kompostem) vloženy do pece a byly žíhány při teplotě 550 °C po dobu 2 hodin. Po vyžíhání byly kelímky s půdou nebo kompostem vloženy do exsikátoru, a po vychladnutí na laboratorní teplotu byly zvaženy. Stanovení bylo prováděno 3x vedle sebe. Dle rovnice /2/ byl vypočten spalitelný podíl půd a kompostu v procentech.

$$S_{1P} = \frac{m_{1MV P,K} - m_{1MS}}{m_{1M P,K} - m_{1M}} \cdot 100$$

$$S_{2P} = \frac{m_{2MV P,K} - m_{2MS}}{m_{2M P,K} - m_{2M}} \cdot 100$$

$$S_{3P} = \frac{m_{3MV P,K} - m_{3MS}}{m_{3M P,K} - m_{3M}} \cdot 100$$

$$S_{P\emptyset} = \frac{S_{1P} + S_{2P} + S_{3P}}{3} \quad /2/$$

kde:

$S_{p\emptyset}$	průměrná hodnota spalitelného podílu; [%]
$S_{1,2,3P}$	hodnoty spalitelného podílu v jednotlivých stanoveních; [%]
$m_{1,2,3M}$	hmotnosti prázdných misek; [g]
$m_{1,2,3MV P,K}$	hmotnosti misek s vysušenou půdou nebo kompostem; [g]
$m_{1,2,3MS P,K}$	hmotnosti misek se spálenou půdou nebo kompostem; [g]

7.2 Mikrobiální rozbor půd a kompostu

Před experimentem bylo důležité dodržovat zásady tzv. aseptické práce k zamezení kontaminace mikroorganismy. Při této práci byly použity laboratorní pomůcky (např. hokejka nebo klička), které byly sterilizovány plamenem. Dále se používaly roztoky, které se sterilizovaly v autoklávu. Snížením kontaminace z ovzduší se veškerá práce prováděla v laminárním boxu.

Mikrobiologický rozbor půd a kompostu byl zaměřen na stanovení hlavních skupin chemoorganotrofních bakterií (celkový počet mikroorganismů), termofilních bakterií, aktinomycet a plísní (půdních vláknitých mikroorganismů). Dále byl proveden pokus o záchyt degradérů na minerálním agaru. Rozbory byly provedeny kultivační metodou při 25 °C a 58 °C po dobu 3 a 7 dnů. Na Petriho misky byly rozlity připravené agary pro různé mikroorganismy (viz kap. 6.5.1, 6.5.2, 6.5.3), na které byly po zatuhnutí nadávkovány pomocí mikrodávkovače půdní suspenze mikroorganismů a suspenze mikroorganismů z kompostu. Suspenze mikroorganismů z kompostu byly dávkovány v objemu 100 μ l a byly rozetřeny sterilní hokejkou po celém povrchu agaru. Suspenze mikroorganismů byla získána extrakcí vzorků půd anebo kompostu do suspenzačního média (viz kap. 7.2.1).

Kultivace půdní suspenze mikroorganismů probíhala při 25 °C ve tmě po dobu 7 dní pro stanovení aktinomycet a plísní. U chemoorganotrofních bakterií kultivace probíhala 3 dny. Po stanovení lhůtě byly provedeny odečty, které jsou zaznamenány v kapitole 8.2.

Mikrobiální rozbor kompostu byl zaměřen na sledování počtů chemoorganotrofních bakterií, termofilních bakterií, aktinomycet (půdní mikroorganismy) a vláknitých plísní. Kultivace probíhala při 58 °C v termostatu po dobu 7 dní. U chemoorganotrofních bakterií probíhala kultivace po dobu 3 dnů. Vlákňité plísně by se v mikrobiologickém rozboru

kompostu vyskytovat neměly, kvůli vysoké teplotě. Odečty mikroorganismů jsou zaznamenány v kapitole 8.2.

7.2.1 Příprava půdní suspenze mikroorganismů a suspenze mikroorganismů kompostu (extrakce vzorků půd a kompostu do suspenzačního média)

Do sterilních suspenzačních roztoků (viz kap. 6.4.4) o objemu 50 ml bylo naváženo 5 g vzorku půd nebo kompostu, a tím se získalo ředění 10^{-1} . Aby se mikroorganismy a pevné částice do roztoků uvolnily, bylo třeba roztoky 15 minut třepat v ruce nebo je umístit na třepačku. Suspenze se nechaly odsedimentovat a následně byly ředěny desetinnou řadou do ependorfek $10^{-1} - 10^{-7}$ (viz kap. 7.2.2) a vyočkovány (100 μ l) na příslušná živná média.

7.2.2 Desetinné ředění

Do čistých sterilních ependorfek bylo nadávkováno 900 μ l sterilního fyziologického roztoku (viz kap. 6.4.5), k tomu bylo nadávkováno 100 μ l suspenze půdních mikroorganismů nebo suspenze mikroorganismů z kompostu (ředění 10^{-1}), tímto postupem se získalo již ředění 10^{-2} . Dále bylo opět nadávkováno 100 μ l z ependorfky o ředění 10^{-2} do další ependorfky s 900 μ l fyziologického roztoku, tak bylo získáno ředění 10^{-3} . Stejným způsobem bylo pokračováno až do ředění 10^{-7} .

7.2.3 Očkování živných půd i kompostu, ředění na živných půdách a inkubace

Na připravená tuhá živná média byl nadávkován objem 100 μ l z již připravených ependorfek o různém ředění (viz kap. 7.2.2), tím docházelo na Petriho miskách k dalšímu ředění. Inokulum bylo rozetřeno po celém povrchu agaru sterilní hokejkou v laminárním boxu. Pro každé ředění byly připraveny 2 paralelní misky.

Pro kultivaci různých ředění půdní suspenze mikroorganismů nebo suspenze mikroorganismů z kompostu bylo celkem potřeba 96 Petriho misek s živnou půdou.

Ředění na živných médiích

Pro stanovení chemoorganotrofních aerobních bakterií byl použit TYA agar. Toto živné médium bylo rozlito na Petriho misky a necháno zatuhnout. Poté byly misky zaočkovány 100 μ l půdní suspenze mikroorganismů a suspenzí mikroorganismů kompostu z ependorfek o ředění 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , paralelně, 2x vedle sebe. Na Petriho miskách,

tím vzniklo další ředění. Dále se TYA agar použil i pro stanovení termofilních bakterií o ředění 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} .

Pro stanovení počtu aktinomycet byl použit glycerol – dusičnanový agar. Živné médium bylo opět rozlito na Petriho misky a necháno zatuhnout. Poté byly misky zaočkovány 100 μ l suspenze mikroorganismů kompostu a půdní suspenzí mikroorganismů z již připravených ependorfek o ředění 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , paralelně. Opět, na Petriho miskách vzniklo další ředění.

Na půdním agaru s bengálskou červení a chloramfenikolem byly stanovovány půdní vláknité plísně. Tento agar byl rozlit na Petriho misky a nechal se zatuhnout. Poté byly misky zaočkovány 100 μ l půdní suspenze mikroorganismů a suspenzí mikroorganismů kompostu z ependorfek o ředění 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Na miskách s půdním agarem a suspenzí mikroorganismů kompostu nebyly zaznamenány vláknité plísně, jelikož by neměly růst za vyšších teplot, což bylo v našem případě potvrzeno.

Inkubace

Naočkované misky se suspenzí půdních mikroorganismů byly inkubovány při teplotě 25 °C bez přístupu světla a misky se suspenzí mikroorganismů z kompostu byly inkubovány při teplotě 58 °C ve tmě v termostatu. Petriho misky pro stanovení chemoorganotrofních bakterií u půd i kompostu byly inkubovány 3 dny, ostatní mikroorganismy 7 dnů.

7.2.4 Stanovení počtu mikroorganismů

Na živných půdách během inkubace vyrostly mikroorganismy ve formě kolonií. Byly vybrány nejvhodnější misky s ředěním pro vyhodnocení. Tyto kolonie byly na obou paralelních miskách sečteny a zprůměrovány. Výsledky jsou uvedeny jako počet jednotek tvořící kolonie na jeden gram sušiny vzorku, čili CFU/g sušiny vzorku (viz *Tab. X.*). Pro názornost výpočtu, paralelní Petriho misky o ředění 10^{-2} byly zprůměrovány na hodnotu např. 100 kolonií. Ředění 10^{-2} znamená, že je vzorek 100x naředěn. Objem suspenzí činil 100 μ l \rightarrow 0,1 ml \rightarrow 0,1 g inokula. Počty kolonií se vyjadřují na 1 g sušiny vzorku, tudíž na Petriho misce vznikne ředění 10^{-3} . Z toho vyplývá, že vzorek je naředěn 1000x. Po vynásobení počtu zjištěných kolonií a provedených ředění, byla skutečná hodnota 100 000 kolonií v 1 gramu vzorku. Dále se nesmí zapomenout na sušinu vzorku, která se u vzorků liší (např. sušina 60 %). Vztah bude vypadat následovně 100 000/0,60. Vyhodnocení

v tomto případě bylo 166 666,67 CFU/g sušiny vzorku, vyjádřením $1,67 \cdot 10^5$ CFU/g sušiny vzorku.

7.2.5 Záchyt degradačních mikroorganismů na minerálním agaru

7.2.5.1 Příprava tenkého filmu Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem

Minerální agar (viz kap. 6.5.4) byl rozlit na Petriho misky a nechal se zatuhnout. Poté bylo na agar nadávkováno 500 μ l chloroformového roztoku Ecoflexu nebo Ecoflexu s plnivem (viz kap. 6.4.6). Roztok po nadávkování byl sterilní hokejkou rozetřen po celé misce, aby se vytvořil tenký film, následně byl ponechán v laminárním boxu 24 hodin, aby došlo k odpaření rozpouštědla. Následující den byly misky zaočkovány půdní suspenzí mikroorganismů a suspenzí mikroorganismů kompostu s ředěním 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Po odsušení probíhala inkubace při 25 °C a 58 °C ve tmě. Pro každé ředění byly připraveny 2 paralelní misky. Pro kontrolu byl použit čistý minerální agar s půdní suspenzí a suspenzí kompostu se stejným ředěním jako u chloroformového roztoku Ecoflexu nebo Ecoflexu s plnivem. Pro tento test bylo použito 72 Petriho misek.

7.3 Charakteristika Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem

Ecoflex i Ecoflex s plnivem byly dodány firmou z Francie ICCF – Institut de Chimie de Clermont - Ferrand. Ecoflex byl zpracován vyfukováním. Ecoflex nebyl dodán ve stejných tloušťkách po celém filmu jako Ecoflex s plnivem. Na testy do bioreaktorů byl použit střed fólie, jejíž tloušťka odpovídala přibližně tloušťce Ecoflexu s plnivem. Na mechanické vlastnosti do půdních reaktorů byly použity filmy o čtyřech různých tloušťkách. Ecoflex s plnivem měl po celém povrchu stejnou tloušťku. Tloušťka fólií Ecoflexu s plnivem byla 40 μ m, bez plniva 70 μ m, 50 μ m, 70 μ m, 70 μ m. Celkový uhlík byl stanoven elementární analýzou, v Ecoflexu 62,54 %, celkový uhlík v Ecoflexu s plnivem 53,67 %.

Složení filmů Ecoflex s plnivem dodané firmou ICCF bylo následující:

- Glycerol: 4,35 %
- Škrob: 19,15 %
- Kyselina polymléčná (PLA): 5,70 %
- Ecoflex 70,80 %

7.4 Biodegradační experiment

Principem biodegradačního testu bylo sledování produkce oxidu uhličitého (CO₂) stanoveného metodou plynové chromatografie s teplotně vodivostní detekcí na přístroji GC Agilent 7890. Produkt CO₂ vznikal aerobní biodegradací vzorků Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem s plnivem v půdním prostředí a v prostředí kompostu, jelikož oba vzorky byly jediným zdrojem uhlíku a energií pro mikroorganismy.

7.4.1 Příprava biometrických lahví

V tomto testu byly použity skleněné lahve neboli bioreaktory s objemem 500 ml (plynná fáze 580 ml). Bioreaktory byly řádně umyty a sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Všechny lahve byly opatřeny víčkem s otvorem pro septum, které umožňovalo odběr plynné fáze. Víčka byla sterilizována pomocí UV záření v aseptickém laminárním boxu 30 minut.

Byly připraveny 3 paralelní lahve pro tři druhy půd a kompost bez vzorků (slepý pokus), se vzorky filmů Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem. Z toho vyplývá, že v tomto testu bylo použito 27 bioreaktorů pro půdní substrát a 9 biometrických lahví pro kompost. Složení jednotlivých lahví lze vidět v *Tab. V., VI., VII., VIII.*

Lahve byly následně řádně popsány: o jakou půdu se jedná, zda je v lahvi obsažen vzorek (Ecoflex nebo Ecoflex s plnivem) nebo, zda se jedná o slepý pokus, i z jaké lahve byly vzorky pro následné analýzy odebírány. Z lahví označených tečkou byly odebírány vzorky půd, kompostu, filmů Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem do ependorfeček pro následné další testování. Vzorky byly uchovány v chladu a bez přístupu světla.

Vzorky byly odebrány v následujících dnech:

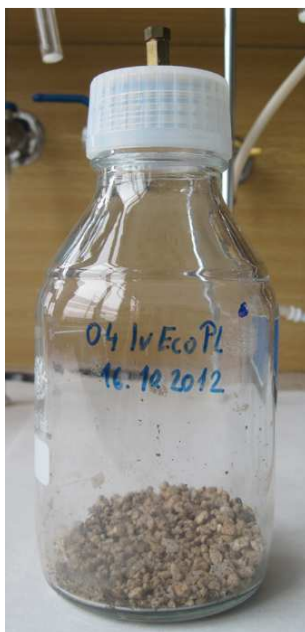
- 6. 11. 2012
- 13. 11. 2012
- 28. 11. 2012
- 6. 12. 2012
- 20. 12. 2012
- 3. 1. 2013
- 31. 1. 2013

Láhve s půdou byly uloženy do tmavé místnosti s teplotou 26 °C, láhve s kompostem byly uloženy do termostatu s teplotou 58 °C. V týdenních intervalech byl analyzován obsah vyprodukovaného CO₂.

7.4.2 Příprava obsahu bioreaktoru

- 5,00 ± 0,01 g navážka přirozeně vlhké půdy, kompostu (viz *Tab. V. – VIII.*)
o hmotnosti sušiny 5 g
- 5,00 ± 0,01 g perlitu (Agroperlit od firmy AGRO CS, a. s.)
- 0,10 ± 0,0001 g testovaného kopolyesteru Ecoflexu nebo Ecoflexu s plnivem
- 5 ml minerálního média (složení viz kap. 6.4.3)

Všechny složky výše uvedeny byly postupně naváženy a vloženy do biometrických láhví. Testované filmy kopolyesterů byly nastříhány na malé čtverečky o velikosti 5 x 5 mm o tloušťce 40 μm a 50μm. Pro názornost 75 čtverečků Ecoflexu vážilo 0,10 g a 150 čtverečků z Ecoflexu s plnivem vážilo 0,10 g. Půdy i kompost byly smíchány s perlitem v poměru 1:1. Perlit v biodegradačních testech sloužil ke zvýšení pórovitosti, zadržování vlhkosti a ke zlepšení provzdušňování půd. Perlit před použitím byl 3x promyt destilovanou vodou a při 105 °C vysušen v sušárně. Na *Obr. 9.* je zobrazena biometrická láhev s popisem a směsí.



