

Faktory ovlivňující biodegradabilitu vybraných polyesterů

Bc. Jaromír Krumpolc

Diplomová práce

2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jaromír KRUMPOLC**
Osobní číslo: **T10340**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Faktory ovlivňující biodegradabilitu vybraných polyesterů**

Zásady pro vypracování:

1. Provést literární rešerši a navrhnout experimenty.
2. Provést biodegradační experiment v prostředí kompostu s vybranými vzorky PLA, PBAT, a Ecoflexu.
3. V závislosti na časových možnostech uskutečnit další experimenty se vzorky.
4. Teorii, metodiku, výsledky a diskusi sepsat do formy DP.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Odborné publikace v databázových zdrojích na internetu.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

13. února 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

4. května 2012

Ve Zlíně dne 13. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: Krumpolc Jaromír

Obor: Inženýrství ochrany životního prostředí

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu 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, považuji 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 4.5.2012



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

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

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

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

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

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

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). 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 výdělků 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 výdělků dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Byl sledován vliv přídavku nízkomolekulární kyseliny polymléčné (N_PLA) k vysokomolekulární kyselině polymléčné (V_PLA) v prostředí kompostu, za účelem indukce hydrolytických enzymů degradujících mikroorganismů a pomnožení těchto mikroorganismů, což by dle předpokladu mohlo vést k vymizení či zkrácení lagové fáze vyskytující se při biodegradaci V_PLA. Byly připraveny směsi V_PLA s přídavkem 0 až 20 hmotnostních procent N_PLA a inkubovány při teplotě 58 °C v prostředí kompostu. Biodegradabilita zkoumaných vzorků byla hodnocena analýzou CO₂ pomocí plynového chromatografu. Výsledky ukázaly, že lagová fáze nebyla ovlivněna přídavkem N_PLA a rostoucí míra biodegradace V_PLA je zapříčiněna zvyšujícím se přídavkem N_PLA. Z výsledků vyplývá, že tato lagová fáze je způsobena spíše materiálovými vlastnostmi V_PLA a nikoliv faktory mikrobiologickými. V další části práce byla vyvíjena metodika pro sledování biodegradace vybraných syntetických polyesterů pomocí izolovaných čistých kmenů mikroorganismů.

Klíčová slova: Biodegradace, polymléčná kyselina, polyester, kompost, PBAT, Ecoflex.

ABSTRACT

The effect of low molecular polylactic acid additions on the biodegradation of high molecular polylactic acid was studied in the compost environment with the intention to test the possibility of the induction of hydrolytic enzymes and/or the multiplication of degrading microorganisms and the possibility to reduce the typical lag-phase occurring with biodegradation pure high molecular polylactic acid. Mixtures of high molecular polylactic acid with contents of 0 to 20 % of low molecular weight polylactic acid were prepared and incubated at 58 °C in compost. The biodegradation of investigated samples was evaluated using carbon dioxide analysis by gas chromatography. The results showed that lag-phase was not affected by the low molecular polylactic acid addition and slightly increased levels of biodegradation could be explained by the content of molecular weight polylactic acid only. These findings suggest that the lag-phase was caused most probably by material properties of high molecular polylactic acid rather than microbiological factors. The next section was devoted to the development of a methodology enabling the monitoring of biodegradation of selected synthetic polyesters using isolated pure strains.

Keywords: Biodegradation, polylactic acid, polyester, compost, PBAT, Ecoflex.

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce panu doc. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. a Ing. Petru Stloukalovi za jejich ochotu, odbornou pomoc a cenné rady a připomínky při zpracovávání mé diplomové práce. Můj velký dík patří rovněž všem zaměstnancům ÚIOŽP Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, za pomoc a vytvoření pracovních podmínek pro uskutečnění experimentální části této diplomové práce. Nesmím zapomenout také poděkovat své rodině za podporu a trpělivost, kterou mě obklopovala po celou dobu mého studia.

„Musíš se mnoho učit, abys poznal, že víš málo.“

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOROZLOŽITELNÉ POLYMERY	12
1.1 BIODEGRADACE POLYMERŮ.....	13
1.1.1 Mechanismy biodegradace	14
1.1.2 Fáze polymerní biodegradace.....	14
1.1.3 Faktory ovlivňující biodegradabilitu polymerů.....	15
2 POLYESTERY	16
2.1 PLA (POLYLACTIC ACID).....	16
2.1.1 Struktura.....	16
2.1.2 Výroba.....	16
2.1.3 Vlastnosti.....	17
2.1.4 Aplikace	18
2.2 AROMATICKO-ALIFATICKÉ KOPOLYESTERY	18
2.2.1 Ecoflex	19
Struktura.....	19
Vlastnosti	19
Aplikace	20
3 STUDIE ZABÝVAJÍCÍ SE BIODEGRADABILITOU PLA.....	21
II PRAKTICKÁ ČÁST	25
4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	26
5 ŽIVNÁ MÉDIA, ROZTOKY K JEJICH PŘÍPRAVĚ, PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	27
5.1 ROZTOKY	27
5.2 TUHÉ ŽIVNÉ PŮDY	30
5.3 POUŽITÉ KMENY MIKROORGANISMŮ DEGRADUJÍCÍ DANÝ POLYESTER.....	31
5.4 POUŽITÉ POLYMERNÍ MATERIÁLY	31
5.4.1 Příprava roztoků polymerních submikročásteček.....	32
5.4.2 Příprava práškových forem použitých polymerních materiálů.....	32
5.5 DALŠÍ MATERIÁLY POUŽITÉ V BIODEGRADAČNÍCH TESTECH.....	33
5.6 POUŽITÉ PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	33
6 METODIKA A PRACOVNÍ POSTUPY	34
6.1 CHARAKTERISTIKA KOMPOSTU	34
6.1.1 Stanovení sušiny kompostu	34
6.1.2 Stanovení spalitelného podílu kompostu	35
6.2 POROVNÁNÍ BIODEGRADACE NÍZKOMOLEKULÁRNÍ A VYSOKOMOLEKULÁRNÍ PLA POMOCÍ STANOVENÍ UVOLNĚNÉHO CO ₂	36
6.2.1 Biometrická láhev	36

6.2.2	Příprava bioreaktoru	36
6.2.3	Analýza CO ₂ a O ₂ pomocí plynové chromatografie.....	37
6.2.4	Provzdušňování	38
6.2.5	Zpracování naměřených dat	39
6.3	POMNOŽENÍ KMENE MIKROORGANISMŮ DEGRADUJÍCÍ DANÝ POLYESTER	42
6.4	BIODEGRADACE N_PLA, PBAT A ECOFLEXU ČISTÝM KMENEM MIKROORGANISMŮ	42
6.5	POMNOŽENÍ KMENE MIKROORGANISMŮ DEGRADUJÍCÍ DANÝ POLYESTER V RŮZNÝCH TEKUTÝCH MÉDIÍCH	43
6.6	BIODEGRADACE N_PLA ČISTÝM KMENEM MIKROORGANISMŮ DEGRADUJÍCÍ DANÝ POLYMER V PROSTŘEDÍ STERILNÍHO KOMPOSTU	43
6.7	BIODEGRADACE PBAT ČISTÝM KMENEM MIKROORGANISMŮ DEGRADUJÍCÍ DANÝ POLYMER	45
7	CHARAKTERISTIKA KOMPOSTU.....	47
8	HODNOCENÍ BIODEGRADACE NÍZKOMOLEKULÁRNÍ A VYSOKOMOLEKULÁRNÍ PLA A JEJICH SMĚSÍ V PROSTŘEDÍ KOMPOSTU.....	48
9	POMNOŽENÍ KMENE MIKROORGANISMŮ DEGRADUJÍCÍ DANÝ POLYESTER.....	53
10	HODNOCENÍ BIODEGRADACE N_PLA, PBAT A ECOFLEXU ČISTÝM KMENEM MIKROORGANISMŮ	54
11	POMNOŽENÍ KMENE MIKROORGANISMŮ DEGRADUJÍCÍ DANÝ POLYESTER V RŮZNÝCH TEKUTÝCH MÉDIÍCH	57
12	HODNOCENÍ BIODEGRADACE NÍZKOMOLEKULÁRNÍ PLA ČISTÝM KMENEM MIKROORGANISMŮ V PROSTŘEDÍ STERILNÍHO KOMPOSTU	59
	ZÁVĚR	62
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	64
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	67
	SEZNAM OBRÁZKŮ	68
	SEZNAM TABULEK.....	69
	SEZNAM PŘÍLOH.....	70

ÚVOD

Člověk je od nepaměti soutěživý typ, a tak stále hledá cesty, jak nad přírodou zvítězit. A tak postupně dřevo nahradil kamenem, kámen nahradil kovem a nakonec kov nahradil plastem, jehož vlastnosti stále zdokonaluje. S postupem času a vývojem společnosti se lidské nároky zvyšují a tím jsou také zvyšovány nároky na tyto materiály.

V posledních desetiletích jsou syntetické plasty hojně využívány, jakožto obalové materiály pro léčiva, potraviny, kosmetiku, nápojové láhve atd., oděvní průmysl, na výrobu hraček a s rozvíjícím se automobilovým průmyslem našly nezastupitelné postavení i v tomto oboru. V dnešní hektické době se člověk bez plastů nedokáže obejít. Vlastnosti jako jsou voděodolnost, pružnost, pevnost, dlouhá životnost, odolnost vůči oxidaci, izolační schopnosti jsou stále více využívány a vyhledávány.

Člověk si ale postupně začíná uvědomovat, že plasty nemůže jen bezhlavě vyrábět, ale také že musí myslet jak je odstranit po ukončení doby jejich používání. Nejjednodušší možností je jejich uložení na řízenou skládku odpadů, ta ovšem není nafukovací a s ohledem na dnešní produkci velkého kvanta plastů se tato možnost jeví jako nereálná. Další možností je spalování, což ovšem představuje riziko úniku škodlivých látek do ovzduší. Jednou z nejlépe vypadajících možností se jeví jejich recyklace, avšak plastový výrobek bývá často po použití natolik znehodnocen a poškozen, že je jeho recyklace především z technických a hlavně finančních důvodů skoro nemožná.