Obr. 9: Biometrická láhev (bioreaktor)

Tab. V.: Obsah složek v biometrických lahvích s půdou z lokality Iváň

Označení lahví	Forma vzorku [-]	Navážka půdy [g]	Navážka perlitu ($5g \pm 0,01$) [g]	Navážka vzorku ($0,1g \pm 0,0001$) [g]
07 Iv	Bez vzorku	6,8	5,01	-
08 Iv		6,79	5,01	
09 Iv		6,79	5	
01 IvEco	Ecoflex	6,8	5,03	0,1005
02 IvEco		6,82	5,02	0,1012
03 IvEco		6,79	5,03	0,1009
04 IvEcoPl	Ecoflex s plnivem	6,77	5,02	0,0999
05 IvEcoPl		6,8	5	0,1006
06 IvEcoPl		6,8	5,02	0,1008

Tab. VI.: Obsah složek v biometrických lahvích s půdou z lokality Bratčice

Označení lahví	Forma vzorku [-]	Navážka půdy [g]	Navážka perlitu ($5g \pm 0,01$) [g]	Navážka vzorku ($0,1g \pm 0,0001$) [g]
16 Br	Bez vzorku	5,89	5,03	-
17 Br		5,88	5	
18 Br		5,89	5,02	
10 BrEco	Ecoflex	5,89	5	0,1
11 BrEco		5,89	5,01	0,1001
12 BrEco		5,89	5	0,1009
13 BrEcoPl	Ecoflex s plnivem	5,87	5,02	0,1002
14 BrEcoPl		5,9	5,03	0,1003
15 BrEcoPl		5,87	5,03	0,1003

Tab. VII.: Obsah složek v biometrických lahvích s půdou z lokality V. Knínice

Označení lahví	Forma vzorku [-]	Navážka půdy [g]	Navážka perlitu ($5g \pm 0,01$) [g]	Navážka vzorku ($0,1g \pm 0,0001$) [g]
25 Kn	Bez vzorku	6,07	5,04	-
26 Kn		6,06	5,02	
27 Kn		6,06	5,04	
19 KnEco	Ecoflex	6,08	5,01	0,1005
20 KnEco		6,08	5,01	0,1005
21 KnEco		6,08	5	0,1002
22 KnEcoPl	Ecoflex s plnivem	6,06	5,01	0,1001
23 KnEcoPl		6,06	5,01	0,1005
24 KnEcoPl		6,08	5,02	0,1002

Tab. VIII.: Obsah složek v biometrických lahvích s kompostem

Označení lahví	Forma vzorku [-]	Navážka půdy [g]	Navážka perlitu ($5g \pm 0,01$) [g]	Navážka vzorku ($0,1g \pm 0,0001$) [g]
34 Kom	Bez vzorku	5,01	5,02	-
35 Kom		5	5	
36 Kom		5	5,01	
28 KomEco	Ecoflex	5,02	5,01	0,1001
29 KomEco		5,02	5,03	0,1001
30 KomEco		5,05	5,03	0,1007
31 KomEcoPl	Ecoflex s plnivem	5	5,03	0,1005
32 KomEcoPl		5	5,03	0,1
33 KomEcoPl		5,02	5,03	0,1005

Legenda Tab. V. – VIII.:

07, 08, 09 Iv – půda z lokality Iváň bez vzorku (slepý pokus); 01, 02, 03 IvEco – půda z lokality Iváň se vzorkem fólie Ecoflexu; 04, 05, 06 IvEcoPl – půda z lokality Iváň se vzorkem fólie Ecoflexu s plnivem; 16, 17, 18 Br – půda z lokality Bratčice bez vzorku; 10, 11, 12 BrEco – půda z lokality Bratčice se vzorkem fólie Ecoflexu; 13, 14, 15 BrEcoPl – půda z lokality Bratčice se vzorkem Ecoflexu s plnivem; 22, 23, 24 Kn – půda z lokality Veverské Knínice bez vzorku; 19, 20, 21 KnEco – půda z lokality Veverské Knínice se vzorkem fólie Ecoflexu; 25, 26, 27 KnEcoPl – půda z lokality Veverské Knínice se vzorkem Ecoflexu s plnivem; 34, 35, 36 Kom – kompost bez vzorku; 28, 29, 30 KomEco – kompost se vzorkem fólie Ecoflexu; 31, 31, 32 KomEcoPl – kompost se vzorkem Ecoflexu s plnivem.

7.5 Analýza produkovaného CO₂ pomocí plynové chromatografie

Plynový chromatograf Agilent 7890 (viz Obr. 10) používán při tomto experimentu měl v termostatu umístěné 2 náplňové sériově zapojené skleněné kolony o délce 1,829 m. Na první koloně docházelo k separaci oxidu uhličitého (CO₂), použitím náplně Porapak Q s velikostí částic 80/100 MESH. Na druhé koloně, molekulové síto 5A s velikostí částic 60/80 MESH, docházelo k separaci kyslíku (O₂). K přepínání ventilů mezi kolonami docházelo pomocí tlakového přepínače napojeného na přívod dusíku popřípadě vzduchu.

Po nástřiku vzorku pomocí plynové injekční stříkačky Hamilton o objemu 100 μl do inletu plynového chromatografu byla spuštěna analýza. V čase 0,65 minut docházelo k přepnutí ventilu na Porapak Q, na kterém se dělil CO_2 . V čase 1,5 minut docházelo k přepnutí ventilu na druhou kolonu, na které se dělil O_2 . Jako nosný plyn sloužilo helium (He) čistoty 4.6. V *Tab. IX.* jsou uvedeny základní parametry pro zmiňovanou GC analýzu.

Tepelně vodivostní detektor (TCD) sloužil k detekci složek. Z nástřiku standardu byla odečtena plocha píku a metodou přímého srovnání pomocí stavové rovnice (viz rovnice /5/) se dopočítala produkce CO_2 ve vzorku. Standard byl měřen vždy po zapnutí plynového chromatografu a následně po každém nástřiku jiného druhu vzorku.

Metodou plynové chromatografie se hodnotilo množství vyprodukovaného oxidu uhličitého z bioreaktorů. Na základě této produkce došlo následně k vyhodnocení mineralizace uhlíku v daných vzorcích kopolyesterů, které jak již bylo řečeno, jsou jediným zdrojem uhlíku.

Tab. IX.: Podmínky měření CO_2 na přístroji GC Agilent 7890

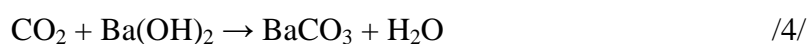
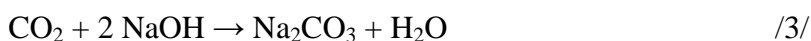
Parametr		Hodnota
Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Termostat	60
	Injektor	200
	TCD Detektor	250
Nosný plyn	Typ	Helium
	Průtok [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]	53
Přepínání ventilů	Čas [min]	0,65 (CO_2)
		1,5 (O_2)
	Plyn	Vzduch, N_2

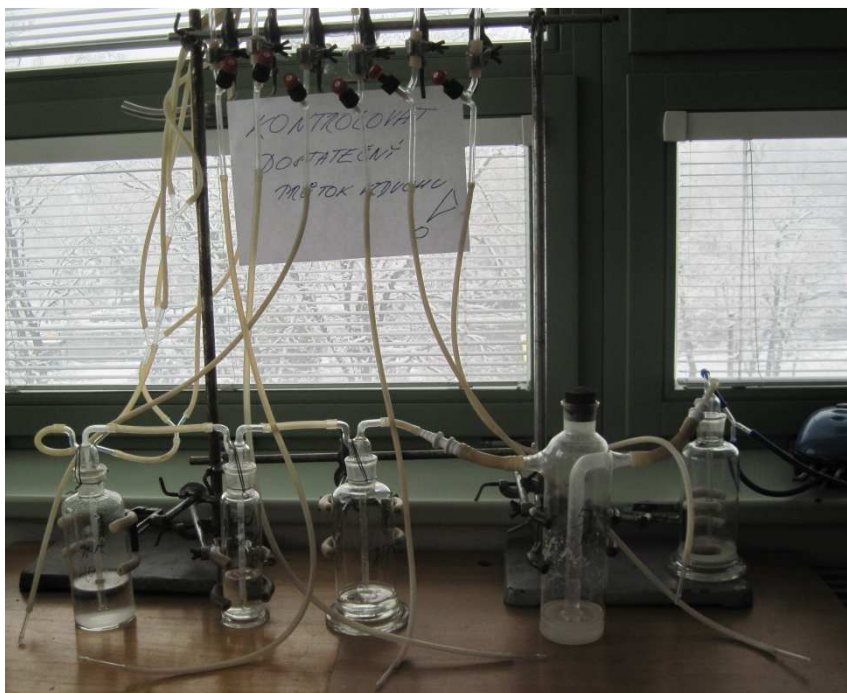


Obr. 10: Plynový chromatograf (vpravo) a vyhodnocovací zařízení (PC, vlevo) se záznamem analýzy (chromatogramem)

7.5.1 Provzdušňování bioreaktorů (biometrických láhví)

Biometrické láhve byly uzavřeny až k následné analýze. Po odebrání plynné fáze z bioreaktoru byl vzorek dávkován do inletu plynového chromatografu a analyzován. Teprve po úspěšné GC analýze byly láhve otevřeny a provzdušněny pomocí silikonových hadiček napojených na vzduchové čerpadlo po dobu 20 minut. Provzdušňovací zařízení (viz Obr. 11) bylo sestaveno z promývací lahve s roztokem 5 mol.l^{-1} NaOH, kde docházelo k odstranění atmosférického CO_2 (viz rov. /3/), z láhve s destilovanou vodou sloužící ke zvlhčování vzduchu a z promývací láhve s roztokem $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ Ba(OH)_2 , který sloužil jako pojistka při vyčerpání veškerého roztoku NaOH vznikem sraženiny BaCO_3 (viz rov. /4/). Prívod vzduchu musel být zajištěn pro aerobní mikroorganismy, které při své činnosti spotřebovávají kyslík a vytvářejí oxid uhličitý. Aby nedocházelo k vyčerpání roztoků, byly měněny 3x za měsíc.





Obr. 11: Aerační soustava (provzdušňovací zařízení)

7.5.2 Vyhodnocení biodegradačních testů

Před zahájením nástřiků vzorků byl nejdříve proveden nástřik standardu, který byl opakován vždy po nástřiku různého vzorku, aby nedocházelo k nesprávným výsledkům. Ve standardu Linde Technoplyn se analyzovala směs CO₂ (0,8 %), CH₄ (4,0 %), N₂ (95,2 %), žádný kyslík.

Láhve před odběrem byly protřepány a poté byla pomocí plynotěsné injekční stříkačky o objemu 100 µl přes septum odebrána plynné fáze. Láhve s obsahem kompostu byly použity k měření až po vychladnutí na laboratorní teplotu. Plyn byl následně nástřiknut do inletu plynového chromatografu. Doba analýzy byla 3,4 minut. Poté byla odečtena plocha peaku odpovídající množství CO₂ a následně byla vyhodnocena produkce CO₂. Ve vzorcích bylo možno analyzovat vedle CO₂ také O₂ a N₂. Protože experimenty byly prováděny za aerobních podmínek, nebyl ve vzorcích detekován žádný methan.

7.5.3 Zpracování naměřených dat

Naměřená data byla zpracována s použitím následujících vzorců z [37]:

➤ Denní produkce uhlíku ve formě CO₂

$$m_{(d)C} = \frac{M_C \cdot p}{R \cdot T} \cdot \frac{V_g}{1000} \cdot w(CO_2) \cdot \frac{V_{St.}}{S_{St.}} \cdot \frac{S_{Vz.}}{V_{Vz.}} \cdot 1000 \quad /5/$$

kde:

$m_{(d)C}$	množství vyprodukovaného uhlíku ve formě CO ₂ ; [mg]
M_C	atomární hmotnost uhlíku; $M_C = 12$ [g.mol ⁻¹]
p	tlak v okamžiku provzdušňování; [kPa]
R	molární plynová konstanta; $R = 8,314$ [J.K ⁻¹ .mol ⁻¹]
T	termodynamická teplota v okamžiku provzdušňování; [K]
V_g	plynný objem láhve; $V_g = 580$ [ml]
$w(CO_2)$	množství CO ₂ v kalibračním plynu; $w = 0,008$ [-]
$V_{St.}, V_{Vz.}$	dávkový objem plynné fáze standardu resp. vzorku do plynového chromatografu; $V_{St.}, V_{Vz.} = 100$ [μl]
$S_{St.}, S_{Vz.}$	plocha peaku u standardu resp. vzorku; [μV.s]

➤ Kumulativní produkce uhlíku ve formě CO₂

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

$$m_{(k)C_2} = m_{(k)C_1} + m_{(k)d_2} \quad /6/$$

kde:

$m_{(k)C_2}$	kumulativní produkce uhlíku z aktuálního měření; [mg]
$m_{(k)C_1}$	kumulativní produkce uhlíku z předchozího měření; [mg]
$m_{(k)d_2}$	denní produkce uhlíku z aktuálního měření; [mg]

➤ Substrátová produkce uhlíku ve formě CO₂

Jedná se o denní produkci uhlíku ze systému se vzorky, sníženou o produkci uhlíku ze slepých pokusů, tj. o produkci ze samotných substrátů (půd, kompostu).

$$n_{(s)C} = m_{(k)CVz} + m_{(k)CSl} \quad /7/$$

kde:

$n_{(s)C}$ substrátová produkce uhlíku ve formě CO₂; [mg]

$m_{(k)CVz}$ kumulativní produkce uhlíku z láhve se vzorkem; [mg]

$m_{(k)CSl}$ denní produkce uhlíku z láhve bez vzorku; [mg]

➤ Procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO₂

$$D_C = \frac{m_{(s)C}}{m_C \cdot TC_{1,2}} \cdot 100 \quad /8/$$

kde:

D_C procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO₂; [%]

$m_{(s)C}$ substrátová produkce uhlíku ve formě CO₂; [mg]

m_C hmotnost testovaného materiálu; [mg]

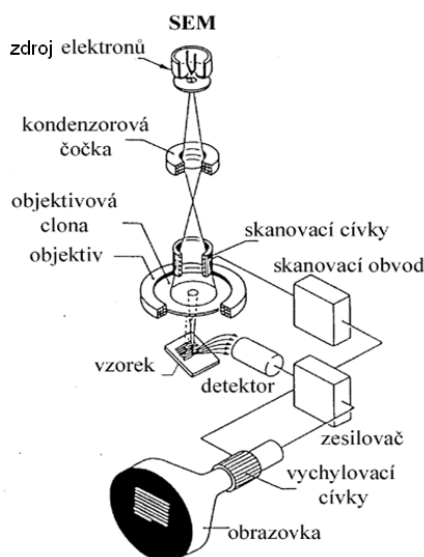
$TC_{1,2}$ obsah celkového uhlíku v Ecoflexu nebo Ecoflexu s plnivem;
 $TC_{1,2} = 0,6254; 0,5367 [-]$

7.6 Skenovací elektronová mikroskopie

Vzorky fólií Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem byly odebírány v průběhu biodegradčního testu do ependorfek a do doby vlastního zkoumání elektronovou mikroskopií byly uchovány v chladu.

Skenovací elektronový mikroskop (viz *Obr. 12*) je přístroj určený k pozorování povrchů nejrůznějších objektů.

U skenovací elektronové mikroskopie (SEM; VEGA – II, Tescan) při prohlížení různých preparátů se používá urychlovací napětí elektronu 5 kV. Před vlastním zobrazením byly vzorky pokoveny vrstvou zlata a platiny.



Obr. 12: Schéma elektronového mikroskopu [34]

7.7 Mechanické vlastnosti Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem

Pomocí půdních reaktorů (viz Obr. 14) byla sledována biodegradace kopolyesterů v přítomnosti mikroorganismů z kompostu a půd z hlediska změn mechanických vlastností. Skladba reaktoru byla navržena podle Rizzarelliho a kol. Tyto změny byly sledovány z hlediska vizuálních změn a změn tahových vlastností.

Půdní reaktor byl tvořen:

- 200 ± 0,01 g kompostu nebo půd (Iváň, Bratčice, Veverské Knínice)
- 200 ± 0,01 g perlitu
- 100 ml minerálního média
- 130 tělísek Ecoflexu nebo 130 tělísek Ecoflexu s plnivem

Pro každou půdu nebo kompost byly použity filmy Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem. Ke 200 g perlitu bylo nadávkováno 100 ml minerálního média (viz kap. 6.3.4). Perlit byl použit opět jako podpůrný materiál, který kypřil, vylehčoval a provzdušňoval půdu a pomáhal zadržovat vlhkost. Tato směs se nechala 24 hodin bobtnat, a poté byla přidána ke 200 g půdy. Bylo použito 200 g půdy z lokality Iváň, Bratčice, Veverské Knínice a 200 g kompostu pro Ecoflex a stejné množství půdy a kompostu pro Ecoflex s plnivem. Tělíška ve tvaru oboustranných lopatek (viz Obr. 13) byla vyseknuta podélně z kopolyesterů pomocí vysekávacího stroje a matrice o velikosti 7,5 x 1,2 x 0,2 cm a byla

uložena do půdního substrátu a substrátu kompostu. Tělíška filmů s plnivem měla tloušťku 40 μm , bez plniva 70 μm , 50 μm , 70 μm , 70 μm . Minerální médium bylo použito z toho důvodu, aby byla zachována vlhkost a podmínky shodné s těmi, které byly nastaveny u bioreaktorů v biodegradačním testu při sledování produkce CO_2 plynovou chromatografií.