Počátkem devadesátých let se objevily spekulace o možnosti výroby plastů, které by se po svém „dosloužení“ začaly v životním prostředí působením přítomných organismů v dostatečně krátké době degradovat, a nezanechávaly by žádné škodlivé zbytky. Tyto plasty nesou označení biodegradabilní.

Předmětem studia této diplomové práce budou komerčně se vyskytující biodegradabilní polymery Ecoflex, PBAT a zejména PLA, u nichž bude prováděn experiment biodegradace v prostředí kompostu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOROZLOŽITELNÉ POLYMERY

S pokročilou technologií a rostoucí lidskou populací našly plasty široké uplatnění v lidském životě a průmyslu. Avšak obecně používané plasty, jakož jsou polypropylen, polyetylen, polystyren, polyvinylchlorid a další, jsou v přírodě nerozložitelné a jejich vzrůstající objem v životním prostředí představuje negativní dopad pro naši planetu. Některé kroky řešící tyto problémy byly již podniknuty. Jeden z nich je výroba plastů s vysokým stupněm biodegradability. Tyto biodegradabilní plasty by měly mít dobré vlastnosti (mechanické, zpracovatelské, užitkové), ale hlavně by se měly po ukončení doby svého používání v krátkém čase rozložit v životním prostředí působením mikroorganismů bez zbytku škodlivých reziduí [1].

Biodegradabilní plasty mohou být v závislosti na jejich původu klasifikovány podle:

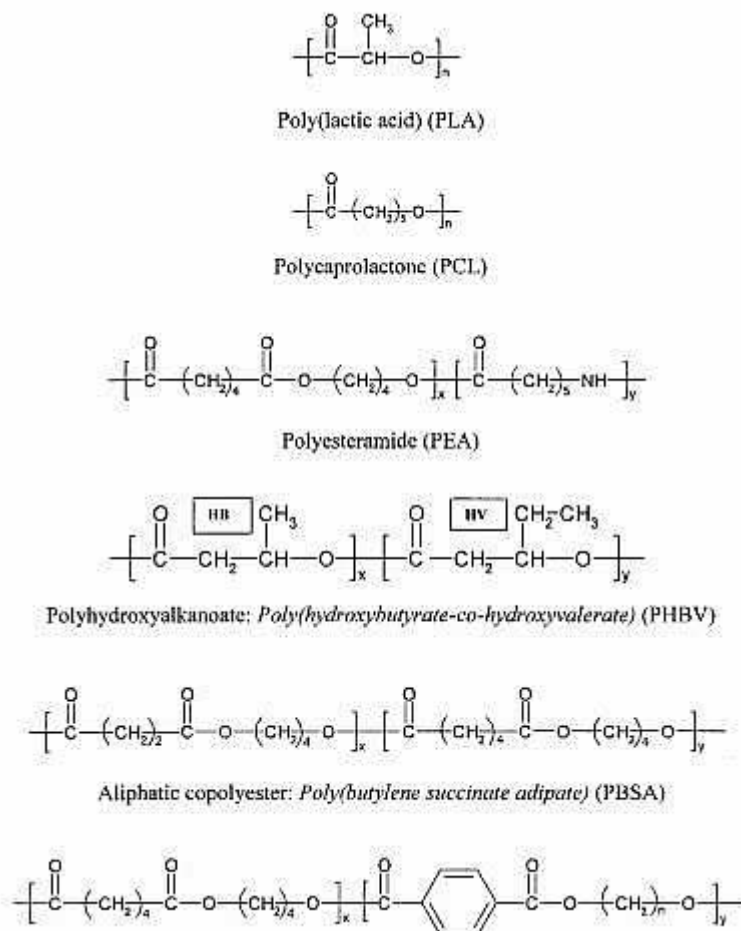
1) biologického původu - jsou většinou rozložitelné v přírodě a pocházejí z přírodních zdrojů (rostliny, zvířata, mikroorganismy) jako například polysacharidy, proteiny a lipidy. Také zde spadají polyestery produkované mikroorganismy nebo syntetizované z „bio“ monomerů (PLA).

2) ropného-fosilního původu - kde patří alifatické polyestery (PCL), aromatické kopolyestery, PVA, které jsou vyráběny syntézou monomerů získaných z petrochemické rafinace a jsou do určité míry biorozložitelné.

Biodegradabilní plasty často tvoří polymerní směs obsahující uhlík jak z obnovitelných zdrojů, tak i ze zdrojů neobnovitelných (fosilních) [2].

Oproti tradičním plastům mají biodegradabilní plasty například výhodu v tom, že zvyšují úrodnost půdy (biorozložitelné fólie na záhony), redukují objem „tradičních“ plastových materiálů v životním prostředí a v neposlední řadě snižují náklady odpadového hospodářství. Taktéž mohou být recyklovány mikroorganismy a jejich enzymy na základní oligomery.

Na obrázku 1. můžeme vidět některé příklady biodegradabilních polymerů.



Obrázek 1. Chemické struktury biodegradabilních polymerů [3]

1.1 Biodegradace polymerů

Charakter biodegradace není závislý na původu surovin, ale na chemickém složení polymerů. Polymer můžeme nazvat biodegradabilním, je-li metabolizován mikroorganismy (bakteriemi, kvasinkami, řasami, houbami) v jejich přírodním prostředí za vzniku energie, biomasy, oxidu uhličitého nebo metanu v daném časovém období. Biodegradace může probíhat v aerobních nebo anaerobních podmínkách.

V aerobních podmínkách za přítomnosti kyslíku a mikroorganismů je organická hmota (uhlíkové řetězce v polymeru) přeměněna na oxid uhličitý, amoniak, sírany, fosforečnany, biomasu, vodu a energii. Za hlavní degradační pochody u aerobní biodegradace se dají označit oxidace a hydrolýza, která je dvojího typu- chemická a biologická. Ta se liší především v katalyzátorech, přičemž chemickou hydrolýzu katalyzují kyseliny či zásady, biologická je katalyzována enzymy a tudíž bývá označována také jako enzymatická.

Při anaerobní biodegradaci za nepřítomnosti kyslíku je organická hmota metabolizována mikroorganismy za vzniku metanu, vody, biomasy a energie. Jednotlivé stupně anaerobní biodegradace jsou: hydrolýza, acidogeneze, acetogeneze a metanogeneze [6],[7].

1.1.1 Mechanismy biodegradace

Většina biodegradabilních polymerů nejsou ve vodě rozpustné. Biodegradace začíná štěpením řetězce enzymy (lipásami, esterásami) vylučovanými mikroorganismy v prostředí. Oligomery, vzniklé štěpením polymerního řetězce jsou poté absorbovány a metabolizovány mikroorganismy, které získávají energii z mineralizačních procesů produkující vodu, biomasu, oxid uhličitý nebo metan. Biodegradční proces nezávisí pouze na aktivitě enzymů, je také ovlivňován vlhkostí, teplotou, světlem a množstvím přítomného kyslíku. Proto je důležité vyzkoušet kombinaci různých faktorů prostředí pro stanovení biodegradace konkrétního polymeru v daném prostředí [4].

1.1.2 Fáze polymerní biodegradace

- Biodeteriorace - vlivem mikroorganismů a/nebo abiotických faktorů dochází k odbourávání polymeru na malé části
- Depolymerizace - působením mikroorganismů a jejich katalytických látek (volné radikály, enzymy) dochází k štěpení polymerních molekul na monomery, oligomery a dimery
- Receptory mikrobiálních buněk rozpoznají molekuly a ty mohou projít přes plazmatickou membránu, kdežto nerozpoznané zůstanou v extracelulárním prostředí
- Asimilace - v cytoplazmě dochází k začlenění transportovaných molekul do metabolismu mikroorganismu, kde nastane produkce energie, nové biomasy a vznik primárních a sekundárních metabolitů
- Mineralizace - metabolity jako jsou CO_2 , CH_4 , N_2 , H_2O a další soli jsou vylučovány do extracelulárního prostředí. [5]

1.1.3 Faktory ovlivňující biodegradabilitu polymerů

Chemické i fyzikální vlastnosti polymerů mají vliv na mechanismus biodegradace. Stav povrchu (hydrofobní a hydrofilní vlastnosti), chemická struktura, molekulová hmotnost, teplota skelného přechodu, bod tání, modul elasticity a krystalická struktura polymerů mají důležitý vliv při biodegradčních procesech. Molekulová hmotnost hraje důležitou roli při tom, zda-li je daný polymer biodegradabilní, poněvadž určuje mnoho fyzikálních vlastností polymeru. Se vzrůstající molekulovou hmotností klesá jeho degradabilita. Kromě toho morfologie polymeru výrazně ovlivňuje jeho rychlost biodegradace. Stupeň krystalinity je zásadní faktor ovlivňující biodegradabilitu, jelikož enzymy hlavně atakují amorfní oblasti polymeru. Molekuly v amorfní části jsou volně poskládané a tak jsou více náchylné k biodegradaci. A naopak krystalická část polymeru je více odolná biodegradaci. Teplota tání polymerů má silný dopad na jejich degradaci. Vyšší teplota tání představuje nižší biodegradaci polymerů. Tabulka 1. nám ukazuje chemickou strukturu alifatického polyesteru, polykarbonátu, polyuretanu a polyamidu a jejich bod tání.

Tabulka 1. Chemické struktury alifatického polyesteru, polykarbonátu, polyuretanu, polyamidů a jejich teploty tání

Název	Struktura	T _m (°C)
Polyester	-O-(CH ₂) ₆ -O-CO-(CH ₂) ₄ -CO-	60
Polycarbonate	-O-(CH ₂) ₄ -O-CO-O-(CH ₂) ₄ -O-CO-	65
Polyurethane	-NH-(CH ₂) ₆ -NH-CO-O-(CH ₂) ₄ -O-CO-	180
Polyamide	-NH-(CH ₂) ₆ -NH-CO-(CH ₂) ₆ -CO-	240
Polyamide	-NH-(CH ₂) ₆ -NH-CO-(CH ₂) ₄ -CO-	265

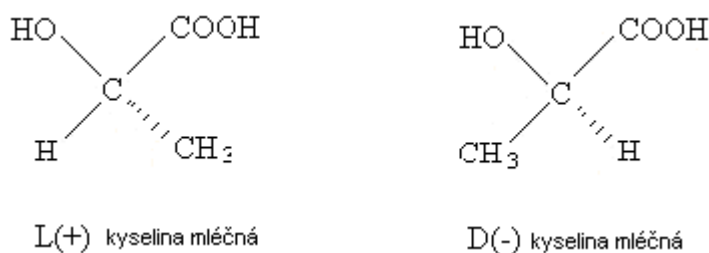
Alifatické polyestery (esterová vazba –CO-O-) a polykarbonáty (karbonátová vazba -O-CO-O-) jsou polymery vlastnící vysoký potenciál pro použití jako biodegradabilní plasty, jelikož jsou náchylné k lipolytickým enzymům a mikrobiální degradaci. Na druhé straně alifatické polyuretany a polyamidy mají vysokou teplotu tání zapříčiněnou přítomností vodíkových vazeb v uretanové (-NH-CO-O-) a amidové vazbě (-NH-CO-) [1].

2 POLYESTERY

2.1 PLA (Polylactic acid)

2.1.1 Struktura

Základní strukturní jednotkou PLA je kyselina mléčná (2-hydroxy propionová kyselina), která existuje ve 2 optických izomerech L+ a D- .



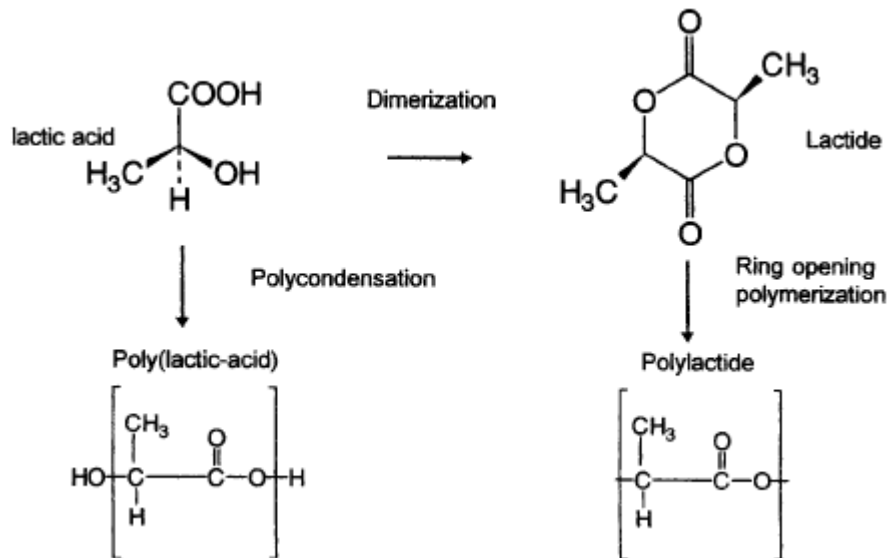
Obrázek 2. Optické izomery kyseliny mléčné [8]

2.1.2 Výroba

Kyselina mléčná je v přírodě běžně se vyskytující kyselina, jenž může být získána chemickou syntézou nebo fermentací. Chemická syntéza mléčné kyseliny je hlavně založená na hydrolýze laktonitrilů silnými kyselinami, která poskytuje pouze racemickou směs L+ a D- kyseliny mléčné. Zájem o produkci kyseliny mléčné fermentací vzrostl z důvodu šetrnosti k životnímu prostředí a používání obnovitelných zdrojů. Kromě vysoké specifčnosti produktu jako je produkce opticky čisté L (+) nebo D (-) kyseliny mléčné, nabízí biotechnologická produkce kyseliny mléčné výhody ve srovnání s chemickou syntézou jako je nižší cena substrátů, nižší reakční teplota a nižší spotřeba energie.

Poly(laktid) a polymléčná kyselina (PLA) mají stejné chemické složení, ale liší se od sebe výrobními postupy. PLA je získávána polykondenzační reakcí z kyseliny mléčné, ovšem s touto nevýhodou, že má nízkou molekulovou hmotnost. Navíc polymerace vyžaduje dlouhou reakční dobu s kombinací s vysokou teplotou. Průkopníkem této metody byl Carothers, který v roce 1932 začal tímto způsobem získávat PLA. Na druhé straně poly(laktid) je získáván tzv. ROP (ring-opening polymerization) procesem u kterého dochází k otevírání laktidového cyklu. Touto metodou je získáván polymer s vyšší molekulovou

hmotností. Jak sem již podotkl, jedná se o tytéž látky a tak se souhrnně označují jako PLA [9].



Obrázek 3. Způsoby přípravy PLA polymeru [10]

2.1.3 Vlastnosti

Konečné vlastnosti jsou ovlivněny poměrem zastoupení L+ a D- formy, které také ovlivňují teplotu skelného přechodu, bod tání, krystalinitu atd. V tabulce 2. můžeme vidět vybrané mechanicko - fyzikální vlastnosti PLA polymeru, který je vyráběn Americko-Japonskou společností Cargill a nesoucí obchodní název Natureworks.

Tabulka 2. Charakteristiky komerčního polymeru PLA [3]

	PLA NatureWorks
Hustota [$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]	1,25
Teplota tání [$^{\circ}\text{C}$]	152
Teplota skelného přechodu [$^{\circ}\text{C}$]	58
Krystalinita [%]	0-1
Biodegradace *	
Mineralizace [%]	100
Propustnost vody [$\text{g}\cdot\text{m}^2\cdot\text{den}$]	172

*- kontrolované kompostování po 60dnů dle normy ASTM 5336

2.1.4 Aplikace

Díky vysoké pevnosti a průhlednosti nachází PLA široké uplatnění v potravinářském průmyslu (obaly na potraviny, sáčky, nápojové láhve, kompostovatelné tašky), v automobilovém průmyslu, v zemědělství (květináče, mulčovací fólie), vlákna pro textilní průmysl (vyšší odolnost proti smáčení, UV záření a snížená hořlavost). Stále častěji také nachází uplatnění v medicínských oborech a to díky jejím dobrým mechanickým vlastnostem, biokompatibilitě, biodegradabilitě, netoxicitě a biosorpci organismem (samovstřebatelné stehy)[11].

2.2 Aromaticko-alifatické kopolyestery

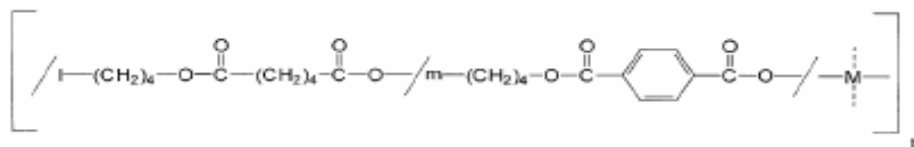
Kopolyesterifikací alifatických a aromatických monomerů lze do jisté míry kombinovat dobrou biodegradabilitu alifatických polyesterů s dobrými mechanickými vlastnostmi aromatických polyesterů. Aromaticko - alifatické kopolyestery jsou získávány polykondenzačními reakcemi alifatických kyselin (kyselina adipová), aromatických dikarboxylových

kyselin (kyselina tereftalová) s alifatickými glykoly (1,4-butandiol). Nejznámějším aromaticko-alifatickým kopolyesterem je Ecoflex, vyráběn firmou BASF od roku 1998 [4].

2.2.1 Ecoflex

Struktura

Ecoflex je aromaticko-alifatický kopolyester skládající se z kyseliny tereftalové, kyseliny adipové a 1,4-butandiolu.



Obrázek 4. Chemická struktura aromaticko-alifatického kopolyesteru Ecoflex [12]

Vlastnosti

Mechanické vlastnosti Ecoflexu se dají srovnat s vlastnostmi nízkohustotního polyetyleny (LDPE). Filmy z Ecoflexu jsou odolné proti roztržení, jsou flexibilní, odolné proti kolísání vlhkosti, proti vodě a jsou prodyšné díky své propustnosti vodních par. V tabulce 3 lze vidět základní vlastnosti materiálu Ecoflex.

Tabulka 3. Základní vlastnosti materiálu Ecoflex

Vlastnost	Jednotka	Ecoflex
Hustota	[g*cm ⁻³]	1,25-1,27
Bod tání	[°C]	110-115
Teplota skelného přechodu	[°C]	-30
Průhlednost	[%]	82
Propustnost kyslíku	[cm ³ *m ⁻² *d ⁻¹ *bar ⁻¹]	1600

Aplikace

- Kompostovatelné tašky na organický odpad - organický odpad může být kompostován společně s taškou, jelikož Ecoflex dodržuje podmínky pro kompostovací pytle, jako jsou odolnost proti vlhku a čas, po který zůstává stabilní vůči organickému odpadu.
- Mulčovací fólie - použití mulčovacích fólií vede k rychlejší sklizni, vyšším výnosům a lepší kvalitě úrody. Výhoda použití fólií z materiálu Ecoflex spočívá v tom, že po sklizni úrody mohou být společně se zbytky plodin zaorány do půdy, kde se částečně rozloží.
- Potahované nebo laminátové materiály - zde nachází Ecoflex využití jako obaly na nápoje, zmrzlé potraviny atd., které se po použití mohou bez problémů zlikvidovat kompostováním (s dodržением podmínek kompostování).
- Fólie na balení potravin - po přidavku speciálních přísad a optimalizováním výrobních podmínek, lze vyrábět průhledné fólie, jenž slouží k balení potravin, masa, zeleniny či ovoce v obchodech .
- Ecoflex s kombinací biologicky rozložitelných příměsí (kukuřičný nebo bramborový škrob, PLA) tvoří vhodný obalový materiál, který se po použití dá v kompostu kompletně biologicky rozložit [13].