Skladba půdního reaktoru:

Na dno reaktoru byly umístěny silikonové hadičky umožňující přívod vzduchu. Na ně byl položen rošt z inertního materiálu se sítkou, aby se zabránilo propadávání substrátu a nedošlo tím k ucpání hadiček. Půdní reaktor byl rozdělen na šest sektorů, jelikož byly testovány tři druhy půd a dva vzorky filmů kopolyesteru (*Obr. 14*). Rozměry půdního reaktoru byly 31,2 x 19,4 x 17 cm. Tudíž rozměry sektoru 1/6 byl 10,4 cm x 9,7 cm x 17 cm. Nejprve byly jednotlivé složky smíchány a poté byly nasypány do výšky jedné třetiny (200 g půdy, 200 g perlitu, 100 ml minerálního média). Na půdu bylo rozloženo 10 vyseknutých tělíšek kopolyesteru, na které byl opět dán substrát s perlitem a minerálním médiem. Tělíška z kopolyesteru byla umístěna postupně na půdu ve třech vrstvách, jelikož stanovování probíhalo v 0., 20., 50. a 70. den. Půdní reaktor byl překryt fólií z inertního materiálu, aby se zabránilo vypařování vody.

Pomocí vzduchovacího motorku bylo zajištěno provzdušňování půd. Půda byla provzdušňována ve dvouhodinových intervalech po patnácti minutách pomocí spínače. Horní vrstva substrátu byla pravidelně (cca 1x za týden) zvlhčována rozprašovačem s destilovanou vodou, čímž se zabránilo ztrátě vody odpařováním. Půdní testy probíhaly v místnosti při teplotě 26 °C, vlhkosti cca 50 % a ve tmě.

Pro kompost byly použity dvě biometrické láhve o objemu 1 000 ml (*Obr. 14*). Kompost s perlitem a minerálním médiem byl smíchán a nanášen ve vrstvách s kopolyesterem stejným způsobem, jež byl popsán u půdního reaktoru. Tělíška kopolyesteru byly odebrány v 0., 20., 50. a 70. den.

Láhve s kompostem byly vyjímány z termostatu 2 krát týdně za účelem provzdušnění. Nechaly se zchladnout cca 20 minut na laboratorní teplotu, aby nedocházelo ke zbytečnému vypařování vody z láhví; poté byly otevřeny na dobu cca 1 hodiny. Povrch kompostu v biometrických lahvích byl 1x týdně zvlhčován rozprašovačem s destilovanou vodou. Skleněné láhve byly uloženy v termostatu, ve tmě při teplotě 58 °C.



Obr. 13: Vyseknuté tělíčko kopolyesteru



Obr. 14: Reaktory s kompostem (vpravo) a půdní reaktor s vzduchovým motorkem a spínačem (vlevo)

7.7.1 Tahová zkouška (pevnost v tahu)

Mezi statické zkoušky patří pevnost v tahu, která je jednou ze základních a nejdůležitějších zkoušek. Jedná se o vyhodnocení mechanických vlastností. Stanovení tahových vlastností se provádí dle technické normy: ČSN EN ISO 527 – 3 (Část 3: Zkušební podmínky pro fólie a desky).

Ve zkušebním stroji (viz Obr. 15) se na zkušební těleso nechá působit pomalu se zvyšující síla až do přetržení materiálu. Zjišťuje se závislost mezi deformací zkušební tyče a působící silou F . Zkušební tyč o délce l_0 [mm] a průřezu S_0 [mm²] je namáhána ve směru své osy silou F [N]. Zatížená tyč z původního měřeného průřezu S_0 se změní na průřez S a původní měřená délka l_0 se prodlouží na hodnotu l . Pomocí tahového napětí potřebného k přetržení se vyjadřuje pevnost v tahu.

Tahové napětí [MPa] – působící na plochu S_0 je dáno vztahem:

$$\sigma = \frac{F}{S_0} \quad /9/$$

kde:

σ tahové napětí; [MPa]

F síla; [N]

S_0 povrch zkušebního tělesa; [mm²]

Poměrné prodloužení [-] – původní délka se bude měnit s prodloužením tělesa l_0 na l :

$$\varepsilon = \frac{l - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0} \quad /10/$$

Tažnost A [%] – poměrné prodloužení:

$$\varepsilon = \frac{l - l_0}{l_0} \cdot 100 \quad /11/$$

Hookeův zákon [MPa] – v oblasti malých deformací poměr mezi napětím a deformací u ideálně elastického materiálu:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad /12/$$

kde:

E Youngův modul (modul pružnosti v tahu); materiálová konstanta, čím je vyšší, tím je materiál pevnější.



Obr. 15: Trhací přístroj INSTRON [35]

Příprava zkušebních vzorků:

Tělíska byla vyseknuta ve tvaru oboustranných lopatek z fólií Ecoflexu o tloušťce 40 μm a Ecoflexu s plnivem o tloušťce 70, 50, 70, 70 μm . U těchto vzorků budou po skončení pokusu, tedy 70. den, stanoveny tahové vlastnosti pomocí trhacího přístroje zobrazeného na *Obr. 15*. Pokus nebyl ukončen před datem odevzdání diplomové práce, proto zde nejsou tato data zpracována.

VÝSLEDKY A DISKUSE

8 CHARAKTERISTIKA PŮD, KOMPOSTU A VZORKŮ

8.1 Stanovení pH, sušiny a spalitelného podílu půd a kompostu

Jako půdní substrát sloužily tři druhy zemědělských půd z lokality Iváň, Bratčice a Veverské Knínice. Charakteristika půd je uvedena v kapitole 7.1.1. Kompost byl použit takový, se kterým pracoval pan Ing. Krumpolec ve své diplomové práci v roce 2012 [38]. Oba použité substráty byly zdrojem mikroorganismů.

U půd i kompostu bylo stanoveno pH (viz *Tab. X.*), sušina byla stanovena 3x (kdyby se během experimentu hodnota změnila), spalitelný podíl (viz *Tab. X.*) a byl proveden mikrobiologický rozbor (viz *Tab. XI.*).

Pro potřebné výpočty navážek půd nebo kompostu do bioreaktorů byly používány hodnoty sušiny získané dne 9. 10. 2012 (viz *Tab. X.* – hodnoty jsou vyznačeny šedě).

Tab. X.: Stanovení pH, sušiny a spalitelného podílu u půd a kompostu

Charakteristika	Iváň	Bratčice	Veverské Knínice	Kompost
Sušina 22. 9. 2012 [%]	74,38	85,64	82,93	57,03
Sušina 9. 10. 2012 [%]	73,79	85,23	82,64	57,32
Sušina 13. 2. 2013 [%]	76,37	87,48	87,47	59,14
Spalitelný podíl [%]	25,51	20,68	23,64	42,46
pH _(H₂O) [-]	7,563	7,341	7,125	7,893
pH _(KCl) [-]	6,452	6,854	6,724	7,023

8.2 Stanovení počtu mikroorganismů v půdním prostředí a v prostředí kompostu

Mikrobiologický rozbor testovaných půd a kompostu byl proveden na počátku (0. den) biodegradačního testu. Stanovení počtu mikroorganismů v půdním prostředí a v prostředí kompostu je důležité, protože právě mikroorganismy hrají významnou roli při rozkladu organických látek. Při nízkém počtu půdních mikroorganismů by nemuselo docházet k biodegradaci. Například nejběžnějším zástupcem mikroorganismů v půdě jsou aktinomyceety, které snadno rozkládají celulosu a chitin [8, 10, 15].

Stanovení počtu mikroorganismů probíhalo na různých živných půdách, které byly rozlity na Petriho misky. Byl použit TYA agar, GD agar a půdní agar s bengálskou červení a chloramfenikolem. Abychom získali půdní suspenze mikroorganismů a suspenzi mikroorganismů z kompostu, bylo nutné provést extrakci vzorků půd a kompostu do suspenzačního roztoku (viz kap. 7.2.1). Následně bylo provedeno desetinné ředění půdní suspenze a suspenze kompostu do ependorfeek se sterilním roztokem (viz kap. 7.2.2). Poté byly misky se živnými agary zaočkovány půdní suspenzí mikroorganismů a suspenzí mikroorganismů z kompostu (viz kap. 7.2.3). Po naočkování a inkubaci byly vybrány nejvhodnější misky s ředěním pro počítání kolonií na živných médiích, následně byly kolonie přepočítány (viz kap. 7.2.4) na CFU/g sušiny.

Chemoorganotrofní bakterie vyskytující se v půdě i v kompostu byly stanoveny na TYA agaru (viz kap. 6.5.1). Inkubace půdní suspenze mikroorganismů probíhala 3 dny při teplotě 26 °C, suspenze mikroorganismů kompostu byla inkubována při teplotě 58 °C v termostatu. Veškeré získané výsledky jsou shrnuty v *Tab. XI*. Výsledky získané u tří typů zemědělských půd se od sebe navzájem příliš nelišily. V kompostu byl výskyt chemoorganotrofních bakterií vyšší; ve srovnání s půdou byl počet mikroorganismů (CFU/g sušiny) o jeden řád vyšší.

Glycerol – dusičnanový agar (viz kap. 6.5.2) byl použit ke kultivaci aktinomycet. Inkubace půdní suspenze probíhala 7 dní při teplotě 26 °C; suspenze kompostu též 7 dní při teplotě 58 °C. Na paralelních miskách o vhodném ředění byly počítány kolonie vypadající jako světlý kruh s černou tečkou uprostřed (buňky ve tvaru větvených vláken, tvořící často hustá mycelia s černou tečkou uprostřed). Podobně jako u stanovení celkového počtu chemoorganotrofních bakterií byly výsledky u jednotlivých vzorků půd mezi sebou srovnatelné, u kompostu se opět lišily o řád.

Na půdním agaru s bengálskou červení a chloramfenikolem (viz kap. 6.5.3) byly kultivovány půdní vláknité plísně. Ty zde rostly jako menší světlé chuchvalce, charakterizované tvorbou vláknitých hyf a vatovitých mycelií. Byly počítány pouze kolonie na miskách s půdní suspenzí inkubované při 26 °C. Při teplotě 58 °C by plísně růst neměly, což potvrdily i naše výsledky. U kompostu tedy nebyl potvrzen výskyt vláknitých plísni a u jednotlivých typů půd se výsledky lišily o 1 – 2 řády, viz *Tab. XI*.

Termofilní bakterie byly stanoveny jen u kompostu, kultivací suspenze mikroorganismů na TYA agaru po dobu 7 dní při teplotě 58 °C. Hodnoty zastoupení termofilních bakterií jsou téměř stejné jako u předchozích mikroorganismů.

Tab. XI.: Stanovení počtu celkových počtů mikroorganismů v půdě, kompostu

Druhy půd / kompostu	Celkový počet mikroorganismů [CFU/g sušiny]			
	Chemoorganotrofní aerobní bakterie	Aktinomycety	Půdní vláknité plísně	Termofilní bakterie
Iváň	$6,50 * 10^6$	$5,42 * 10^6$	$3,93 * 10^5$	-
Bratčice	$4,22 * 10^6$	$3,40 * 10^6$	$4,34 * 10^4$	-
Veverské Knínice	$3,87 * 10^6$	$2,90 * 10^6$	$4,96 * 10^3$	-
Kompost	$1,28 * 10^7$	$1,22 * 10^7$	-	$1,12 * 10^7$

8.3 Pokus o výskyt degradačních mikroorganismů na minerálním agaru

Mikrobiologický rozbor testovaných půd a kompostu byl proveden na počátku (0. den) biodegradačního testu. Postup tvorby tenkého filmu chloroformových roztoků na minerální agar je popsán v kapitole 7.2.5.1. Ředění 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} bylo provedeno na miskách paralelně. Pro kontrolu byl použit čistý minerální agar s půdní suspenzí mikroorganismů a suspenzí mikroorganismů z kompostu. Inkubace u suspenze půd probíhala při 25 °C po dobu 10 dní ve tmě, u suspenze kompostu probíhala inkubace při 58 °C po dobu 10 dní ve tmě v termostatu. Byly použity a popsány misky s ředěním 10^{-2} , protože zde byl největší výskyt mikroorganismů, s dalším ředěním se jejich počet snižoval.

Na Obr. 16 jsou zobrazeny tři misky o ředění 10^{-2} s půdní suspenzí z lokality Veverské Knínice. První miska zleva je čistý minerální agar, na prostřední misce je nanesen tenký povlak Ecoflexu a na misce zprava je nanesen tenký povlak Ecoflexu s plnivem. Minerální agary se vzorky byly mírně zakalené, oproti čistému minerálnímu agaru, což způsobilo nanesení tenkého filmu vzorku na agar. Na všech miskách vyrostly bakterie (aktinomycety). Aktinomycety se vyznačovaly světlým kruhem s černou tečkou uprostřed. Na čistém agaru nebyly kolonie bakterií, tak rozrostlé jako na minerálních agarech s tenkým povlakem vzorku. Na minerálním agaru s testovaným filmem s plnivem byl výskyt bakterií o něco vyšší. Některé aktinomycety měly narůžovělý vzhled s tečkou uprostřed. Misky se nelišily oproti čistému minerálnímu agaru, tudíž zde nebyli nalezeni žádní degradéři. Avšak vzhledem k výsledkům z plynové chromatografie, kde byl zaznamenán důkaz pří-

tomnosti degradérů pomocí produkce CO₂, můžeme říci, že degradéři se vyskytovaly v ředění < 10² CFU/g sušiny. Schopnost biodegradace i v takovém malém množství mikroorganismů se dá považovat za dobrý výsledek.



Obr. 16: Výskyt bakterií na minerálním médiu o ředění 10⁻² u půdy z lokality Veverské Knínice, nenaočkovaný min. agar, min. agar s Ecoflexem a min. agar Ecoflex s plnivem

Na *Obr. 17* jsou zobrazeny tři misky o ředění 10⁻² suspenzí mikroorganismů kompostu. První miska zleva je čistý minerální agar, na prostřední misce je nanesen tenký povlak Ecoflexu a na misce zprava je nanesen tenký povlak Ecoflexu s plnivem. Minerální agary se vzorky byly mírně zakalené, oproti čistému minerálnímu agaru, což způsobilo nanesení tenkého filmu vzorku na agar. Na všech miskách vyrostly bakterie. Jelikož inkubace misek se suspenzí z kompostu probíhala při 58 °C po dobu 10 dní misky s půdou a výskytem mikroorganismů se vizuálně lišily. Na minerálním agaru se suspenzí mikroorganismů z kompostu vyrostly termofilní sporuláty neboli sporulující bakterie. Nárůst těchto mikroorganismů se, na Petriho miskách, výrazně nelišil. Opět zde nebyli nalezeni žádní degradéři. Z toho vyplývá stejný závěr jako u půd, že degradéři se vyskytovaly v ředění < 10² CFU/g sušiny. Schopnost biodegradace i v takovém malém množství mikroorganismů lze považovat za dobrý výsledek.