3 STUDIE ZABÝVAJÍCÍ SE BIODEGRADABILITOU PLA

V práci [14] se zabývali izolací termofilní bakterie rozkládající PLA. Vzorek PLA byl ve formě 50 μm tenkého filmu s průměrnou molekulovou hmotností $47000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ dodaný firmou Shimadzu, jenž byl před použitím opláchnutý 70 % etanolem a ozářen pod UV. Láhve obsahující 5 ml sterilního minerálního média a 25 mg filmu PLA byly postupně smíchány s 153 vzorky půd z oblasti Kanagawa (Japonsko) a kultivovány při 60 °C po dobu 1 týdne v rotačním zařízení při 120 ot./min. Růst buněk byl monitorován a měřen při absorbanci 660 nm na Shimadzu UV 2200 spektrofotometru. Byl izolován jeden bakteriální kmen, který projevoval největší růst a ten byl dále aplikován na degradaci PLA. PLA byla zřetelně degradována kmenem 41, který je blízký druhu *Geobacillus thermocatenulatus*, jehož optimální teplota růstu je 60 °C. Byla by to první termofilní bakterie rozkládající PLA patřící do rodu *Geobacillus*.

V článku [15] autoři popisují závislost teploty na mineralizaci PLA. K analýze biodegradace vysokomolekulární PLA ($120000\text{-}200000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) použili respirometrické zařízení. Láhve s obsahem 200 g homogenizované půdy a 1,5 g filmu PLA byly umístěny do vodní lázně s teplotou 28, 40 a 55 °C po 182 dní. Byly použity vzorky kukuřičného škrobu (pozitivní kontrola), polyetylen (negativní kontrola) a 3 druhy filmu PLA. Celková mineralizace vzorků 1 a 2 (oba jsou jednovrstvé filmy PLA) při 28 °C po 182 denní inkubaci byla 17 a 20%. Při 40 °C po 182 dnech inkubace byla mineralizace 25 a 26 %. Při 55 °C nastal drastický nárůst mineralizace přičemž u vzorku 1 šlo o 60% mineralizaci a u vzorku 2 o 65 % mineralizaci. U vzorku 3 (třívrstvý film PLA) byla mineralizace při teplotách 28 a 40 °C podobná jako u vzorků 1 a 2, na druhé straně při teplotě 55 °C nastal nárůst mineralizace až na 85 %. Rychlejší mineralizace 3 vzorku mohla být ovlivněna odlišnými vlastnostmi vnějších vrstev filmu PLA (více citlivé na nárůst teploty). Mineralizace filmu PLA v podmínkách kompostu, který udržuje vyšší teplotu (>50°C) a vlhkost (>50 %) je očekávána rychlejší než při 28 °C (půda v tropických oblastech).

Urychlené biodegradaci PLA se věnovali v článku [16]. Urychlená biodegradace byla zkoumána z důvodu limitovaného počtu mikroorganismů v daném prostředí schopných degradovat PLA. Autoři zjistili, že degradace vysokomolekulárního filmu PLA ($130000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) byla urychlena po přidavku 0,1 hmot.% želatiny do testovaného vzorku s mikroorganismy. 95 ze 100 mg vzorku filmu PLA bylo během 4 denní kultivace při 30 °C degradováno kmeny *Tritirachium album* (eukaryotické mikroorganismy) a *Saccharothrix wayandensis* (prokaryotické mikroorganismy). Také byly objeveny další přírodní látky-peptidy, proteiny a aminokyseliny vyvolávající produkci enzymů mikroorganismů degradujících PLA a následkem toho urychlují degradaci PLA. *Tritirachium album* je jediný eukaryotický mikroorganismus schopný degradovat PLA.

Jak jsem již předesílal, mikroorganismy degradující PLA se v přírodním prostředí v hojném počtu nevyskytují a z toho důvodu PLA málo podléhá mikrobiálnímu ataku než některé ostatní alifatické polyestery. Touto problematikou se zabývala práce [17], ve které autoři testovali degradaci PLA vlivem bakterie *Bacillus licheniformis*. Kmen *Bacillus licheniformis* byl izolován z kompostu a skladován v 20 % etanolu při -80 °C než byl použit. PLA byla ve formě dvou tenkých filmů a po sterilizaci pod UV vložena do Erlenmeyerových láhví se sterilním živným médiem a inokulována *Bacillus licheniformis* a inkubována ve tmě při 32 °C po 5 měsících. Po této době šel u vzorků PLA pozorovat 60 % úbytek původní hmotnosti, to dokazuje, že bakterie *Bacillus licheniformis* je schopná biodegradovat PLA při 32 °C.

Článek [18] se zabývá izolací mezofilní bakterie degradující PLA. Je pouze malé množství izolovaných bakterií schopných degradace PLA. Patří mezi ně: *Bacillus brevis*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus licheniformis* a *Paenibacillus amylolyticus*. První čtyři se řadí mezi termofilní bakterie a pouze poslední náleží do skupiny mezofilních bakterií. Mezofilní bakterie jsou více použitelné pro degradaci PLA v přírodním prostředí než bakterie termofilní a to z důvodu teplotních podmínek vyskytující se v okolním prostředí, zejména v půdách a kompostech.

Z 60-ti vzorků půdy z různých míst v Koreji byly izolovány Gram-negativní tyčinkovité bakterie patřící do kmene *Bordetella petrii*. Tato bakterie byla v podmínkách kom-

postu schopná degradovat jak nízkomolekulární PLA, tak i vysokomolekulární PLA. Dokazují to výsledky, kdy při 37 °C za 40 dnů biodegradace v kompostu byla schopná zmineralizovat 68, 54 a 37 % uhlíku ze vzorků PLA (ve formě prášku) o molekulové hmotnosti 5000, 1100 a 34000 g* mol^{-1} . Ve stejné době a za stejných podmínek zmineralizovala 19 % uhlíku ze vzorku PLA (ve formě 0,2mm filmu) o molekulové hmotnosti 256000 g* mol^{-1} . Dále v této práci došli k závěru, že míra biodegradace klesá s rostoucí krystalinitou PLA, avšak nejen amorfní část PLA, ale i krystalická část PLA byla atakována mikrobiálními enzymy bakterie *Bordetella petrii*.

Autoři v článku [19] zkoumali biodegradaci PLA v podmínkách aerobního a anaerobního prostředí v závislosti na rozdílných teplotách. Pro aerobní podmínky byl použit vzorek PLA (molekulová hmotnost 88000 g* mol^{-1}) ve formě granulí. Aerobní biodegradace byla studována ve 120 ml láhvích obsahujících 10 mg vzorku PLA, 50 ml minerálního solného roztoku a 0,5 ml mikrobiálního inokula. Vzorky byly inkubovány při konstantních teplotách 25, 37, 55 a 60 °C v rotační třepačce při 120 ot./min bez přístupu světla. Množství vyprodukovaného CO₂ v plynné fázi bylo měřeno infračerveným analyzátozem Servomex PA 404. V aerobních podmínkách a při teplotách 25 a 37 °C bylo za 210 dní vyprodukováno pouze 10% teoretického množství CO₂. Kdežto při teplotě 60 °C byla mineralizace největší, kdy dosahovala hodnoty 90 % během 120 dnů. Před nástupem mineralizační fáze byla pozorována lagová fáze kolem 40 dnů při teplotách 55 a 60 °C. Při anaerobní biodegradaci byl použit vzorek PLA ve formě filmu. Anaerobní biodegradace při 55 °C probíhala rychleji než při 37 °C, stejně tak, jak tomu bylo i při aerobní biodegradaci. Ale v porovnání mezi sebou probíhala mineralizace rychleji v podmínkách anaerobních, kdy při 37 °C byla mineralizace uhlíku 60 % za 100 dní a při teplotě 55 °C byla 60 % za 40 dní, což může být zapříčiněno tím, že kyselina mléčná je vhodnější substrát pro anaerobní mikroorganismy, než pro aerobní mikroorganismy. Výsledky dokládají, že teplota je klíčový parametr ovlivňující biodegradaci PLA.

V práci [20] se zabývali biodegradací polymerů v prostředí kompostu pomocí respirometrického systému, sestaveného dle normy ASTM D5338. Testovaný materiál zde byl použit PLA, pro negativní kontrolu byl použit PET a škrobový prášek byl použit pro pozitivní kontrolu. Do bioreaktorů bylo PLA a PET dáno ve formě 1cm x 1cm velkých částic. Respirometrický systém běžel po dobu 63 dnů při teplotě 58 °C a relativní vlhkosti 55 %. Po tuto dobu se PLA rozložila z $64,2 \pm 0,5$ %, PET z $2,7 \pm 0,2$ % a škrobový prášek z $72,4 \pm 0,7$ %. Můžeme tedy vidět značný rozdíl v biodegradaci PLA a PET.

V článku [21] je sledována biodegradace PCL a PLA v prostředí kompostu pomocí MODA analyzátoru, který splňuje požadavky dle ISO 14855-2. Testovaný materiál PLA byl dodán v různých formách (kuličky, filmy o tloušťce 25 μm , vratné kelímky). Cíl této práce byl sledovat stupně rozkladu testovaných materiálů v závislosti na jejich různých velikostech a tvarech. U prášku připraveného mechanickým rozrušením PLA kuliček byla prokázána závislost rychlosti rozkladu na velikosti částic. Ukázalo se, že prášek s velikostí částic v rozmezí 0-125 μm se rozkládal 2 x rychleji než prášek s velikostí částic v rozmezí 250-500 μm . I přes to se do 50 dnů všechny velikosti částic prášku rozložili z 80%.

U PLA kelímků byl prokázán vliv tvaru vzorku na rychlosti biodegradace polymeru v kompostu. Byl připraven prášek mechanickým rozrušením PLA kelímků a další forma byly nastříhané plátky o velikosti stran 1cm x 1cm. Prášek byl za 30 dnů rozložen přibližně z 80 %, kdežto plátky potřebovaly 100 dnů na to, aby byly rozloženy z 80 %.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce je uskutečnit experiment se vzorky PLA o různé molekulové hmotnosti, porovnat biodegradabilitu těchto vzorků v prostředí kompostu a ověřit, zda lze biodegradabilitu ovlivnit vhodným poměrem nízko a vysokomolekulárního PLA. Snahou je zjistit, zda přítomnost nízkomolekulární PLA má vliv na délku lagové fáze při biodegradaci vysokomolekulární PLA.

Navrhnout a experimentálně ověřit metodiku pokusu, kterým by bylo možno prokázat biodegradaci polymerního materiálu čistým bakteriálním kmenem izolovaným z prostředí kompostu.

5 ŽIVNÁ MÉDIA, ROZTOKY K JEJICH PŘÍPRAVĚ, PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

5.1 Roztoky

Zásobní roztoky použité na přípravu minerálního média

Roztok A

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 9 g KH_2PO_4 a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok B

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 24 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 1 l roztoku bylo naváženo 1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok D

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 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 1 l roztoku bylo naváženo 10 g $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok F

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 50 g NaCl a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok G

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 30 g NH_4Cl a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Roztok stopových prvků

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo:

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

Všechny navážky byly doplněny destilovanou vodou a důkladně promíchány.

Minerální médium

Minerální médium se používá jako zdroj mikrobiogenních, makrobiogenních a stopových prvků potřebných pro životní pochody mikroorganismů.

Pro přípravu 100 ml minerálního média bylo použito:

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

Jednotlivé roztoky byly smíchány a doplněny destilovanou vodou na požadovaný objem. Pak byly sterilizovány v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 minut.

Fyziologický roztok:

Pro přípravu 1 l roztoku bylo naváženo 8,5 g NaCl a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem. Po promíchání roztoku byla provedena sterilizace v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 minut.

Suspendační médium

Na přípravu 100 ml suspenčního média bylo použito:

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

Tyto látky byly smíchány, doplněny destilovanou vodou na požadovaný objem a následně sterilizovány v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 minut.

Suspendační médium se používá k převedení mikroorganismů např. z půdy nebo kompostu do roztoku.

YEME médium

Na přípravu 100 ml média bylo použito:

Kvasničný extrakt.....	0,3 g
Maltosový extrakt.....	0,3 g
Pepton.....	0,3 g
Glukosa.....	10 g
Sacharosa.....	34 g
Glycin.....	0,05 g
MgCl ₂	0,095 g

Tyto látky byly smíchány, doplněny destilovanou vodou na požadovaný objem a sterilizovány při teplotě 125 °C po dobu 30 minut.

TYA médium

Na přípravu 100 ml média bylo použito:

Kvasničný extrakt.....	0,3 g
Trypton extrakt.....	0,6 g

Obě látky byly smíchány, doplněny destilovanou vodou na požadovaný objem a sterilizovány při teplotě 125 °C po dobu 30 minut.

5.2 Tuhé živné půdy

TYA agar (Tryptone yeast agar)

TYA agar je univerzální živná půda používaná pro kultivaci a stanovení celkového počtu mikroorganismů z daného vzorku.

Na přípravu 100 ml živné půdy bylo naváženo 2,1 g TYA agaru. Po řádném rozmíchání ve 100 ml destilované vody byla provedena sterilizace v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 minut. Následně po ochladnutí byla živná půda v aseptickém boxu rozlita na Petriho misky.

Actinomycete isolation agar

Pro přípravu 100 ml živné půdy bylo použito:

Powder agar.....	2,2 g
$C_3H_5(OH)_3$	0,5 ml

Složky byly smíchány a doplněny destilovanou vodou na požadovaný objem a sterilizovány při teplotě 125 °C po dobu 30 minut. Následně po ochladnutí byla živná půda v aseptickém laminárním boxu rozlita na Petriho misky.

Agar s polymerem

Pro přípravu 100 ml živné půdy bylo naváženo 2,2 g Powder agaru, 4 mg kvasničného autolyzátu, vše důkladně rozmícháno ve 100 ml minerálního média a pak bylo přidáno 20 ml příslušného roztoku polymerních submikročástic. Poté byla provedena sterilizace při teplotě 125 °C po dobu 30 minut. Následně po ochladnutí byla živná půda rozlita v aseptickém laminárním boxu na Petriho misky.

V mojí diplomové práci byly připraveny 3 agary s polymery PLA, PBAT a Ecoflex.

5.3 Použité kmeny mikroorganismů degradující daný polyester

Kmen **FTPLA** - degradující PLA, vykazuje 99 % podobnost kmeni *Thermopolyspora flexuosa* DSM 43186

Kmen **FTPBAT** - degradující PBAT a Ecoflex, vykazuje 99 % podobnost kmeni *Thermomonospora curvata* JCM 3096

Oba kmeny byly získány z diplomové práce V. Piše [11].

5.4 Použité polymerní materiály

PLA - vysokomolekulární, dále jen V_PLA, dodaná firmou NatureWorks. Hodnota molekulové hmotnosti 160000 g·mol⁻¹. Obsah uhlíku 50,0 % [22].

PLA - nízkomolekulární, dále jen N_PLA, byla syntetizována ve spolupráci s laboratoří Centra polymerních materiálů ve Zlíně ve skupině vedenou ing. Vladimírem Sedlaříkem, Ph.D. Hodnota molekulové hmotnosti 34000 g·mol⁻¹.

PBAT - poskytnutý partnerským pracovištěm Blaise Pascal University, Francie (výrobce IRe Chemical Ltd. Korea). Obsah uhlíku 62,5 % [22].

Ecoflex - dodán firmou BASF spol. s.r.o. ve formě bílých granulí. Obsah uhlíku 62,4 % [22].

Z daných materiálů byly ing. Petrem Stloukalem připraveny jednotlivé formy zkoušených materiálů.

5.4.1 Příprava roztoků polymerních submikročástic

Tyto roztoky byly připraveny pro všechny druhy zkoumaných polymerních materiálů a to pro PLA, PBAT a Ecoflex.

Dodaný polymerní materiál Ecoflex se rozpustil v chloroformu. Navážka polymerního materiálu Ecoflex byla taková, aby výsledná koncentrace roztoku byla $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Poté se tento připravený roztok smísil s 0,5 % roztokem PVA v poměru 1:4. Oba roztoky za současného chlazení ledem byly 5 minut homogenizovány. Následně byla směs přelita do odsávací baňky, která se uzavřela. Za současného míchání a při sníženém tlaku docházelo k odtahu rozpouštědla skrz vývěvu. Až došlo k odstranění veškerého rozpouštědla, nechal se roztok opět centrifugovat. Poté byl roztok přelit do válce, homogenizován a znovu centrifugován. Konečný roztok polymerních submikročástic Ecoflexu byl následně použitý pro přípravu agarů s polymerem.

Podobným způsobem byly připraveny roztoky submikročástic polymerů PLA a PBAT.

5.4.2 Příprava práškových forem použitých polymerních materiálů

Prášková forma vzorku V_PLA byla připravena pomocí vysrážení. Dodaný materiál V_PLA byl rozpuštěn v chloroformu a to v koncentraci 12,5 mg/ml. Poté do roztoku V_PLA v chloroformu byl z byrety přikapáván nadbytek etanolu ve dvou a půl násobném množství a to celé bylo mícháno vysokorychlostním míchadlem. Po vzniku sraženiny byla směs přefiltrována, několikrát promyta etanolem a nechala se stát po 24 hodin v digestoři z důvodu vytékání rozpouštědla a vysušení vzniklého prášku.

Podobným způsobem byly připraveny práškové formy polymerních materiálů N_PLA, PBAT a Ecoflex.

5.5 Další materiály použité v biodegradačních testech

Jako substrát byl použit vyzrálý kompost identický s prací Vladimíra Piše [11].

V biodegradačních testech byla jako referenční látka použita mikrokrystalická celuloza (Sigma).

Jako pomocný materiál (zadržování vlhkosti, provzdušnění směsi, pórovitost směsi) byl v biodegradačních testech použit perlit, vyroben společností AGRO CS a.s. pod názvem Agroperlit. Před použitím byl sterilizován v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 minut.

5.6 Použité přístrojové vybavení

- Plynový chromatogram Agilent 7890, USA
- Analytické váhy KERN 770, Německo
- Laboratorní váhy Kern EW 1500-2M, Německo
- Centrifuga Rotanta 460 R
- Laboratorní autokláv LAM-3-20-MCS-J Sonoclav, Německo
- Elektrická laboratorní pec LH09MT
- Třepačka Promax 1020, Německo
- Aseptický laminární box Telstar Bio II A, Španělsko
- Elektrická sušárna UM 100, Německo
- Mikrodávkovače Biohit, Finsko
- Plynotěsná injekční stříkačka Hamilton 100 μ l, USA
- Chladnička Ardo, Česká republika
- Termostat Memmert, Německo

Dále bylo použito běžně využívané laboratorní sklo a pomůcky.

6 METODIKA A PRACOVNÍ POSTUPY

6.1 Charakteristika kompostu

U vyzrálého kompostu byla sledována sušina a spalitelný podíl.