Obr. 17: Porovnání výskytu bakterií na min. agaru s *Eco* (uprostřed) s *EcoPl* (vpravo) se suspenzí kompostu, ředění 10^{-2}

8.4 Vyhodnocení biologické rozložitelnosti

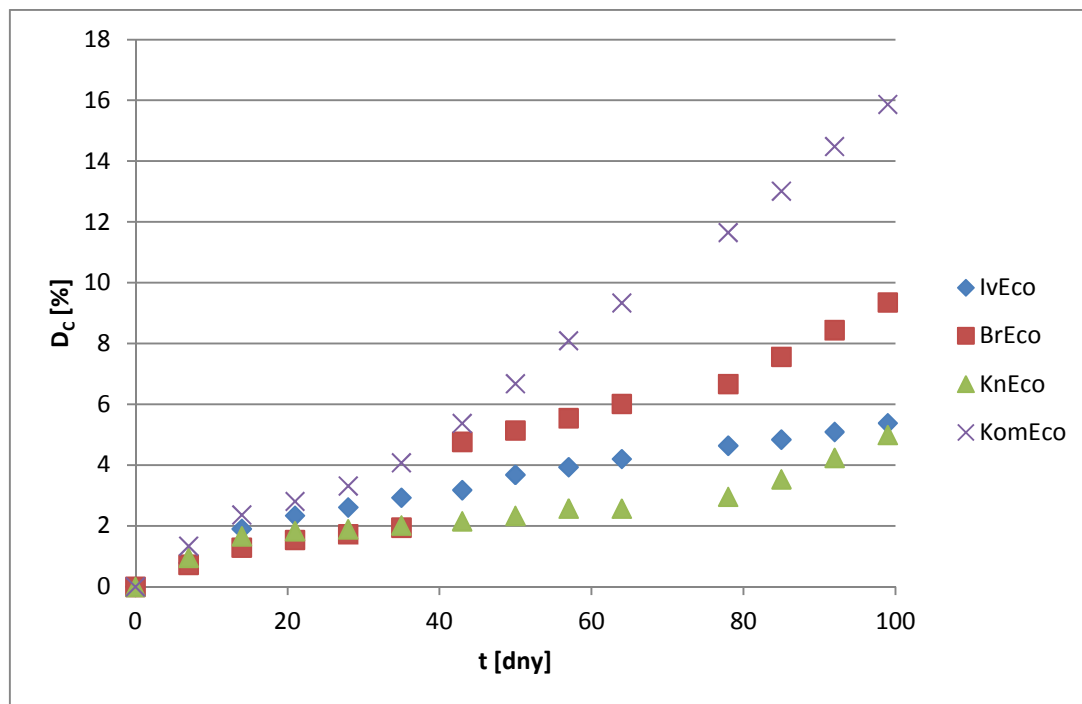
Pokus byl nasazen 16. 10. 2012 a probíhal po dobu 99 dní (14 týdnů). Poslední odběr byl proveden 24. 1. 2013. Plynná fáze z bioreaktorů byla odebírána v týdenních intervalech plynotěsnou injekční stříkačkou Hamilton o objemu 100 μ l. Plynná fáze byla analyzována plynovou chromatografií (GC/TCD), byla sledována produkce oxidu uhličitého (CO_2). Po odběru byly láhve provzdušňovány po dobu 20 minut (viz kap. 7.5.1).

Vzorce potřebné k výpočtu mineralizace uhlíku vzhledem k produkci oxidu uhličitého jsou uvedeny v kapitole 7.5.3. Podle těchto vzorců byla vypočítána mineralizace uhlíku v různém prostředí, pro vzorky testovaných filmů v nich obsažených. Během měření se zaznamenávala teplota a tlak v místnosti; byl opakovaně analyzován standardní plyn a ze záznamu jednotlivých analýz byly odečítány plochy peaků odpovídající CO_2 standardu i analyzovaných vzorků. Všechny potřebné parametry (viz *Tab. XII.*) a všechna potřebná vypočtená data byla zaznamenána do tabulek; tabulky s vypočtenými daty jsou uvedeny v přílohách (*Příloha I. – Příloha XII.*).

Tab. XII.: Hodnoty k výpočtům pro stanovení biodegradace (zpracování naměřených dat viz kap. 7.5.3)

Veličiny	Hodnoty
M_c [g.mol ⁻¹]	12
R [J.K ⁻¹ .mol ⁻¹]	8,314
V_g [ml]	580
$w_{(CO_2)}$ [-]	0,008
$V_{st.}$ [μl]	100
$V_{vz.}$ [μl]	100
TC_1 [-]	0,6254
TC_2 [-]	0,5367

Na Obr. 18 je zaznamenána závislost mineralizace uhlíku z hlediska produkce oxidu uhličitého na čase v půdním prostředí i v prostředí kompostu se vzorkem filmů Ecoflex. Biodegradační test probíhal po dobu 99 dní, do 40. dne probíhala tzv. lag fáze, během které docházelo k pozvolnějšímu růstu produkce oxidu uhličitého. Po 40 dnech se začala biodegradace zvyšovat. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u Ecoflexu bez plniva v prostředí kompostu, kdy biodegradace dosáhla téměř 16 %. U téhož vzorku, ale v prostředí půd byla degradace nižší. V půdě z lokality Bratčice (BrEco) byla kolem 9 %, v půdě z lokality Iváň (IvEco) a Veverské Knínice (KnEco) dosáhla biodegradace cca 5 %. Degradace materiálu Ecoflexu nebyla příliš velká, ale po 99 denní inkubaci byly na vzorcích uložených v bioreaktoru již okem patrné známky změn na povrchu filmů. Proto byl povrch vybraných vzorků dále zkoumán pomocí skenovací elektronové mikroskopie (viz kap. 8.5).



Obr. 18: Závislost mineralizace uhlíku na čase – vzorky Ecoflexu v prostředí půd a kompostu

Jelikož na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí bylo již provedeno mnoho experimentů na biologickou rozložitelnost polyesterů a kopolyesterů, bylo možné porovnat výsledky naší studie se závěry některých autorů těchto prací. Diplomová práce Ing. Holišové z roku 2010 [29] se zabývala sledováním biodegradability vzorků čistého Ecoflexu ve formě fólií o tloušťce 100 μm . Biodegradační pokus probíhal 76 dní v zemědělských půdách z lokalit Iváň, Bratčice a Veverské Knínice, tudíž v půdách ze stejných lokalit jako v našem experimentu. V této studii byla zaznamenána minimální degradace u všech filmů v půdách. V půdě z lokality Iváň byla degradace cca 2,12 %, Bratčice 0,32 % a Veverské Knínice 0,24 %. V této předkládané diplomové práci byla zaznamenána biodegradace Ecoflexu v půdách mnohem vyšší cca 6 %.

Podobnou problematikou se ve své diplomové práci zabývala také Ing. Konečná [39], opět byly provedeny testy na biodegradovatelnost Ecoflexu s tloušťkou fólií 100 μm v prostředí zemědělských půd z lokality Iváň, Bratčice a Veverské Knínice, ale i v prostředí kompostu. Opět zde byla zaznamenána minimální degradace, avšak vyšší jak v práci Ing. Holišové. Biologická rozložitelnost u vzorků filmů Ecoflexu inkubovaných v půdě z lokality Iváň byla 1,64 % za 103 dní, u zemědělské půdy z lokality Bratčice 3,05 % za 103 dní a u půdy

z lokality Veverské Knínice byla 1,79 % za 69 dnů. Dále byla zkoumána biodegradace vzorků filmů Ecoflexu v prostředí kompostu, kdy dosáhla cca 2 % za 69 dní. Porovnáním výsledků v prostředí půd byla zaznamenána i v této práci nižší degradace, oproti výsledkům získaným v naší práci. Z výsledků naší práce je patrné, že se biodegradace Ecoflexu v půdním prostředí pohybovala okolo 6 %, v prostředí kompostu pak byly získány výsledky okolo 16 % po 99 dnech.

Tyto rozdíly mohou být dány tím, že naše testované filmy měly tloušťku 40 μm , tedy byly tenčí o více než polovinu. Je známo, že tloušťka filmu výrazně ovlivňuje biodegradaci [11, 19, 38]. Také zastoupení mikroorganismů v půdě může mít velký význam z hlediska biodegradace. Výsledky mikrobiologického rozboru námi testovaných půd a kompostu však ukázaly, ve srovnání s předešlými pracemi, že počet mikroorganismů (CFU/g sušiny) se nijak významně nelišil.

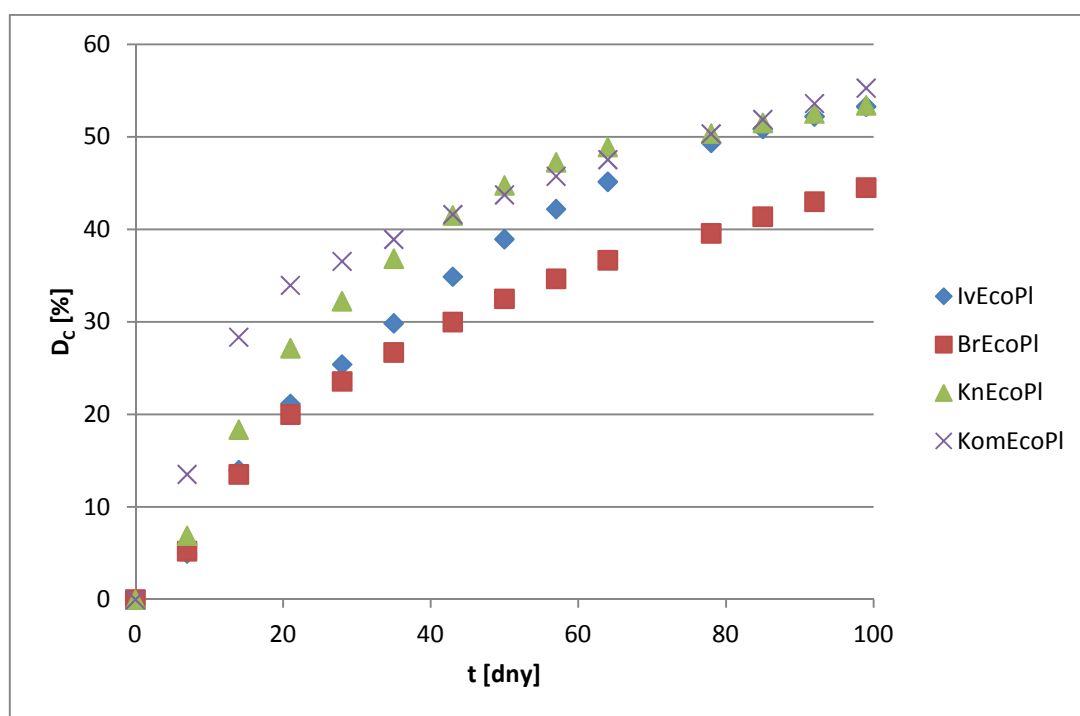
V diplomové práci Ing. Piše [40] byl opět testován vzorek Ecoflexu v prostředí kompostu. Vzorek Ecoflexu byl dodán ve formě granulí, ale byl zpracován do formy fólii o tloušťce 100 μm . V tomto případě byly navíc fóliové vzorky Ecoflexu vystaveny záření. Biodegradace dosáhla cca 27 % po 97 dnech a výsledky také ukázaly, že doba ozáření nemá vliv na následnou rychlost biodegradace v prostředí kompostu. Ve studii [19] se opět zabývali biodegradací Ecoflexu (tloušťka filmu 100 μm) v prostředí kompostu po dobu 100 dní. V tomto případě bylo sledováno, zda specifický povrch zkoumaného materiálu výrazně ovlivňuje rychlost biodegradace. Výsledky ukázaly, že vzorek Ecoflexu s nižším specifickým povrchem (kousky Ecoflexu o velikosti 2 mm) dosáhl cca 25% mineralizace uhlíku, zatímco u vzorku s vyšším specifickým povrchem (vzorek rozpuštěn v roztoku chloroformu) bylo dosaženo cca 50 % mineralizace uhlíku.

V obou zmiňovaných studiích byla zaznamenána biodegradace vyšší ve srovnání s našimi výsledky (cca 16 %), i když tloušťka testovaného materiálu byla větší než u námi testovaných vzorků. Tyto studie tedy potvrdily, že také specifický povrchu má významný vliv na biodegradaci testovaného materiálu v kompostu. Čím je specifický povrch větší, tím je zaznamenána u vzorků vyšší biologická rozložitelnost [29].

V průběhu našich experimentů nebyl testován pouze samotný Ecoflex, ale pozornost byla také věnována Ecoflexu se škrobovým plnivem. Na *Obr. 19* je zobrazena závislost mineralizace uhlíku na čase v půdním prostředí i v prostředí kompostu se vzorkem filmů Ecoflexu s plnivem. Již od počátku inkubace bioreaktorů se zvyšovala produkce oxidačního

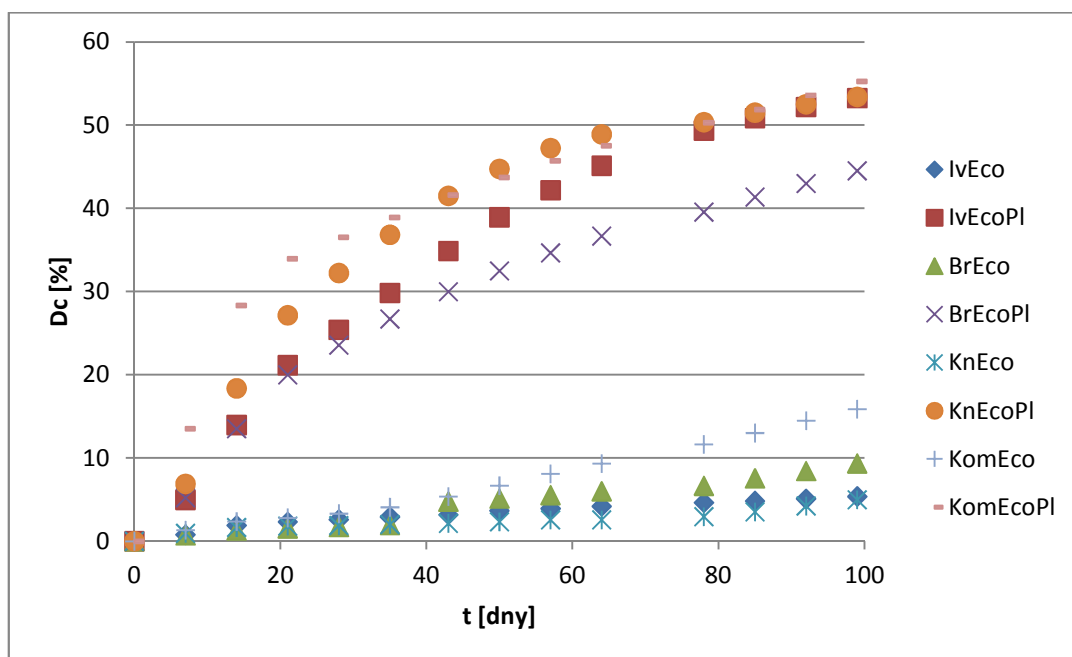
du uhličitého, nedocházelo k žádné lag fázi. Biodegradace probíhala postupně, nejvyšší nárůst byl patrný u vzorku Ecoflexu s plnivem v prostředí kompostu (KomEcoPI), kolem 55 %. Podobných hodnot (cca 53 %) bylo dosaženo u téhož vzorku v prostředí půd z lokalit Iváň a Veverské Knínice (IvEcoPI a KnEcoPI). Ecoflex s plnivem v prostředí půdy z oblasti Bratčice (BrEcoPI) vykazoval biodegradaci 44 %.

Bylo zajímavé, že v prostředí kompostu i půdy dosahovaly přibližně stejných hodnot mineralizace uhlíku, protože předpokladem bylo, že vyšší teploty napomáhají rozložitelnosti, a tudíž by hodnoty v prostředí kompostu měly být vyšší, v tomto experimentu tomu tak nebylo. Po odběrech vzorků během experimentu do ependorfeček pro případné další testování, bylo již okem patrné, že povrch vzorků byl narušen. U vzorků testovaných v půdě nebyly změny tak viditelné jako u vzorků testovaných v kompostu, kde byly filmy téměř úplně rozloženy. Tyto výsledky následně potvrdila i skenovací elektronová mikroskopie (viz 8.5).



Obr. 19: Závislost mineralizace uhlíku na čase – vzorky Ecoflexu se škrobovým plnivem v prostředí půd a kompostu

Na *Obr. 20* jsou porovnány výsledky získané pro vzorky Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem. Již na první pohled je zřejmé, že Ecoflex s plnivem je mnohem lépe degradovatelný, jak čistý Ecoflex, více jak o 40 %. Z toho vyplývá, že mikroorganismy pravděpodobně nejprve začaly spotřebovávat škrobové plnivo a poté pokračovaly a zpracovávaly Ecoflex, a tím se stále zvyšovala produkce oxidu uhličitého. Z výsledků vyplývá, že plnivo (obsah škrobu 19,15 %) použito v tomto testu výrazně ovlivňuje biologickou rozložitelnost, tím se potvrdil i náš předpoklad.