6.1.1 Stanovení sušiny kompostu

Do vysušené a předem zvážené misky byl s přesností $\pm 0,0001$ g navážen na analytických vahách kompost. Sušení probíhalo v elektrické sušárně při teplotě $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ do konstantní hmotnosti. Po vysušení byla miska s kompostem vložena do exsikátoru, a po vychladnutí na laboratorní teplotu byla zvážena. Stanovení bylo provedeno 3x vedle sebe. Dle rovnice 1 byla vypočtena sušina kompostu v procentech.

$$\begin{aligned}
 S_1 &= \frac{m_{MVK1} - m_{M1}}{m_{MK1} - m_{M1}} \cdot 100 \\
 S_2 &= \frac{m_{MVK2} - m_{M2}}{m_{MK2} - m_{M2}} \cdot 100 \\
 S_3 &= \frac{m_{MVK3} - m_{M3}}{m_{MK3} - m_{M3}} \cdot 100 \\
 S &= \frac{S_1 + S_2 + S_3}{3}
 \end{aligned} \tag{1}$$

Kde:

S	průměrná hodnota sušiny kompostu	[%]
$S_{1,2,3}$	hodnoty sušin v jednotlivých stanoveních	[%]
$m_{M1,2,3}$	hmotnosti prázdných misek	[g]
$m_{MK 1,2,3}$	hmotnosti misek s naváženým kompostem	[g]
$m_{MVK 1,2,3}$	hmotnosti misek s naváženým vysušeným kompostem	[g]

6.1.2 Stanovení spalitelného podílu kompostu

Po stanovení sušiny byla miska s vysušeným kompostem vložena do pece a žíhána při teplotě 550 °C po dobu 2 hodin. Po vychladnutí v exsikátoru na laboratorní teplotu byla miska zvážena. Stanovení bylo provedeno 3x vedle sebe. Dle rovnice 2 byl vypočten spalitelný podíl kompostu v procentech.

$$\begin{aligned}
 S_{P1} &= \frac{m_{MVK1} - m_{MS1}}{m_{MK1} - m_{M1}} \cdot 100 \\
 S_{P2} &= \frac{m_{MVK2} - m_{MS2}}{m_{MK2} - m_{M2}} \cdot 100 \\
 S_{P3} &= \frac{m_{MVK3} - m_{MS3}}{m_{MK3} - m_{M3}} \cdot 100 \\
 S_P &= \frac{S_{P1} + S_{P2} + S_{P3}}{3}
 \end{aligned} \tag{2}$$

Kde:

S_P	průměrná hodnota spalitelného podílu	[%]
$S_{P1,2,3}$	hodnoty spalitelného podílu v jednotlivých stanoveních	[%]
$m_{M1,2,3}$	hmotnosti prázdných misek	[g]
$m_{MVK 1,2,3}$	hmotnosti misek s vysušeným kompostem	[g]
$m_{MS 1,2,3}$	hmotnosti misek se spáleným kompostem	[g]

6.2 Porovnání biodegradace nízkomolekulární a vysokomolekulární PLA pomocí stanovení uvolněného CO₂

6.2.1 Biometrická láhev

500 ml skleněná láhev o objemu plynné fáze 580 ml byla použita jako bioreaktor. Každá láhev byla opatřena uzávěrem s otvorem se septem pro odběr plynné fáze. Před vlastním pokusem byly láhve umyty a sterilizovány v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 minut. Uzávěry byly sterilizovány pod UV zářením v aseptickém laminárním boxu po dobu 20 minut.

6.2.2 Příprava bioreaktoru

Obsah bioreaktoru

- 5,00 g vlhkého kompostu (7,97 g sušiny půdy)
- 0-50 mg N/V_PLA
- 5,00 g perlitu
- 5,0 ml minerálního média

Navážka testované látky a celulosy byla navážena na analytických vahách s přesností $\pm 0,0001$ g a navážka kompostu a perlitu na vahách s přesností $\pm 0,01$ g. Byly připraveny 3 paralelní láhve, kde každá obsahovala směs PLA, tvořenou 100 hmot.% V_PLA a 0 hmot.% N_PLA, 3 láhve obsahující 95 hmot.% V_PLA a 5 hmot.% N_PLA, 3 láhve obsahující 90 hmot.% V_PLA a 10 hmot.% N_PLA, 3 láhve obsahující 80 hmot.% V_PLA a 20 hmot.% N_PLA a 3 láhve obsahující 0 hmot.% V_PLA a 100 hmot.% N_PLA. Složení jednotlivých láhví lze vidět v tabulce 4.

Dále byly připraveny 4 slepé pokusy se stejným složením, ale nebyl do nich přidán vzorek PLA. 4 láhve s mikrokrystalickou celulosou jako pozitivní kontrola byly připraveny stejným způsobem.

Všechny láhve byly umístěny do termostatu s udržovanou teplotou 58 °C a přibližně v jednotýdenních intervalech byl analyzován obsah vyprodukovaného CO₂ a spotřebovaného O₂.

Tabulka 4. Obsah jednotlivých láhví při biodegradačním pokusu

Označení láhve	Navážka kompostu [g]	Navážka perlitu [g]	Minerální médium [ml]	V_PLA [mg]	N_PLA [mg]
100V+0N	5,00	5,00	5,0	50,00	0
95V+5N	5,00	5,00	5,0	47,00	2,50
90V+10N	5,00	5,00	5,0	45,00	5,00
80V+20N	5,00	5,00	5,0	40,00	10,00
0V+100N	5,00	5,00	5,0	0	50,00

6.2.3 Analýza CO₂ a O₂ pomocí plynové chromatografie

Stanovení množství vyprodukovaného CO₂ a spotřebovaného O₂ při mineralizaci testované látky v bioreaktoru bylo prováděno na plynovém chromatografu Agilent 7890. Vyprodukované množství CO₂ nám slouží kde stanovení míry biodegradace testované látky a množství spotřebovaného O₂ nám slouží k hodnocení respirační aktivity mikroorganismů přítomných v bioreaktoru.

Námi používaný plynový chromatograf Agilent 7890 má v termostatu umístěné 2 náplňové sériově zapojené skleněné kolony o délce 1,829 m. Na první koloně, kde byl jako náplň použit Porapak Q s velikostí částic 80/100 MESH, dochází ke stanovení CO₂. Na druhé koloně s molekulovým sítem 5A s velikostí částic 60/80 MESH, dochází ke stanovení O₂.

Analýza vzorku je započata po nástřiku 100 µl vzorku. V čase 0,5 minut došlo k přepnutí ventilu na Porapak Q, na kterém se stanoví CO₂. V čase 1,5 minut došlo k přepnutí ventilu na 2.kolonu, na které se stanoví O₂. Jako nosný plyn sloužilo helium čistoty 4.6. K přepínání ventilů sloužil dusík, který byl přiváděn z láhve se stlačeným vzduchem. V tabulce 5 jsou uvedeny základní pracovní parametry plynového chromatografu Agilent 7890.

K detekci složek sloužil tepelně vodivostní detektor (TCD). S využitím programu GC Chemstation metodou přímé kalibrace došlo k vyhodnocení signálu. Pro stanovení množství CO₂ byla kalibrační křivka sestavena z analýzy syntetického plynu Linde Technoplyn. Ke stanovení kalibrační křivky pro O₂ byl změřen vzorek vzduchu.

Tabulka 5. Parametry plynového chromatografu Agilent 7890

Parametry		Analýza
Teplota [°C]	Injektor	200
	Termostat	60
	TCD detektor	250
Nosný plyn	Typ	Helium
	Průtok [ml/min]	53
Přepínání ventilů	Čas [min]	0,5
		1,5
	Plyn	Vzduch, N ₂

6.2.4 Provzdušňování

Po analýze obsahu CO₂ a O₂ v bioreaktoru se nechaly biometrické láhve 20 minut provzdušňovat pomocí gumových hadiček napojených na čerpadlo. Nejprve vzduch procházel přes 5M NaOH, kde docházelo k odstranění atmosférického CO₂ (viz. rovnice 3). Poté vzduch přecházel roztokem 0,25 M Ba(OH)₂, z důvodu kdyby došlo k vyčerpání roztoku NaOH, a následně přes láhev s destilovanou vodou, pomocí níž se vzduch zvlhčoval.



6.2.5 Zpracování naměřených dat

Zpracování naměřených dat byly použity následující vzorce [23] :

Denní produkce uhlíku ve formě CO₂

$$m_{(d)C} = \frac{M_C * p}{R * T} * \frac{V_g}{1000} * w(CO_2) * \frac{V_{St}}{S_{St}} * \frac{S_{Vz}}{V_{Vz}} * 1000 \quad (4)$$

Kde:

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

Kumulativní produkce uhlíku ve formě CO₂

Zda-li nedochází k provzdušňování testovacích láhví, je kumulativní produkce rovna produkci denní. Ovšem je-li systém provzdušňován, je kumulativní produkce uhlíku ve formě CO₂ dána vztahem:

$$m_{(k)C}(2) = m_{(k)C}(1) + m_{(d)C}(2) \quad (5)$$

Kde:

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

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

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

Substrátová produkce uhlíku ve formě CO₂

Jde o kumulativní produkci ze systému se vzorky sníženou o produkci uhlíku ze slepých pokusů, tj. o produkci ze samotného kompostu.

$$n_{(s)C} = m_{(k)CVz} - m_{(k)CSI} \quad (6)$$

Kde:

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

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

$m_{(k)CSI}$ kumulativní produkce uhlíku z láhve bez vzorku [mg]

Procentuelní mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO₂

$$D_C = \frac{n_{(s)C}}{m_C * TC} \quad (7)$$

Kde:

D _C	procentuelní mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO ₂	[%]
n _{(s)C}	substrátová produkce uhlíku ve formě CO ₂	[mg]
m _C	hmotnost testovaného materiálu	[mg]
TC	obsah celkového uhlíku v testovaném materiálu	[%]

Procentuelní obsah O₂ v láhvi

$$\%O_2 = \frac{w(O_2) * S_{Vz} * V_{St}}{S_{St} * V_{Vz}} \quad (8)$$

Kde:

%O ₂	aktuální procento O ₂ obsaženo v láhvi	[%]
w(O ₂)	obsah kyslíku ve vzduchu	[%]

6.3 Pomnožení kmene mikroorganismů degradující daný polyester

Byly připraveny láhve o následujícím složení:

- 18,0 ml minerálního média
- 2,0 ml roztoku polymerních submikročásteček (PLA, PBAT, Ecoflex)
- 100 μ l kvasničného autolysátu (10 mg/ml)

Po sterilizaci při teplotě 125 °C po dobu 30 minut byly jednotlivé láhve zaočkovány kmenem FTPLA degradující PLA a kmenem FTPBAT degradující PBAT a Ecoflex a umístěny na třepačku do vodní lázně s udržovanou teplotou 58 °C.