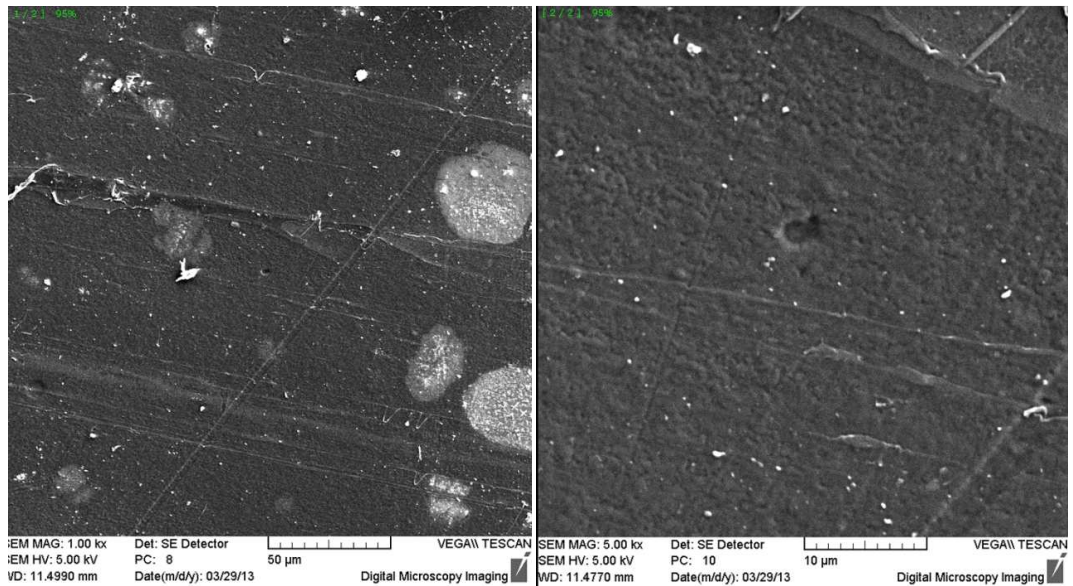
Obr. 20: Porovnání biodegradace vzorků Ecoflexu a Ecoflexu se škrobovým plnivem

8.5 Sledování povrchových změn u vzorků Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM)

Vzorky testovaných materiálů určených pro elektronovou mikroskopii byly odebrány z prostředí půdy z lokality Iváň. Vzorky Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem byly odebrány v nulový den, 28. den (13. 11. 2012) a 78. den (3. 1. 2013) a byly uchovány v chladu.

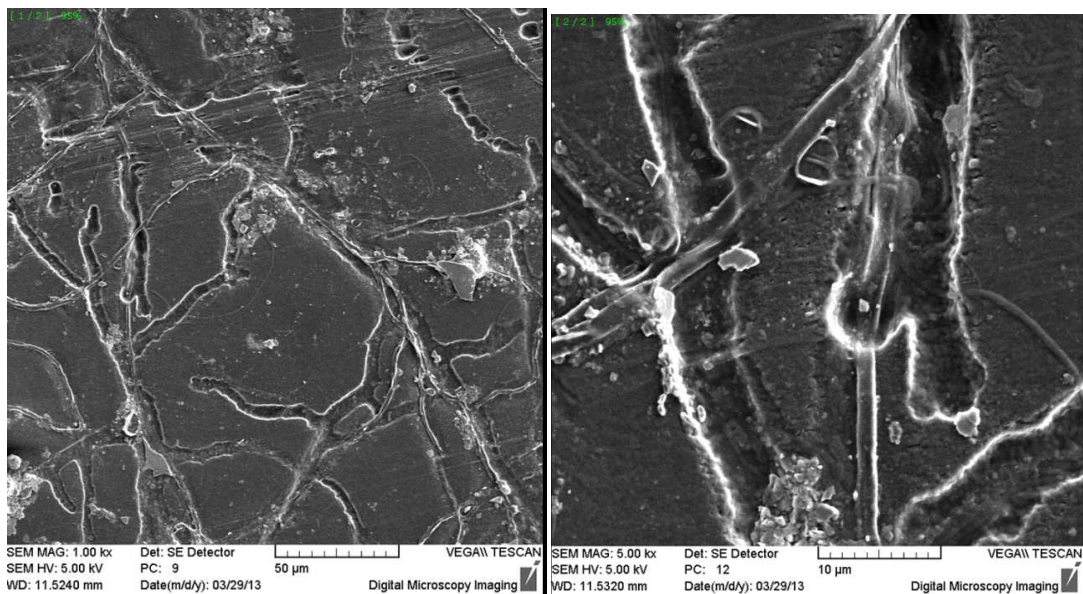
Na „terčíky“ byly naneseny kousky vzorků filmů a následně musely být připraveny pro skenovací elektronovou mikroskopii. Vzorky byly pokovovány.

Na *Obr. 21* je zobrazen povrch vzorku Ecoflexu v nulový den. Na povrchu nejsou žádné známky degradace, protože ještě nebyl vystaven biodegradačním podmínkám. Povrch je hladký bez poškození. Obrázek zleva je zvětšen 1 000x, obrázek zprava je zvětšen 5 000x.



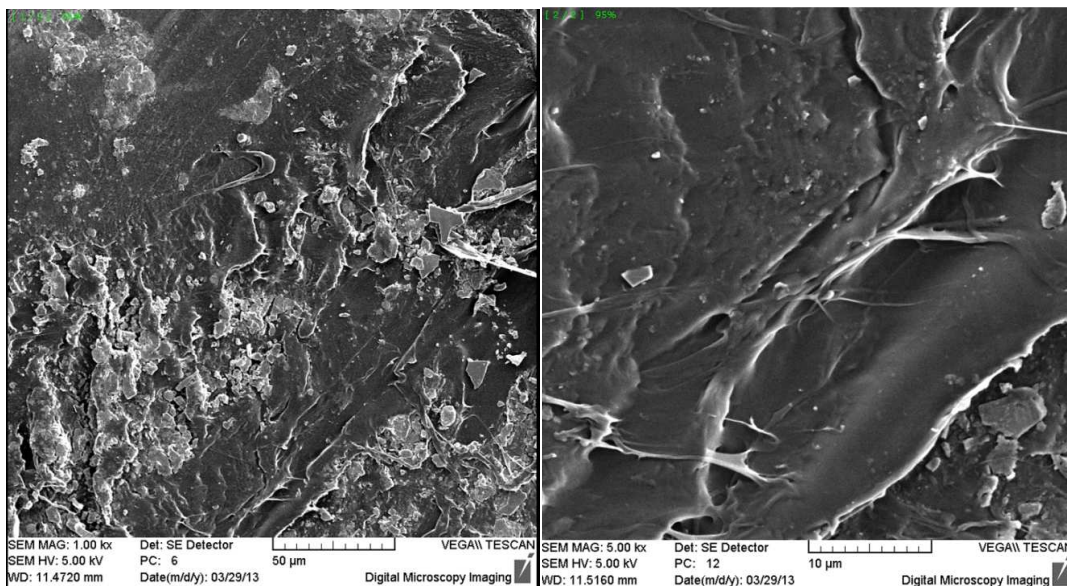
Obr. 21: Snímek povrchu fólie Ecoflexu odebrané z bioreaktoru (půda z lokality Iváň) v 0. den; zvětšení 1 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo)

Na *Obr. 22* jsou zobrazeny povrchové změny filmu Ecoflex po jeho 28 denní inkubaci v půdě z lokality Iváň. Na povrchu filmu už je viditelná změna, na povrchu vzorků začaly vznikat praskliny. Na *Obr. 22* (vlevo, zvětšení 1 000x) jsou patrné trhliny, které je možno pozorovat v detailu při větším zvětšení (*Obr. 22* vpravo, zvětšení 5 000x).



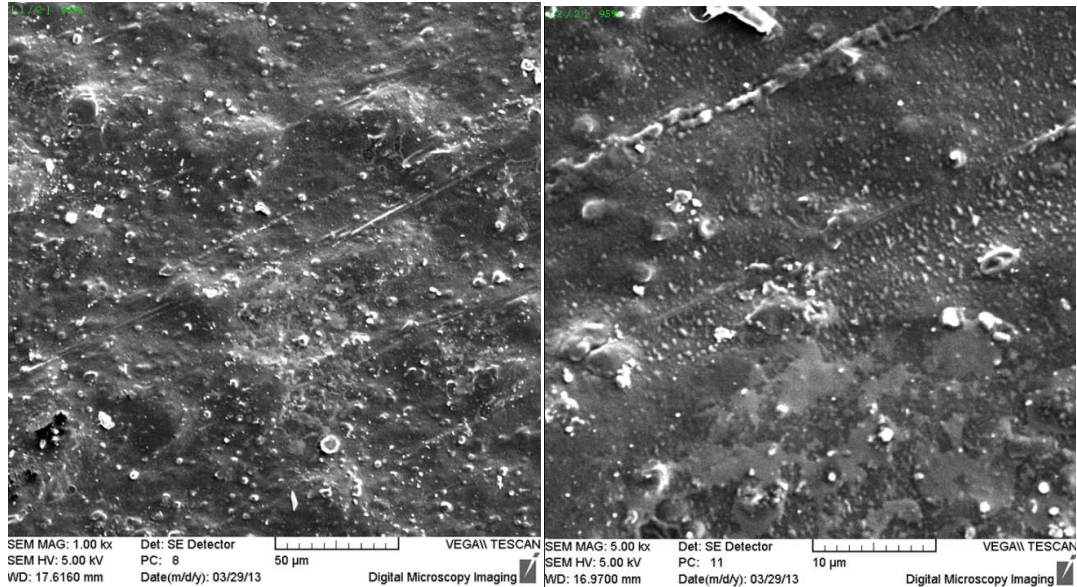
Obr. 22: Snímek povrchu fólie Ecoflexu odebrané z bioreaktoru (půda z lokality Iváň) v 28. den; zvětšení 1 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo)

Na *Obr. 23* je zobrazen povrch filmu v 78. den jeho biodegradčního pokusu. Na tomto filmu jsou viditelné mnohem větší známky změn na povrchu, než u předešlého filmu. Vzorke filmů byly více poškozeny. Z toho vyplývá, že i po vizuální stránce na filmech dochází k částečné biodegradaci. Snímky byly opět zvětšeny 1 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo). Čím je testovaný film vystaven biodegradčním podmínkám déle, tím jsou na filmu změny zjevnější.



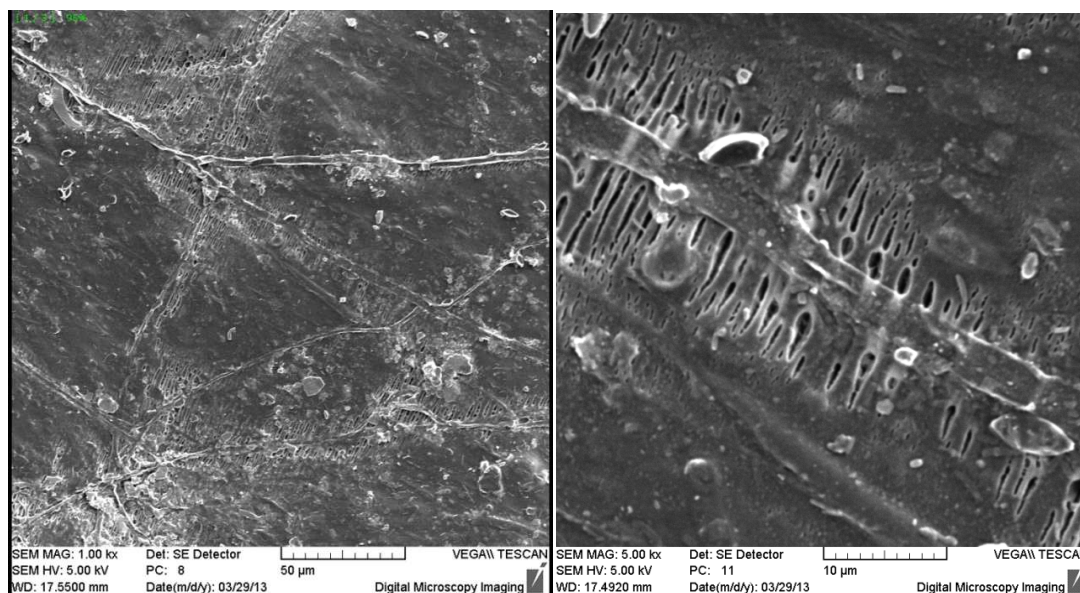
Obr. 23: Snímek povrchu fólie Ecoflexu odebrané z bioreaktoru (půda z lokality Iváň) v 78. den; zvětšení 1 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo)

Na *Obr. 24* je zobrazen povrch filmu Ecoflexu se škrobovým plnivem. Na filmech je patrné, že nejsou ještě nijak poškozeny, protože zde nedocházelo k mikrobiologickému napadení. Povrch je mírně zdrsňen, což způsobuje zřejmě obsah zrn škrobu.



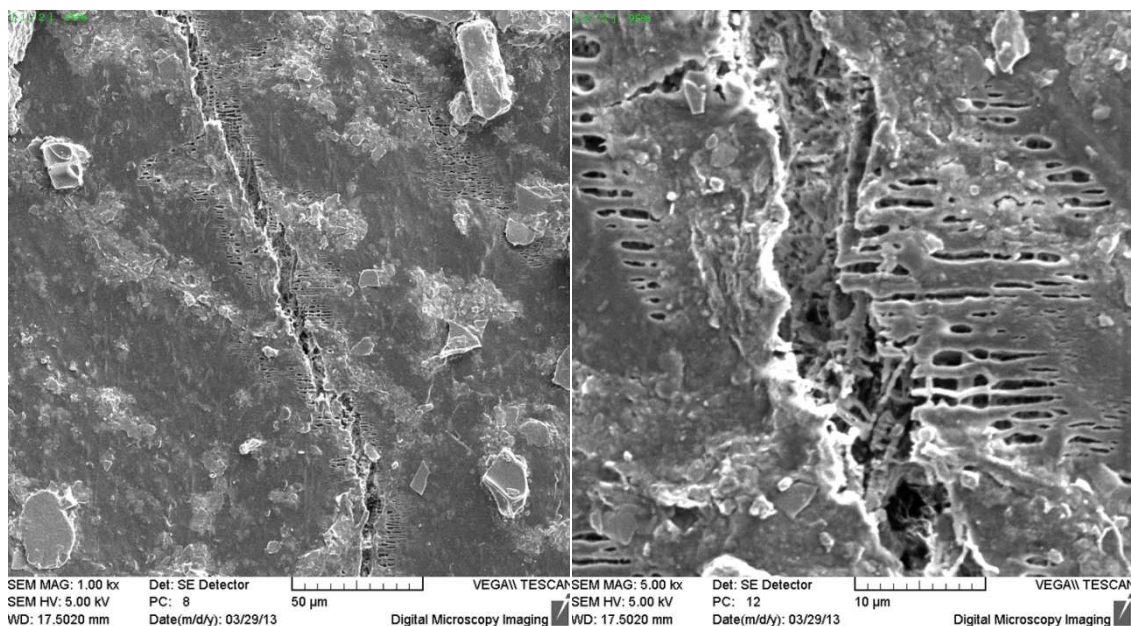
Obr. 24: Snímek povrchu fólie Ecoflexu se škrobovým plnivem odebraný z bioreaktoru (půda z lokality Iváň) v 0. den; zvětšení 1 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo)

Na *Obr. 25* je zobrazen povrch filmu Ecoflexu s plnivem odebraný z půdy v 28. den z půdy z lokality Iváň. Na snímku jsou zaznamenány změny na povrchu filmu. Při zvětšení 1 000x není ještě zcela patrné, že došlo k nějakému mikrobiálnímu napadení a biodegradaci. Pokud byl ale tentýž snímek zvětšen 5 000x, jsou již na povrchu filmu jasně patrné změny (trhliny), které vypovídají o částečné biodegradaci vzorku.



Obr. 25: Snímek povrchu fólie Ecoflexu s plnivem odebraný z bioreaktoru (půda z lokality Iváň) v 28. den; zvětšení 1 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo)

Na *Obr. 26* je snímek povrchu filmu Ecoflexu s plnivem po 78. denní inkubaci při zvětšení 1 000x. Na povrchu filmu je možno pozorovat trhlinu, která se více rozšířila než u filmu odebraného z 28. dne. Při zvětšení 5 000x je možné pozorovat daleko viditelnější změny. Trhlina je viditelně hlubší a rozšiřuje se do stran. Na tomto povrchu je tedy zjevné, že mikroorganismy rozkládají film Ecoflexu s plnivem, kdy po jejich napadení vznikají ve filmu „póry“, které jsou více znatelné než změny u filmu bez plniva. I tady je zřejmé, že čím déle jsou filmy vystaveny půdním podmínkám, tím jsou změny na povrchu mnohem viditelnější. Předpokladem bylo, že mikroorganismy budou nejprve zpracovávat škrob, na povrchu budou vznikat póry (tím se filmy stanou křehčí), a poté začnou mikroorganismy zpracovávat i samotný Ecoflex. Tento předpoklad se tedy potvrdil.



Obr. 26: Snímek povrchu fólie Ecoflexu se škrobovým plnivem odebraný z bioreaktoru (půda z lokality Iváň) v 78. den; zvětšení 1 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo)

Z výsledků skenovací elektronové mikroskopie je zřejmé, že během inkubace testovaných materiálů (Ecoflexu a Ecoflexu se škrobovým plnivem) v prostředí půdy se rozložitelnost filmů zvyšovala. Na povrchu začaly vznikat prasklinky, poté i trhliny, které se rozšiřovaly, což zapříčiňovala přítomnost mikroorganismů. Nejvíce patrné změny jsou viditelné na povrchu vzorku Ecoflexu se škrobovým plnivem v 78. dnu biodegradčního pokusu (viz *Obr. 26*, zvětšení 5 000x). Byly zaznamenány i změny na povrchu vzorku Ecoflexu, nicméně při porovnání těchto výsledků lze jasně konstatovat, že Ecoflex s plnivem je biodegradován daleko více.

8.6 Sledování vizuálních změn na povrchu filmů po odebrání testovaných vzorků z půdních reaktorů a z reaktorů s kompostem

Vzorky Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem byly uloženy do půdních reaktorů a do reaktorů s kompostem (viz kap. 7.7, *Obr. 14*). Tělíška ve tvaru oboustranných lopatek, o tloušťce 40, 70 a 50 µm (*Obr. 13*) byly odebírány v 0., 20., 50. a 70. den. Jelikož odběr vzorků v 70. den bude probíhat až po odevzdání diplomové práce, budou mechanické vlastnosti stanoveny a dále popsány v jiné práci.

Tělíska Ecoflexu i Ecoflexu se škrobovým plnivem hodnocené v nultý den nevykazovaly na povrchu filmu žádné změny, jelikož zde neprobíhala žádná biodegradace (viz *Obr. 27*).

Žádné změny nebyly zaznamenány ani na povrchu filmů Ecoflexu, jež byly odebrány ve 20. den z půdních reaktorů nebo reaktorů s kompostem. U filmů Ecoflexu se škrobovým plnivem, které byly podrobeny kompostovacím i půdním podmínkám byly již 20. den zaznamenány barevné změny na povrchu filmů. Vytvořily se světle žluté skvrnky, filmy se staly křehčími, nicméně okem nebyly ještě pozorovány na filmu žádné prasklinky (viz *Obr. 27*).

Po odebrání vzorků Ecoflexu bez plniva z prostředí zemědělských půd Iváň, Bratčice a Veverské Knínice nebyly ani v 50. dnu testování pozorovány žádné změny na povrchu filmů (držely svůj tvar, barva zůstala transparentní). U tělísek Ecoflexu bez plniva, které byly vystaveny kompostovacím podmínkám (viz *Obr. 27*), byly zaznamenány mírné změny na povrchu filmu. Na filmu se vytvořily barevné změny (žluté skvrny téměř po celém povrchu filmu), avšak i nadále zůstal pevný. Odběry tělísek proběhly v 50. den i u Ecoflexu se škrobovým plnivem z prostředí zemědělských půd. Byly zde zaznamenány velké změny na povrchu filmů. Tělíska se během odběru rozpadala (neudržela svůj tvar). Z reaktoru byly již vyjímány jen kousky tělísek; staly se mnohem křehčími ve srovnání s tělísky odebranými 20. den. Na povrchu tělísek byly viditelné trhlinky. Po 50 dnech se změnila i barva vzorků, již neměly lehce nažloutlou barvu, ale žluto-hnědou barvu. U tělísek Ecoflexu s plnivem inkubovaných v prostředí kompostu byl povrch taktéž značně poškozen, transparentní fólie se staly neprůhledné (tmavě žluto-hnědé). V tomto případě byly změny daleko více patrné než u stejných tělísek inkubovaných v půdním prostředí. Tělíska se staly velmi křehkými a na povrchu bylo možno pozorovat větší trhliny (praskliny), (viz *Obr. 27*).



Obr. 27: Tělíska Ecoflexu (vlevo) a Ecoflexu se škrobovým plnivem (vpravo) vyjmuty v 0. den (horní tělíska), 20. den (prostřední tělíska), 50. den (spodní tělíska) z reaktorů s kompostem

Na Obr. 27 jsou zobrazena tělíska vzorků Ecoflexu (vlevo) a Ecoflexu se škrobovým plnivem (vpravo). Horní tělíska u obou obrázků jsou odebrány v 0. den, prostřední ve 20. den a spodní 50. den. Na levém obrázku lze vidět, že na povrchu neproběhly žádné výrazné změny na povrchu tělísek. Mírná změna barvy byla zaznamenána na spodním levém obrázku tělíska u Ecoflexu bez plniva. Na filmech Ecoflexu s plnivem ve spodní části obrázku vpravo je už patrné, že již ve 20. dnu probíhala biodegradace na povrchu filmů. Změny nebyly ještě tak patrné, jak je tomu u 50. dne. Filmy byly křehčí, neudržely svůj tvar a změnily svou barvu na žluto-hnědou.

ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce se zabývá porovnáním biodegradability vzorků filmů Ecoflexu a Ecoflexu se škrobovým plnivem v prostředí kompostu a zemědělských půd z lokalit Iváň, Bratčice a Veverské Knínice.

Mikrobiologickým rozborem bylo zjištěno, že v kompostu i v půdách je dostatečný počet mikroorganismů, a tudíž by zde mohly být testované vzorky biologicky rozkládány. Tento předpoklad se potvrdil, což dokumentují výsledky z plynové chromatografie a skenovací elektronové mikroskopie.

Na počátku tetovování, byla snaha pokusu o záchyt degradérů v testu na tenkém povlaku Ecoflexu a Ecoflexu s plnivem na minerálním agaru. Bylo zjištěno, že u půd i kompostu se degradéři vyskytují v ředění $< 10^2$ CFU/g sušiny. Schopnost biodegradace i v takovém malém množství mikroorganismů je dobrým výsledkem.

Vyhodnocení biologické rozložitelnosti bylo provedeno pomocí GC/TCD, kdy byla zaznamenávána produkce oxidu uhličitého a následně sledována závislost mineralizace uhlíku na čase. Z výsledků vyplývá, že filmy Ecoflexu dosahovaly mírné biodegradace v prostředí půd, cca 6 %; v prostředí kompostu byla zaznamenána biodegradace vyšší cca 16 %. U filmů Ecoflexu se škrobovým plnivem byla biodegradace podstatně výraznější. V půdě z lokality Bratčice dosáhla biodegradace cca 45 %, v půdě z lokalit Iváň a Veverské Knínice dosáhla cca 53 %, v prostředí kompostu pak cca 55 %.

Mechanické vlastnosti testovaných filmů se snížily během testů, což bylo viditelné již během odebírání vzorků z půdních reaktorů v průběhu experimentu. Pomocí skenovací elektronové mikroskopie byly tyto změny na povrchu filmů potvrzeny. Na povrchu filmu Ecoflexu s plnivem byly zaznamenány výraznější změny, trhliny a mnohem vyšší známky poškození filmu. I zde bylo potvrzeno, že vyššího rozkladu bylo dosaženo u vzorku filmů Ecoflexu s plnivem, oproti čistému Ecoflexu. Mechanické vlastnosti (tahová zkouška) u testovaných vzorků Ecoflexu i Ecoflexu s plnivem, budou stanoveny následně, jelikož vzorky budou odebírány ještě po datu odevzdání diplomové práce.

Na závěr lze říci, že Ecoflex se škrobovým plnivem je ve srovnání s čistým Ecoflexem mnohem lépe biologicky rozložitelný, jak v prostředí kompostu, tak v prostředí půdy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KRZAN, A., HEMJINDA, S., MIERTUS, S., et al. *Standardization and certification in the area of environmentally degradation plastic*. Science direct, 2006. p. 2819-2833.
- [2] LUCAS, N., BIRNAIME, C., BELLOY, C., QUENEUDEC, M., SILVESTRE, f., et al, J.-E. *Polymer biodegradation: Mechanism and estimation techniques*. Chemosphere 73, 2008. p. 429-442.
- [3] SHAH, A. A., HASAN, F., HAMEED, A., AHMED, S. *Biological degradation of plastics: A comprehensive review*. Biotechnology Advances 26, 2008. p. 246-265.
- [4] YAMAMOTO, M., et al. *Biodegradable Aliphatic-aromatic polyesters "Ecoflex"*. [on-line]. [cit. 2013-01-05]. Dostupný z WWW: <www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v04/bpol14011_299_305.pdf>.
- [5] TOKIWA. U., et al. S. *Biodegradability of Plastics*. International Journal of Molecular Sciences. 2009, no. 10, p. 3722-2742. ISSN 1422-0067. DOI:10.3390/ijms10093722.
- [6] SONG, J., et al. *Biodegradable and compostable Alternatives to Conventional Plastics*. Phil. Trans. R. Soc. B. 2009, vol. 364, no. 1526, p. 2127-2139. DOI: 10.1098/RSTB.2008.0289. ISSN 1471-2970.
- [7] KI, H. C., PARK, O. K., *Synthesis, characterization and biodegradability of the biodegradable aliphatic-aromatic random copolyesters*. Departments of Chemical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology. March 2001, vol. 42, Issue 5, p. 1849-1861.
- [8] MÜLLER, R. J., KLEEBERG, I., DECKWER, W. D., *Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents*. Journal of Biotechnology. 2001, vol. 86, Issue 2, p. 87-95.
- [9] WITT, U., MÜLLER, R. J., DECKWER, W. D. *Biodegradation Behavior and Material Properties of Aliphatic/Aromatic Polyesters of Commercial Importance*. Journal of environmental polymer degradation. 1997, vol. 5, No. 2, p. 81-89.

- [10] TAN, F. T., et al. *Biodegradation of synthetic co-polyester by aerobic mesophilic microorganisms*. Polymer Degradation and Stability. August 2008, vol. 93, Issue 8, p. 1479-1485.
- [11] KIJCHAVENGKUL, T., AURAS, R., RUBINO, M., et al. *Assessment of aliphatic/aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part I: Field study*, Chemosphere 71. ScienceDirect. 2008, p. 942-953.
- [12] MÜLLER, R. J. *Architecture of biodegradation copolyesters containing aromatic constituents*. Polymer Degradation and Stability 59.1998, p. 203-208.
- [13] TACHIBANA, U., MAEDA, T., ITO., O., et al. *Utilization of a Biodegradable Mulch Sheet Produced from Poly(Lactic Acid)/Ecoflex/Modified Starch in Mandarin Orange Groves*. International Journal of Molecular Sciences. 2009, p. 3599-3615.
- [14] AVELLA, M., VLIEGER, J. De J., ERRICO, M. E., et al. *Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications*. Science Direct. Food Chemistry 93. 2005, p. 467-474.
- [15] WITT, U., et al. *Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates*. Chemosphere 44. 2001, p. 289-299.
- [16] TOKIWA, Y., CALABIA, B. P. *Biodegradability and Biodegradation of Polyesters*. Springer, J. Polym Environ. 2007, p. 259-267. DOI 10.1007/s10924-007-0066-3.
- [17] EUBELER, J. P., et al. *Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups*. Trends in Analytical Chemistry. vol. 29, No. 1, 2010, p. 84-100.
- [18] DVOŘÁČKOVÁ, M., STLOUKAL, P., KOUTNÝ, M, et al. *Biodegradability of aliphatic-aromatic copolyester in aqueous anaerobic and aerobic environments*. p. 141-146. ISBN: 978-1-61804-032-9
- [19] STLOUKAL, P. *Assessment of the interrelation between photooxidation and biodegradation of selected polyesters after artificial weathering*. Elsevier Editorial System for Chemosphere 88. 2012, p. 1214-1219.

- [20] SINGH, B., SHARMA, N. *Mechanistic implications of plastic degradation*. Polymer Degradation and Stability 93. 2008, p. 561-584.
- [21] *Biodegradable Polymers – Inspired by Nature: Ecoflex, Ecovio*. [on-line]. [cit.2013-01-05]. Dostupný z WWW: <http://www.plasticsportal.net/wa/plasticsEU~en_GB/function/conversions:/pubpubli/common/upload/biodegradable_plastics/Ecoflex_Batch_AB1.pdf>.
- [22] TOBIÁŠOVÁ, T. *Studium průniku vybraných degradačních produktů syntetických polymerů do životního prostředí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 74 l. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc. [on-line]. [cit.2013-02-07]. Dostupný z WWW: <http://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=4952>.
- [23] ŠÁRKA, E., KRULIŠ, Z., KOTEK, J. a kol. *Biodegradabilní kompozitní materiály na bázi pšeničného B-škrobu s upotřebením v zemědělství*. Listy cukrovarnické a řepařské. Praha. 2011, p. 402-405. [on-line]. [cit.2013-02-07]. Dostupný z WWW: <http://www.cukr-listy.cz/on_line/2011/PDF/402-405.pdf>.
- [24] *Biologicky odbouratelný plast – Ecoflex*. Chemistry News. 2011. [on-line]. [cit.2013-02-07]. Dostupný z WWW: <<http://www.chemgeneration.com/cz/chemistry-news/biologicky-odbourateln%C3%BD-plast-%E2%80%93-ecoflex.html>>.
- [25] *Kompostovatelný vícevrstvý obal na potraviny*. Enviweb. 2012. [on-line]. [cit.2013-02-07]. Dostupný z WWW: <<http://www.enviweb.cz/clanek/archiv/94114/kompostovateln-y-vicvrstvy-obal-na-potraviny>>.
- [26] *Perspektivy biodegradabilních plastů*. Enviweb. 2003. [on-line]. [cit.2013-02-07]. Dostupný z WWW: <<http://www.enviweb.cz/clanek/archiv/44007/perspektivy-biodegradabilnich-plastu>>.
- [27] *Plasty vyráběné z rostlin, nikoli z ropy*. BioCycle. 2006, vol. 47, č. 5, p. 43-45. [on-line]. [cit.2013-02-07]. Dostupný z WWW: <<http://biom.cz/cz/zpravy-z-tisku/plasty-vyrabene-z-rostlin-nikoli-z-ropy>>.