6.4 Biodegradace N_PLA, PBAT a Ecoflexu čistým kmenem mikroorganismů

Do biometrické láhve o objemu 500ml se připravila následující směs:

- 5,00 g vlhkého kompostu (7,97 g sušiny vzorku)
- 5,00 g perlitu
- 5,0 ml minerálního média

Následovala sterilizace v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 minut. Poté bylo přidáno:

- 50 mg zkoumaného polyesteru (N_PLA, PBAT, Ecoflex) sterilizovaného 20 minut pod UV zářením
- 200 μ l kmene FTPBAT (degradující PBAT a Ecoflex) a 200 μ l kmene FTPLA degradující PLA suspendovaného v 1 ml fyziologického roztoku.

Navážka zkoumaného polyesteru byla navážena na analytických vahách s přesností $\pm 0,0001$ g. Navážka kompostu a perlitu byla navážena na vahách s přesností $\pm 0,01$ g.

Celkem byly připraveny 3 paralelní série po 3 lahvích v každé sérii se zkoumaným polyesterem.

Rovněž byly připraveny 3 láhve se slepými pokusy bez přítomnosti zkoumaného polymeru a nezaočkované kmenem degradující daný polymer. Takto připravené láhve byly uloženy do termostatu s udržovanou teplotou 58 °C a přibližně v jednotýdenních interva-

lech byl analyzován vyprodukovaný CO₂ a spotřebovaný O₂ pomocí plynového chromatografu.

6.5 Pomnožení kmene mikroorganismů degradující daný polyester v různých tekutých médiích

Do láhve o objemu 250 ml byla přidána směs obsahující:

- 25 ml YEME média / 25 ml TYA média (složení viz. 5.1)
- 2 ml roztoku polymerních submikročásteček N_PLA / PBAT,

Poté byla láhev zaočkována kmenem mikroorganismů degradující daný polymer, získaným z diplomové práce V. Piše [11]. Po opatření láhve míchadlem byla láhev uzavřena a umístěna na míchací zařízení (750 otáček za minutu) do vodní lázně s udržovanou teplotou 58 °C. Ve dvoudenních intervalech byla láhev provzdušněna otevřením v aseptickém laminárním boxu po dobu 15 minut.

6.6 Biodegradace N_PLA čistým kmenem mikroorganismů degradující daný polymer v prostředí sterilního kompostu

Před započítáním pokusu bylo nutné sterilizovat kompost, což bylo provedeno v následujícím cyklu:

- Sterilizace při teplotě 125 °C po dobu 30 minut
- Inkubace 4 dny při teplotě 58 °C
- Sterilizace při teplotě 125 °C po dobu 30 minut

Tento cyklus byl proveden 3x za sebou.

Následně byly připraveny 3 série, přičemž každá série obsahovala 3 láhve.

Složení láhví v 1. sérii bylo následující:

- 5,00 g sterilního kompostu (7,79 g sušiny vzorku)
- 5,00 g perlitu
- 5,0 ml minerálního média

Složení láhví v 2. sérii:

- 5,00 g sterilního kompostu (7,79 g sušiny vzorku)
- 5,00 g perlitu
- 5,0 ml minerálního média
- 100 mg N_PLA

Složení láhví v 3. sérii:

- 5,00 g sterilního kompostu (7,79 g sušiny vzorku)
- 5,00 g perlitu
- 5,0 ml minerálního média
- 100 mg N_PLA
- Zaočkováno čistým kmenem FTPLA (degradující daný polyester) suspen-dovaným v minerálním médiu. Zaočkování proběhlo po sterilizaci.

Navážky N_PLA byly naváženy na analytických vahách s přesností $\pm 0,0001$ g. Navážky sterilního kompostu byly naváženy na vahách s přesností $\pm 0,01$ g.

Po následné sterilizaci při teplotě 125 °C po dobu 30 minut byly láhve uloženy do termostatu s udržovanou teplotou 58 °C. V přibližně jednotýdenních intervalech byl analyzován obsah vyprodukovaného CO₂ a spotřebovaného O₂ v jednotlivých lah-vích pomocí plynového chromatografu.

6.7 Biodegradace PBAT čistým kmenem mikroorganismů degradující daný polymer

Byly připraveny 3 paralelní série z nichž každá obsahovala 3 láhve o následujícím složení:

Složení láhví v 1. sérii:

- 5,00 g perlitu
- 5,0 ml minerálního média
- Zaočkováno 200 μ l kmene mikroorganismů FTPBAT, degradující daný polyester. Zaočkování bylo provedeno po sterilizaci.

Složení láhví v 2. sérii:

- 5,00 g perlitu
- 5,0 ml minerálního média
- 100 mg PBAT

Složení láhvi ve 3. sérii:

- 5,00 g perlitu
- 5,0 ml minerálního média
- 100 mg PBAT
- Zaočkováno 200 μ l kmene FTPBAT. Zaočkování bylo provedeno po sterilizaci.

Navážky PBAT byly naváženy na analytických vahách s přesností $\pm 0,0001$ g. Navážky perlitu byly naváženy na vahách s přesností $\pm 0,01$ g.

Po sterilizaci při teplotě 125 °C po dobu 30 minut byly láhve uloženy do termostatu s udržovanou teplotou 58 °C. V přibližných jednotýdenních intervalech byl analyzován obsah vyprodukovaného CO₂ a spotřebovaného O₂.

III. VÝSLEDKY A DISKUZE

7 CHARAKTERISTIKA KOMPOSTU

U používaného kompostu byla stanovena jeho sušina a hodnota spalitelného podílu. Hodnoty sušin kompostu a spalitelného podílu kompostu vypočtené dle rovnice 1 a 2 jsou znázorněny v tabulce 6.

Tabulka 6. Hodnoty sušin a spalitelného podílu kompostu

	S ₁ [%]	S ₂ [%]	S ₃ [%]	S ₀ [%]
]]]]
Hodnoty sušin kompostu	62,07	62,12	64,01	62,73
Hodnoty spalitelného podílu kompostu	29,51	32,30	29,92	30,54

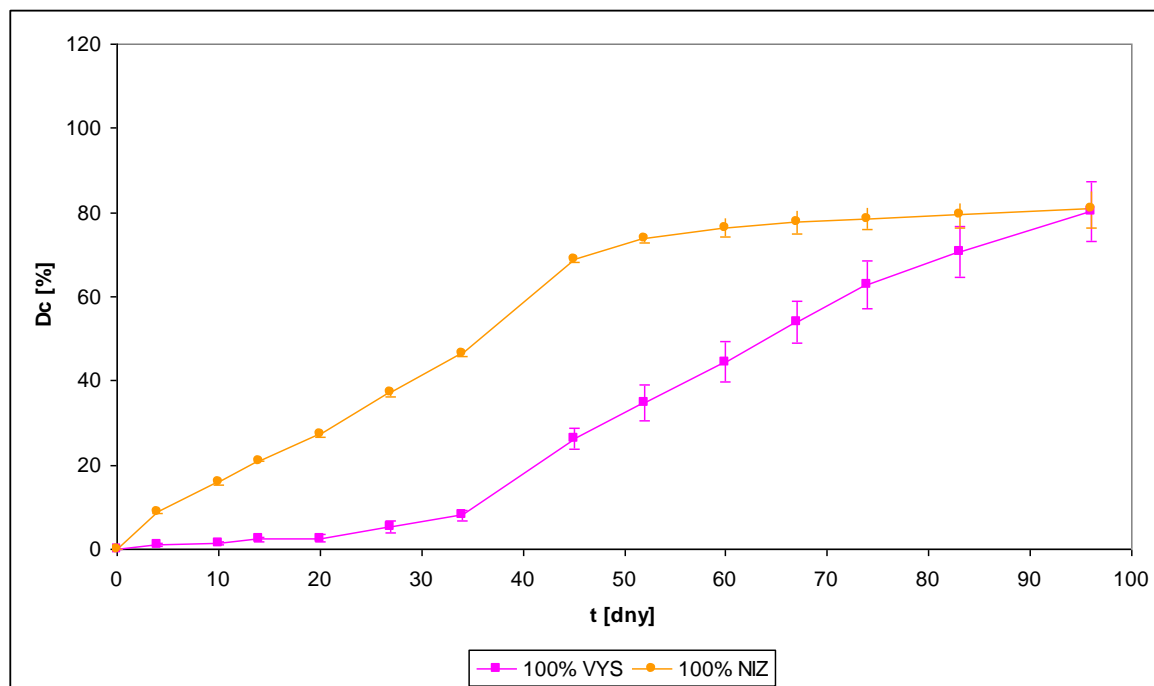
Získaná hodnota sušiny kompostu byla použita pro přepočet použitého množství kompostu v biodegradačních testech na sušinu.

8 HODNOCENÍ BIODEGRADACE NÍZKOMOLEKULÁRNÍ A VYSOKOMOLEKULÁRNÍ PLA A JEJICH SMĚSÍ V PROSTŘEDÍ KOMPOSTU

V rámci této práce byly připraveny a využity práškové formy N₂ a V₂PLA. Pro každou směs, lišící se od sebe různým zastoupením hmotnostního podílu jednotlivých práškových forem N₂ a V₂PLA, byly připraveny 3 paralelní biometrické láhve. Do těchto lahví bylo postupně naváženo 0-50 mg N₂/V₂PLA, 5 g perlitu, 5 g vlhkého kompostu a 5 ml minerálního média (viz. Tabulka 4). Rovněž byly připraveny 4 paralelní láhve jako slepý pokus a 4 paralelní láhve s mikrokrytalickou celulosou jako pozitivní kontrola. Všechny láhve byly uloženy do termostatu s udržovanou teplotou 58 °C.

Cílem této práce bylo porovnat rozdíly v biodegradaci N₂PLA a V₂PLA a zjistit, zda-li přidavek N₂PLA k V₂PLA urychlí biodegradaci V₂PLA a jestli bude mít vliv na přítomnost a délku lagové fáze, vyskytující se při biodegradaci V₂PLA.