- [28] *Perspektivy biodegradabilních plastů*. Odpady, Nakládání s odpady. 2003. [on-line]. [cit.2013-02-07]. Dostupný z WWW: <http://odpady.ihned.cz/1-10024740-13079170-E00000_detail-d0>.
- [29] HOLIŠOVÁ, L. *Studium biodegradace aromaticko-alifatického kopolyesteru v prostředí půdy*: diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, 2010. 76 l. Vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
- [30] HOFFMANN, J. RŮŽIČKA, J., ŘEZNÍČKOVÁ, I. *Technologická cvičení z ochrany prostředí*. Část II. Zlín. 2000.
- [31] *Biodegradable Polymers – Inspired by Nature: Ecoflex, Ecovio*. 2008. [on-line]. [cit.2013-01-05]. Dostupný z WWW: <http://www.bioplastics.basf.com/pdf/Ecoflex-Ecovio_Brochure_2008.pdf>.
- [32] *Biodegradace*. [on-line]. [cit.2013-01-05]. Dostupný z WWW: <<http://www.fzp.ujep.cz/~trogl/1Mikr11Biodegradace.pdf>>.
- [33] AVEROUS, L., *Biodegradable polyesters: PLA, PCL, PHA,...* Biodegradable Polymer, Biopolymer, Agro-polymer, Bioplastic, Biomaterial, Compostable Packaging [on-line]. 2009 [cit. 2013-01-05]. Dostupný z WWW: <<http://www.biodeg.net/bioplastic.html>>.
- [34] *Elektronová mikroskopie*, p. 44. [cit. 2013-03-10]. Dostupný z WWW: <http://www.vscht.cz/nmr/mol_model_bioinfo/lekce/mikroskopie.pdf>.
- [35] HNÁTKOVÁ, E. *Využití biologicky rozložitelných polymerů pro konstrukční prvky v oblasti medicíny*: diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, Ústav výrobního inženýrství, 2010. 83 l. Vedoucí práce: Ing. Vladimír Sedlařík, Ph.D.
- [36] *Polysacharidy* [on-line]. 2000 [cit.2013-03-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.sszdra-karvina.cz/bunka/che/pl/plpol.pdf>>.
- [37] GERYCH, P. *Biodegradace polyetylenů s prooxidanty*: diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, 2008. 103 l. Vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

- [38] KRUMPOLC, J. *Faktory ovlivňující biodegradabilitu vybraných polyesterů*: diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2012. 73 l. Vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
- [39] KONEČNA, Z. *Mikrobiologie biodegradace materiálu na bázi polyesteru*: diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2009. 90 l. Vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
- [40] PIŠ, V. *Biodegradace nových syntetických materiálů*: diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2011. 87 l. Vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ASTM	American Society for Testing and Materials
Br	Bratčice
BSK	Biochemická spotřeba kyslíku
C _{OX}	Obsah oxidovatelného uhlíku půdy v procentech
CEN	European Committee for Standardization
CFU	Colony-forming unit; kolonii formující jednotka
CH ₄	Methan
CHSK	Chemická spotřeba kyslíku
CO ₂	Oxid uhličitý
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
Eco	Ecoflex
EcoPl	Ecoflex s plnivem
GC	Plynová chromatografie
GC/FID	Plynový chromatografie s plamenově ionizační detekcí
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem
GC/TCD	Plynová chromatografie s teplotně vodivostní detekcí
GD	Glycerol – dusičnanový agar
GPC	Gelová permeační chromatografie
H ₂ O	Voda
ICCF	International Correspondence Chess Federation
ISO	International Organisation Standardization
Iv	Iváň
JIS	Japanes Industrial Standards
Kn	Veverské Knínice

Kom	Kompost
LDPE	Low-density polyethylen (nízko hustotní polyethylen)
mol%	Molární procenta (číselně představují počet molů složky ve 100 molech směsi)
O ₂	Kyslík
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
POH	Obsah půdní organické hmoty v procentech
PBT	Poly(buthylentereftalát)
PCL	Polykaprolaktonová kyselina
PE	Polyethylen
PES	Polyester
PET	Poly(ethylentereftalát)
PHAs	Poly-β-hydroxyalkanoáty
PHB	Polyhydroxybutyrát
PLA	Polymléčná kyselina
PP	Polypropylen
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SML	Specifický migrační limit
TCD	Teplotně vodivostní detektor
TfH	Extracelulární hydrolysa
T _g	Teplota skelného přechodu
T _m	Teplota tání
TYA	Tryptone yeast agar

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Postup biologické rozložitelnosti [3]</i>	14
<i>Obr. 2: Biologicky rozložitelné plasty [5]</i>	19
<i>Obr. 3: Chemická struktura L-PLA [16]</i>	20
<i>Obr. 4: Chemická struktura PCL [16]</i>	21
<i>Obr. 5: Chemická struktura PHB [16]</i>	21
<i>Obr. 6: Chemická struktura aromaticko-alifatického kopolyesteru Ecoflex [4]</i>	24
<i>Obr. 7: Amylopektin a amylosa [36]</i>	26
<i>Obr. 8: Vlivy působící na kompostovací fólie během testování [13]</i>	31
<i>Obr. 9: Biometrická láhev (bioreaktor)</i>	51
<i>Obr. 10: Plynový chromatograf (vpravo) a vyhodnocovací zařízení (PC, vlevo) se záznamem analýzy (chromatogramem)</i>	55
<i>Obr. 11: Aerační soustava (provzdušňovací zařízení)</i>	56
<i>Obr. 12: Schéma elektronového mikroskopu [34]</i>	59
<i>Obr. 13: Vyseknuté tělísko kopolyesteru</i>	61
<i>Obr. 14: Reaktory s kompostem (vpravo) a půdní reaktor s vzduchovým motorkem a spínačem (vlevo)</i>	61
<i>Obr. 15: Trhací přístroj INSTRON [35]</i>	62
<i>Obr. 16: Výskyt bakterií na minerálním médiu o ředění 10^{-2} u půdy z lokality Veverské Knínice, nenaočkovaný min. agar, min. agar s Ecoflexem a min. agar Ecoflex s plnivem</i>	68
<i>Obr. 17: Porovnání výskytu bakterií na min. agaru s Eco (uprostřed) s EcoPl (vpravo) se suspenzí kompostu, ředění 10^{-2}</i>	69
<i>Obr. 18: Závislost mineralizace uhlíku na čase – vzorky Ecoflexu v prostředí půd a kompostu</i>	71
<i>Obr. 19: Závislost mineralizace uhlíku na čase – vzorky Ecoflexu se škrobovým plnivem v prostředí půd a kompostu</i>	73
<i>Obr. 20: Porovnání biodegradace vzorků Ecoflexu a Ecoflexu se škrobovým plnivem</i>	74
<i>Obr. 21: Snímek povrchu fólie Ecoflexu odebrané z bioreaktoru (půda z lokality Iváň) v 0. den; zvětšení 1 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo)</i>	75
<i>Obr. 22: Snímek povrchu fólie Ecoflexu odebrané z bioreaktoru (půda z lokality Iváň) v 28. den; zvětšení 1 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo)</i>	75

- Obr. 23: Snímek povrchu fólie Ecoflexu odebrané z bioreaktoru (půda z lokality Iváň) v 78. den; zvětšení 1 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo)..... 76*
- Obr. 24: Snímek povrchu fólie Ecoflexu se škrobovým plnivem odebraný z bioreaktoru (půda z lokality Iváň) v 0. den; zvětšení 1 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo) 77*
- Obr. 25: Snímek povrchu fólie Ecoflexu s plnivem odebraný z bioreaktoru (půda z lokality Iváň) v 28. den; zvětšení 1 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo)..... 78*
- Obr. 26: Snímek povrchu fólie Ecoflexu se škrobovým plnivem odebraný z bioreaktoru (půda z lokality Iváň) v 78. den; zvětšení 1 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo) 79*
- Obr. 27: Tělíska Ecoflexu (vlevo) a Ecoflexu se škrobovým plnivem (vpravo) vyjmuty v 0. den (horní tělísko), 20. den (prostřední tělísko), 50. den (spodní tělísko) z reaktorů s kompostem 81*

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. I.: Základní materiálové vlastnosti materiálu Ecoflex (50µm fólie) [4]</i>	<i>24</i>
<i>Tab. II.: Druhy půd z jednotlivých lokalit (informace získány od Ing. Jiřího Jandáka, CSc. MZLU Brno).....</i>	<i>42</i>
<i>Tab. III.: Zrnitostní charakteristika půd s obsahem částic (Ing. Jiří Jandák, CSc. MZLU Brno).....</i>	<i>42</i>
<i>Tab. IV.: Hodnoty organického podílu (Ing. Jiřího Jandák, CSc. MZLU Brno).....</i>	<i>43</i>
<i>Tab. V.: Obsah složek v biometrických lahvích s půdou z lokality Iváň.....</i>	<i>51</i>
<i>Tab. VI.: Obsah složek v biometrických lahvích s půdou z lokality Bratčice</i>	<i>52</i>
<i>Tab. VII.: Obsah složek v biometrických lahvích s půdou z lokality V. Knínice</i>	<i>52</i>
<i>Tab. VIII.: Obsah složek v biometrických lahvích s kompostem</i>	<i>53</i>
<i>Tab. IX.: Podmínky měření CO₂ na přístroji GC Agilent 7890.....</i>	<i>54</i>
<i>Tab. X.: Stanovení pH, sušiny a spalitelného podílu u půd a kompostu.....</i>	<i>65</i>
<i>Tab. XI.: Stanovení počtu celkových počtů mikroorganismů v půdě, kompostu</i>	<i>67</i>
<i>Tab. XII.: Hodnoty k výpočtům pro stanovení biodegradace (zpracování naměřených dat viz. kap. 7.5.3)</i>	<i>70</i>

SEZNAM PŘÍLOH

<i>Příloha I.: Stanovení oxidu uhličitého (CO₂) – slepý pokus u půdy z lokality Iváň</i>	<i>94</i>
<i>Příloha II.: Stanovení degradace vzorku Ecoflexu u půdy z lokality Iváň</i>	<i>95</i>
<i>Příloha III.: Stanovení degradace vzorku Ecoflexu s plnivem v půdě z lokality Iváň</i>	<i>96</i>
<i>Příloha IV.: Stanovení oxidu uhličitého (CO₂) – slepý pokus u půdy z lokality Bratčice</i>	<i>97</i>
<i>Příloha V.: Stanovení degradace vzorku Ecoflexu z lokality Bratčice</i>	<i>98</i>
<i>Příloha VI.: Stanovení degradace Ecoflexu s plnivem u půdy z lokality Bratčice</i>	<i>99</i>
<i>Příloha VII.: Stanovení oxidu uhličitého (CO₂) – slepý pokus u půdy z lokality Veverské Knínice</i>	<i>100</i>
<i>Příloha VIII.: Stanovení biodegradace vzorku Ecoflexu v půdě z lokality Veverské Knínice.....</i>	<i>101</i>
<i>Příloha IX.: Stanovení degradace vzorku Ecoflexu s plnivem v půdě z lokality Veverské Knínice</i>	<i>102</i>
<i>Příloha X.: Stanovení oxidu uhličitého (CO₂) – slepý pokus v prostředí kompostu.....</i>	<i>103</i>
<i>Příloha XI.: Stanovení biodegradace vzorku Ecoflexu v prostředí kompostu.....</i>	<i>104</i>
<i>Příloha XII.: Stanovení biodegradace vzorku Ecoflexu s plnivem v prostředí kompostu.....</i>	<i>105</i>

Příloha I.: Stanovení oxidu uhličitého (CO₂) – slepý pokus u půdy z lokality Iváň

Datum	Inkubace (dny)	Teplota [K]	Tlak [kPa]	TC [%]	m _c [mg]	V _{head} [ml]	V _{nástřík} [μl]	S _{St.} [μV.s]	S _{Vz.} [μV.s]	Denní C [mg]	Kumulat. C [mg]
16.10.2012	0	0	0	0	0	580	0	0	0	0	0
23.10.2012	7	299,15	101				100	94,597	59,9549	1,4331	2,0953
30.10.2012	14	298,15	100,1				100	93,499	94,6889	2,2771	4,3724
6.11.2012	21	197,15	100,2				100	95,574	43,6029	1,5529	5,9253
13.11.2012	28	299,15	101,4				100	95,183	40,89	0,9752	6,9005
20.11.2012	35	300,15	100,9				100	109,802	41,942	0,8600	7,7604
28.11.2012	43	300,15	99,3				100	109,527	53,7277	1,0869	8,8473
6.12.2012	50	297,15	100				100	107,479	40,1068	0,8410	9,6883
13.12.2012	57	298,15	100,8				100	106,742	41,1434	0,8727	10,5611
20.12.2012	64	297,15	101				100	109,551	40,031	0,8318	11,3928
3.1.2013	78	296,15	101,4				100	91,775	60,6497	1,5154	12,9082
10.1.2013	85	296,15	100,8				100	89,413	31,3444	0,7991	13,7073
17.1.2013	92	296,15	100				100	107,236	34,3516	0,7244	14,4317
24.1.2013	99	296,15	99,8	100	106,3451	36,5355	0,7754	15,2071			

Příloha II.: Stanovení degradace vzorku Ecoflexu u půdy z lokality Iváň

Datum	Inkubace (dny)	Teplota [K]	Tlak [kPa]	TC [%]	m_c [mg]	V_{head} [ml]	$V_{nástřík}$ [μ l]	$S_{St.}$ [μ V.s]	$S_{Vz.}$ [μ V.s]	Denní C [mg]	Kumulat. C [mg]	Substr. C [mg]	Degradace [%]
16.10.2012	0	0	0	62,54	100,9	580	0	0	0	0	0	0	0
23.10.2012	7	299,15	101				100	94,597	74,1555	1,7725	2,5916	0,4963	0,7865
30.10.2012	14	298,15	100,1				100	93,499	124,006	2,9821	5,5737	1,2013	1,9038
6.11.2012	21	197,15	100,2				100	95,574	51,309	1,8273	7,4010	1,4758	2,3387
13.11.2012	28	299,15	101,4				100	95,183	48,0999	1,1472	8,5482	1,6477	2,6112
20.11.2012	35	300,15	100,9				100	109,802	51,7741	1,0616	9,6097	1,8493	2,9306
28.11.2012	43	300,15	99,3				100	109,527	61,5179	1,2445	10,8542	2,0069	3,1804
6.12.2012	50	297,15	100				100	107,479	55,1883	1,1573	12,0115	2,3232	3,6815
13.12.2012	57	298,15	100,8				100	106,742	48,6652	1,0323	13,0438	2,4827	3,9344
20.12.2012	64	297,15	101				100	109,551	48,1814	1,0011	14,0449	2,6521	4,2028
3.1.2013	78	296,15	101,4				100	91,775	71,7048	1,7916	15,8365	2,9283	4,6405
10.1.2013	85	296,15	100,8				100	89,413	36,3015	0,9255	16,7620	3,0547	4,8408
17.1.2013	92	296,15	100				100	107,236	41,9282	0,8842	17,6462	3,2144	5,0940
24.1.2013	99	296,15	99,8				100	106,3451	45,07642	0,9566	18,6028	3,3957	5,3812

Příloha III.: Stanovení degradace vzorku Ecoflexu s plnivem v půdě z lokality Iváň

Datum	Inkubace (dny)	Teplota [K]	Tlak [kPa]	TC [%]	m _c [mg]	V _{head} [ml]	V _{nástřík} [μl]	S _{St.} [μV.s]	S _{Vz.} [μV.s]	Denní C [mg]	Kumulat. C [mg]	Substr. C [mg]	Degradace [%]
16.10.2012	0	0	0	53,67	100,4	580	0	0	0	0	0	0	0
23.10.2012	7	299,15	101				100	94,597	136,7437	3,2685	4,779	2,6837	4,9805
30.10.2012	14	298,15	100,1				100	93,499	296,3342	7,1263	11,9053	7,5329	13,9797
6.11.2012	21	197,15	100,2				100	95,574	152,1892	5,4201	17,3253	11,4001	21,1564
13.11.2012	28	299,15	101,4				100	95,183	137,069	3,2690	20,5944	13,6939	25,4133
20.11.2012	35	300,15	100,9				100	109,802	158,4054	3,2479	23,8423	16,0818	29,8449
28.11.2012	43	300,15	99,3				100	109,527	188,0589	3,8043	27,6465	18,7992	34,8879
6.12.2012	50	297,15	100				100	107,479	144,3218	3,0264	30,6729	20,9846	38,9435
13.12.2012	57	298,15	100,8				100	106,742	123,7816	2,6256	33,2986	22,7375	42,1966
20.12.2012	64	297,15	101				100	109,551	116,4126	2,4189	35,7175	24,3246	45,1420
3.1.2013	78	296,15	101,4				100	91,775	151,4956	3,7852	39,5027	26,5945	49,3544
10.1.2013	85	296,15	100,8				100	89,413	63,1029	1,6087	41,1114	27,4041	50,8570
17.1.2013	92	296,15	100				100	107,236	68,6312	1,4473	42,5587	28,1270	52,1985
24.1.2013	99	296,15	99,8	100	106,3451	63,6975	1,3518	43,9105	28,7034	53,2682			

Příloha IV.: Stanovení oxidu uhličitého (CO₂) – slepý pokus u půdy z lokality Bratčice

Datum	Inkubace (dny)	Teplota [K]	Tlak [kPa]	TC [%]	m _c [mg]	V _{head} [ml]	V _{nástřík} [μl]	S _{st.} [μV.s]	S _{vz.} [μV.s]	Denní C [mg]	Kumulat. C [mg]
16.10.2012	0	0	0	0	0	580	0	0	0	0	0
23.10.2012	7	299,15	101				100	94,597	27,801	0,6645	0,9716
30.10.2012	14	298,15	100,1				100	93,499	41,5931	1,0002	1,9718
6.11.2012	21	197,15	100,2				100	95,574	17,0984	0,6089	2,5808
13.11.2012	28	299,15	101,4				100	95,183	15,677	0,3739	2,9547
20.11.2012	35	300,15	100,9				100	109,802	15,6929	0,3218	3,2764
28.11.2012	43	300,15	99,3				100	109,527	17,5931	0,3559	3,6323
6.12.2012	50	297,15	100				100	107,479	19,114	0,4008	4,0331
13.12.2012	57	298,15	100,8				100	106,742	15,1713	0,3218	4,3549
20.12.2012	64	297,15	101				100	109,551	14,8621	0,3088	4,6638
3.1.2013	78	296,15	101,4				100	91,775	23,4396	0,5857	5,2494
10.1.2013	85	296,15	100,8				100	89,413		0	5,2494
17.1.2013	92	296,15	100				100	107,236		0	5,2494
24.1.2013	99	296, 15	99,8				100	106,3451		0	5,2494

Příloha V.: Stanovení degradace vzorku Ecoflexu z lokality Bratčice

Datum	Inkubace (dny)	Teplota [K]	Tlak [kPa]	TC [%]	m _c [mg]	V _{head} [ml]	V _{nástřík} [μl]	S _{st.} [μV.s]	S _{vz.} [μV.s]	Denní C [mg]	Kumulat. C [mg]	Substr. C [mg]	Degradace [%]
16.10.2012	0	0	0	62,54	100,3	580	0	0	0	0	0	0	0
23.10.2012	7	299,15	101				100	94,597	40,7754	0,9746	1,425	0,4534	0,7228
30.10.2012	14	298,15	100,1				100	93,499	56,3353	1,3548	2,7798	0,8079	1,2880
6.11.2012	21	197,15	100,2				100	95,574	21,5543	0,7676	3,5474	0,9666	1,5410
13.11.2012	28	299,15	101,4				100	95,183	20,6015	0,4913	4,0387	1,0841	1,7282
20.11.2012	35	300,15	100,9				100	109,802	22,3928	0,4591	4,4979	1,2214	1,9472
28.11.2012	43	300,15	99,3				100	109,527	105,0842	2,1258	6,6236	2,9913	4,7687
6.12.2012	50	297,15	100				100	107,479	30,2212	0,6337	7,2574	3,2242	5,1400
13.12.2012	57	298,15	100,8				100	106,742	27,1178	0,5752	7,8326	3,4776	5,5440
20.12.2012	64	297,15	101				100	109,551	29,078	0,6042	8,4368	3,7730	6,0149
3.1.2013	78	296,15	101,4				100	91,775	39,8702	0,9962	9,4330	4,1835	6,6694
10.1.2013	85	296,15	100,8				100	89,413	22,0336	0,5617	9,9947	4,7453	7,5649
17.1.2013	92	296,15	100				100	107,236	26,181	0,5521	10,5468	5,2974	8,4451
24.1.2013	99	296,15	99,8	100	106,3451	26,8507	0,5698	11,1166	5,8672	9,3535			

Příloha VI.: Stanovení degradace Ecoflexu s plnivem u půdy z lokality Bratčice

Datum	Inkubace (dny)	Teplota [K]	Tlak [kPa]	TC [%]	m _c [mg]	V _{head} [ml]	V _{nástřík} [μl]	S _{st.} [μV.s]	S _{vz.} [μV.s]	Denní C [mg]	Kumulat. C [mg]	Substr. C [mg]	Degradace [%]
16.10.2012	0	0	0	53,67	100,3	580	0	0	0	0	0	0	0
23.10.2012	7	299,15	101				100	94,597	108,3889	2,5908	3,788	2,8164	5,2319
30.10.2012	14	298,15	100,1				100	93,499	227,2568	5,4651	9,2531	7,2813	13,5262
6.11.2012	21	197,15	100,2				100	95,574	115,0249	4,0965	13,3496	10,7688	20,0049
13.11.2012	28	299,15	101,4				100	95,183	96,1859	2,2940	15,6436	12,6889	23,5718
20.11.2012	35	300,15	100,9				100	109,802	98,0669	2,0107	17,6543	14,3779	26,7093
28.11.2012	43	300,15	99,3				100	109,527	105,0842	2,1258	19,7801	16,1478	29,9971
6.12.2012	50	297,15	100				100	107,479	83,3352	1,7475	21,5276	17,4945	32,4988
13.12.2012	57	298,15	100,8				100	106,742	69,9402	1,4836	23,0112	18,6562	34,6570
20.12.2012	64	297,15	101				100	109,551	67,178	1,3959	24,4070	19,7433	36,6764
3.1.2013	78	296,15	101,4				100	91,775	85,7164	2,1417	26,5487	21,2993	39,5669
10.1.2013	85	296,15	100,8				100	89,413	38,2146	0,9742	27,5229	22,2735	41,3768
17.1.2013	92	296,15	100				100	107,236	41,351	0,8720	28,3950	23,1455	42,9967
24.1.2013	99	296,15	99,8	100	106,3451	38,7401	0,8222	29,2172	23,9678	44,5241			

Příloha VII.: Stanovení oxidu uhličitého (CO₂) – slepý pokus u půdy z lokality Veverské Knínice

Datum	Inkubace (dny)	Teplota [K]	Tlak [kPa]	TC [%]	m _c [mg]	V _{head} [ml]	V _{nástrík} [μl]	S _{st.} [μV.s]	S _{vz.} [μV.s]	Denní C [mg]	Kumulat. C [mg]
16.10.2012	0	0	0	0	0	580	0	0	0	0	0
23.10.2012	7	299,15	101				100	94,597	36,94	0,8830	1,291
30.10.2012	14	298,15	100,1				100	93,499	55,3966	1,3322	2,6232
6.11.2012	21	197,15	100,2				100	95,574	20,9226	0,7451	3,3683
13.11.2012	28	299,15	101,4				100	95,183	19,724	0,4704	3,8387
20.11.2012	35	300,15	100,9				100	109,802	19,202	0,3937	4,2324
28.11.2012	43	300,15	99,3				100	109,527	23,6908	0,4792	4,7117
6.12.2012	50	297,15	100				100	107,479	23,2279	0,4871	5,1988
13.12.2012	57	298,15	100,8				100	106,742	20,2382	0,4293	5,6281
20.12.2012	64	297,15	101				100	109,551	30,5437	0,6347	6,2627
3.1.2013	78	296,15	101,4				100	91,775	20,7355	0,5181	6,7808
10.1.2013	85	296,15	100,8				100	89,413	17,4198	0,4441	7,2249
17.1.2013	92	296,15	100				100	107,236	19,8406	0,4184	7,6433
24.1.2013	99	296,15	99,8	100	106,3451	21,6565	0,4596	8,1029			

Příloha VIII.: Stanovení biodegradace vzorku Ecoflexu v půdě z lokality Veverské Knínice

Datum	Inkubace (dny)	Teplo- ta [K]	Tlak [kPa]	TC [%]	m _c [mg]	V _{head} [ml]	V _{nástrík} [μl]	S _{st.} [μV.s]	S _{vz.} [μV.s]	Denní C [mg]	Kumulat. C [mg]	Substr. C [mg]	Degradace [%]
16.10.2012	0	0	0	62,54	100,5	580	0	0	0	0	0	0	0
23.10.2012	7	299,15	101				100	94,597	54,153	1,2944	1,8926	0,6016	0,9572
30.10.2012	14	298,15	100,1				100	93,499	73,7478	1,7735	3,6661	1,0429	1,6593
6.11.2012	21	197,15	100,2				100	95,574	23,921	0,8519	4,5180	1,1497	1,8292
13.11.2012	28	299,15	101,4				100	95,183	21,3293	0,5087	5,0267	1,1880	1,8901
20.11.2012	35	300,15	100,9				100	109,802	23,1622	0,4749	5,5016	1,2692	2,0193
28.11.2012	43	300,15	99,3				100	109,527	27,9611	0,5656	6,0673	1,3556	2,1567
6.12.2012	50	297,15	100				100	107,479	28,6507	0,6008	6,6680	1,4693	2,3377
13.12.2012	57	298,15	100,8				100	106,742	27,2162	0,5773	7,2454	1,6173	2,5732
20.12.2012	64	297,15	101				100	109,551	30,4737	0,6332	7,8786	1,6158	2,5708
3.1.2013	78	296,15	101,4				100	91,775	30,5437	0,7632	8,6417	1,8609	2,9607
10.1.2013	85	296,15	100,8				100	89,413	31,5652	0,8047	9,4464	2,2215	3,5345
17.1.2013	92	296,15	100				100	107,236	40,9673	0,8639	10,3104	2,6671	4,2433
24.1.2013	99	296,15	99,8	100	106,3451	43,8265	0,9301	11,2405	3,1376	4,9919			

Příloha IX.: Stanovení degradace vzorku Ecoflexu s plnivem v půdě z lokality Veverské Knínice

Datum	Inkuba- ce (dny)	Teplota [K]	Tlak [kPa]	TC [%]	m _c [mg]	V _{head} [ml]	V _{nástrík} [μl]	S _{st.} [μV.s]	S _{vz.} [μV.s]	Denní C [mg]	Kumulat. C [mg]	Substr. C [mg]	Degradace [%]
16.10.2012	0	0	0	53,67	100,3	580	0	0	0	0	0	0	0
23.10.2012	7	299,15	101				100	94,597	143,2375	3,4237	5,0059	3,7149	6,9010
30.10.2012	14	298,15	100,1				100	93,499	312,2985	7,5102	12,5161	9,8929	18,3777
6.11.2012	21	197,15	100,2				100	95,574	153,7111	5,4743	17,9904	14,6220	27,1629
13.11.2012	28	299,15	101,4				100	95,183	134,3027	3,2030	21,1934	17,3547	32,2392
20.11.2012	35	300,15	100,9				100	109,802	139,9973	2,8705	24,0639	19,8314	36,8402
28.11.2012	43	300,15	99,3				100	109,527	148,1514	2,9970	27,0609	22,3492	41,5173
6.12.2012	50	297,15	100				100	107,479	106,4586	2,2324	29,2932	24,0945	44,7595
13.12.2012	57	298,15	100,8				100	106,742	83,6107	1,7735	31,0668	25,4387	47,2567
20.12.2012	64	297,15	101				100	109,551	73,3701	1,5245	32,5913	26,3286	48,9097
3.1.2013	78	296,15	101,4				100	91,775	52,2673	1,3059	33,8973	27,1165	50,3733
10.1.2013	85	296,15	100,8				100	89,413	41,5766	1,0600	34,9572	27,7323	51,5173
17.1.2013	92	296,15	100				100	107,236	45,6905	0,9635	35,9207	28,2774	52,5300
24.1.2013	99	296,15	99,8				100	106,3451	43,9577	0,9329	36,8536	28,7507	53,4092

Příloha X.: Stanovení oxidu uhličitého (CO₂) – slepý pokus v prostředí kompostu

Datum	Inkubace (dny)	Teplota [K]	Tlak [kPa]	TC [%]	m _c [mg]	V _{head} [ml]	V _{nástřík} [μl]	S _{St.} [μV.s]	S _{Vz.} [μV.s]	Denní C [mg]	Kumulat. C [mg]
16.10.2012	0	0	0	0	0	580	0	0	0	0	0
23.10.2012	7	299,15	101				100	94,597	245,049	5,8573	8,5641
30.10.2012	14	298,15	100,1				100	93,499	423,4574	10,1834	18,7475
6.11.2012	21	197,15	100,2				100	95,574	170,9977	6,0899	24,8374
13.11.2012	28	299,15	101,4				100	95,183	162,2267	3,8690	28,7064
20.11.2012	35	300,15	100,9				100	109,802	183,888	3,7704	32,4768
28.11.2012	43	300,15	99,3				100	109,527	214,9649	4,3486	36,8253
6.12.2012	50	297,15	100				100	107,479	172,367	3,6145	40,4398
13.12.2012	57	298,15	100,8				100	106,742	150,6413	3,1954	43,6352
20.12.2012	64	297,15	101				100	109,551	145,1551	3,0161	46,6513
3.1.2013	78	296,15	101,4				100	91,775	202,6487	5,0633	51,7146
10.1.2013	85	296,15	100,8				100	89,413	94,5935	2,4116	54,1262
17.1.2013	92	296,15	100				100	107,236	109,412	2,3073	56,4335
24.1.2013	99	296,15	99,8				100	106,3451	108,1052	2,2942	58,7277

Příloha XI.: Stanovení biodegradace vzorku Ecoflexu v prostředí kompostu

Datum	Inkubace (dny)	Teplota [K]	Tlak [kPa]	TC [%]	m _c [mg]	V _{head} [ml]	V _{nástřík} [μl]	S _{st.} [μV.s]	S _{vz.} [μV.s]	Denní C [mg]	Kumulat. C [mg]	Substr. C [mg]	Degradace [%]
16.10.2012	0	0	0	62,54	100,3	580	0	0	0	0	0	0	0
23.10.2012	7	299,15	101				100	94,597	269,0436	6,4308	9,4027	0,8386	1,3369
30.10.2012	14	298,15	100,1				100	93,499	450,2843	10,8285	20,2312	1,4837	2,3654
6.11.2012	21	197,15	100,2				100	95,574	178,8116	6,3682	26,5994	1,7620	2,8090
13.11.2012	28	299,15	101,4				100	95,183	175,5612	4,1870	30,7864	2,0800	3,3160
20.11.2012	35	300,15	100,9				100	109,802	207,2882	4,2502	35,0366	2,5598	4,0809
28.11.2012	43	300,15	99,3				100	109,527	255,0651	5,1598	40,1964	3,3710	5,3741
6.12.2012	50	297,15	100				100	107,479	211,4261	4,4335	44,6299	4,1901	6,6798
13.12.2012	57	298,15	100,8				100	106,742	192,4706	4,0827	48,7126	5,0774	8,0943
20.12.2012	64	297,15	101				100	109,551	182,6551	3,7953	52,5079	5,8566	9,3365
3.1.2013	78	296,15	101,4				100	91,775	260,8069	6,5164	59,0243	7,3097	11,6531
10.1.2013	85	296,15	100,8				100	89,413	128,0763	3,2652	62,2895	8,1633	13,0139
17.1.2013	92	296,15	100				100	107,236	153,1141	3,2289	65,5184	9,0849	14,4831
24.1.2013	99	296,15	99,8				100	106,3451	149,0113	3,1623	68,6807	9,9530	15,8670

Příloha XII.: Stanovení biodegradace vzorku Ecoflexu s plnivem v prostředí kompostu

Datum	Inkubace (dny)	Teplota [K]	Tlak [kPa]	TC [%]	m _c [mg]	V _{head} [ml]	V _{nástrík} [μl]	S _{st.} [μV.s]	S _{vz.} [μV.s]	Denní C [mg]	Kumulat. C [mg]	Substr. C [mg]	Degradace [%]
16.10.2012	0	0	0	53,67	100,3	580	0	0	0	0	0	0	0
23.10.2012	7	299,15	101				100	94,597	453,4307	10,8381	15,8467	7,2826	13,5286
30.10.2012	14	298,15	100,1				100	93,499	755,263	18,1627	34,0094	15,2619	28,3515
6.11.2012	21	197,15	100,2				100	95,574	255,7417	9,1080	43,1173	18,2800	33,9581
13.11.2012	28	299,15	101,4				100	95,183	220,7851	5,2656	48,3830	19,6766	36,5525
20.11.2012	35	300,15	100,9				100	109,802	246,0179	5,0443	53,4272	20,9505	38,9189
28.11.2012	43	300,15	99,3				100	109,527	286,737	5,8005	59,2277	22,4023	41,6161
6.12.2012	50	297,15	100				100	107,479	226,6616	4,7530	63,9807	23,5409	43,7311
13.12.2012	57	298,15	100,8				100	106,742	201,5952	4,2762	68,2569	24,6217	45,7389
20.12.2012	64	297,15	101				100	109,551	191,8798	3,9870	72,2439	25,5926	47,5425
3.1.2013	78	296,15	101,4				100	91,775	262,5519	6,5600	78,8040	27,0893	50,3229
10.1.2013	85	296,15	100,8				100	89,413	127,6433	3,2541	82,0581	27,9319	51,8881
17.1.2013	92	296,15	100				100	107,236	153,1089	3,2288	85,2869	28,8534	53,5999
24.1.2013	99	296,15	99,8				100	106,3451	150,4773	3,1925	88,4794	29,7517	55,2686