Test běžel po dobu 96 dnů a za tuto dobu, jak je patrné z obrázku 5. byla téměř shodná konečná biodegradace vzorků V₂PLA a N₂PLA, dosahující 80 %, jenže průběh jejich mineralizace byl zcela odlišný. Zatímco N₂PLA během prvních 34 dnů dosáhla biodegradace 46 %, V₂PLA vykazovala lagovou fází a za 34 dnů prakticky nejevila žádnou biodegradaci (Obrázek 5). Tímto se dokázal fakt přítomnosti lagové fáze u V₂PLA [24], zapříčiněný patrně tím, že nejprve musí dojít k rozštěpení V₂PLA na menší monomerní a oligomerní jednotky, které jsou již enzymy mikroorganismů schopny rozkládat a využívat jako zdroj potravy.

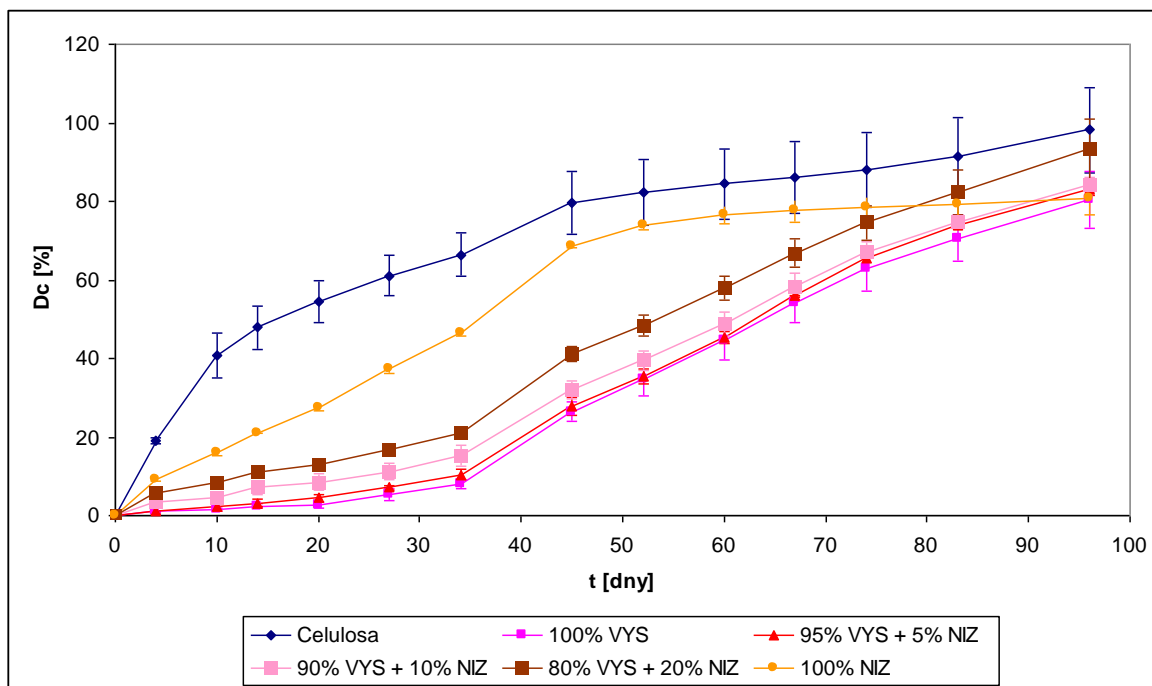


Obrázek 5. Graf biodegradace N_PLA a V_PLA v prostředí kompostu

Dále si lze povšimnout, že po uplynutí lagové fáze u V_PLA (cca 34 dnů), dosahuje rychlost biodegradace srovnatelných hodnot s N_PLA. Je to patrné ze srovnání směrnic křivky N_PLA v oblasti 10-30 dne a křivky V_PLA v oblasti 40-60 dne.

Z obrázku 6. můžeme také vidět rychlost biodegradace vzorku pozitivní kontroly, v našem případě mikrokrystalické celulosy, která během prvních 34 dnů pokusu dosahovala hodnot biodegradace 66 % a v době ukončení pokusu (96. den) 98%.

V dalších lahvích byly připraveny směsi V_PLA a N_PLA, kdy V_PLA tvořila podstatnou část vneseného polymeru a N_PLA byla dodána v přídatku 0-20% hmotnosti vzorku. Přídavek N_PLA by mohl vést k rychlejší indukci potřebných enzymů, případně k pomnožení degradujících mikroorganismů, což by se mohlo projevit zkrácením, nebo až vymizením lagové fáze. Křivky (Obrázek 6.) znázorňující biodegradaci vzorků jsou téměř paralelní a u V_PLA je tendence k vyšší biodegradaci s vyšším zastoupením N_PLA. I po přídatku různého množství N_PLA k V_PLA je patrný zlom v rychlosti biodegradace, který nastává po uplynutí lagové fáze u V_PLA.



Obrázek 6. Graf biodegradace vzorků N_PLA, V_PLA a jejich směsí v prostředí kompostu

Z obrázku 6. lze vysledovat, že po přidavku různého množství N_PLA k V_PLA dochází k vyšší biodegradaci, ovšem lagová fáze se vyskytuje i nadále. Všechny tyto směsi N_a V_PLA měly obdobný průběh mineralizace.

Účelem tohoto pokusu bylo zjistit, zda lagová fáze vyskytující se u biodegradace V_PLA není způsobena nutností pomnožení degradujících mikroorganismů, případně opožděnou indukcí enzymů mikroorganismů v přítomnosti pouze V_PLA. Přídavek N_PLA by v takovém případě mohl zajistit pomnožení mikroorganismů a tím také indukci enzymů mikroorganismů a lagová fáze by se mohla zkrátit, v lepším případě úplně vymizet.

Z prezentovaných dat je zřejmé, že nedošlo k evidentnímu vymizení lagové fáze u V_PLA a zvýšení biodegradace V_PLA je způsobeno zvyšujícím se obsahem N_PLA.

Biodegradace V_PLA bude pravděpodobně ovlivněna dostatečným přístupem enzymů mikroorganismů k volným hydrolyzovatelným vazbám a bude nutné, aby došlo nejprve k rozštěpení V_PLA na menší fragmenty s nižší molekulovou hmotností, které již budou snadněji degradovatelné přítomnými mikroorganismy. Je také možné, že pro rychlejší de-

gradaci V_PLA je nutné vytvoření většího počtu pohyblivějších volných konců polymerních řetězců, které jsou přístupnější pro hydrolytické enzymy.

Pro názornější hodnocení biodegradace V_PLA ve směsi byl odečten přírůstek N_PLA ve směsi s V_PLA a pro přehlednost byly hodnoty biodegradace uvedeny do tabulky 7.

Tabulka 7. Hodnoty biodegradace V_PLA po odečtu N_PLA ze směsi

Biodegradace [%]								
Čas [dny]	100% V_PLA	95%V_PLA +5%N_PLA	pouze V_PLA	90%V_PLA +10%N_PL A	pouze V_PLA	80%V_PLA +20%N_PL A	pouze V_PLA	100% N_PLA
4	1,04	1,30	0,85	3,44	2,54	5,75	3,95	8,99
10	1,54	2,33	1,53	4,64	3,02	8,40	5,17	16,11
14	2,43	3,24	2,19	7,14	5,04	10,95	6,75	21,03
20	2,65	4,42	3,05	8,51	5,77	12,83	7,36	27,34
27	5,26	7,10	5,24	11,11	7,39	16,72	9,28	37,20
34	8,01	10,32	7,99	15,19	10,53	21,06	11,74	46,58
45	26,35	27,80	24,36	32,00	25,13	41,15	27,41	68,73
52	34,79	35,31	31,62	39,47	32,09	48,45	33,69	73,81
60	44,53	45,31	41,49	48,87	41,22	58,06	42,76	76,49
67	54,03	55,91	52,03	58,35	50,58	66,82	51,29	77,67
74	62,84	65,62	61,69	67,11	59,25	74,53	58,81	78,60
83	70,59	73,77	69,80	74,82	66,88	82,25	66,38	79,36
96	80,32	82,95	78,90	84,20	76,11	93,17	77,00	80,86

Můžeme vidět, že v době ukončení lagové fáze (34 dnů) byla biodegradace V_PLA ve směsi 95 % V_PLA + 5 % N_PLA po odečtu N_PLA 7,99 %, zatímco ve směsi 80 % V_PLA + 20 % N_PLA po odečtu N_PLA 11,74 %, z čehož můžeme usoudit již dříve zmiňovaný nepatrný vliv přírůstku N_PLA k V_PLA na vymizení či zkrácení lagové fáze. S přihlédnutím k chybě měření se dá říci, že v době ukončení lagové fáze se hodnoty bio-

degradace V_PLA po odečtu N_PLA z jejich směsi významně neliší od hodnoty biodegradace 100 % V_PLA.

Dále byly po každé analýze CO₂ a provzdušnění láhví odebírány vzorky pro analýzu DNA, která by měla odhalit dynamiku mikrobiální komunity v průběhu tohoto experimentu. Vzorky byly v době odevzdání diplomové práce ještě zpracovávány.

9 POMNOŽENÍ KMENE MIKROORGANISMŮ DEGRADUJÍCÍ DANÝ POLYESTER

Cílem tohoto experimentu bylo pokusit se najít způsob a ověřit možnost kultivace čistého kmene mikroorganismů v tekutém minerální médiu s přidavkem roztoku polymerních submikročásteček jako jediného zdroje uhlíku a připravit materiál pro pokus biodegradace polyesteru čistým kmenem v prostředí kompostu.

Po 14 dnech inkubace bylo všech 6 láhví (vždy 2 s daným polyesterem a zaočkované kmenem FTPBAT degradující PBAT a Ecoflex a kmenem FTPLA degradující N_PLA) vyjmuty z lázně s udržovanou teplotou 58 °C.

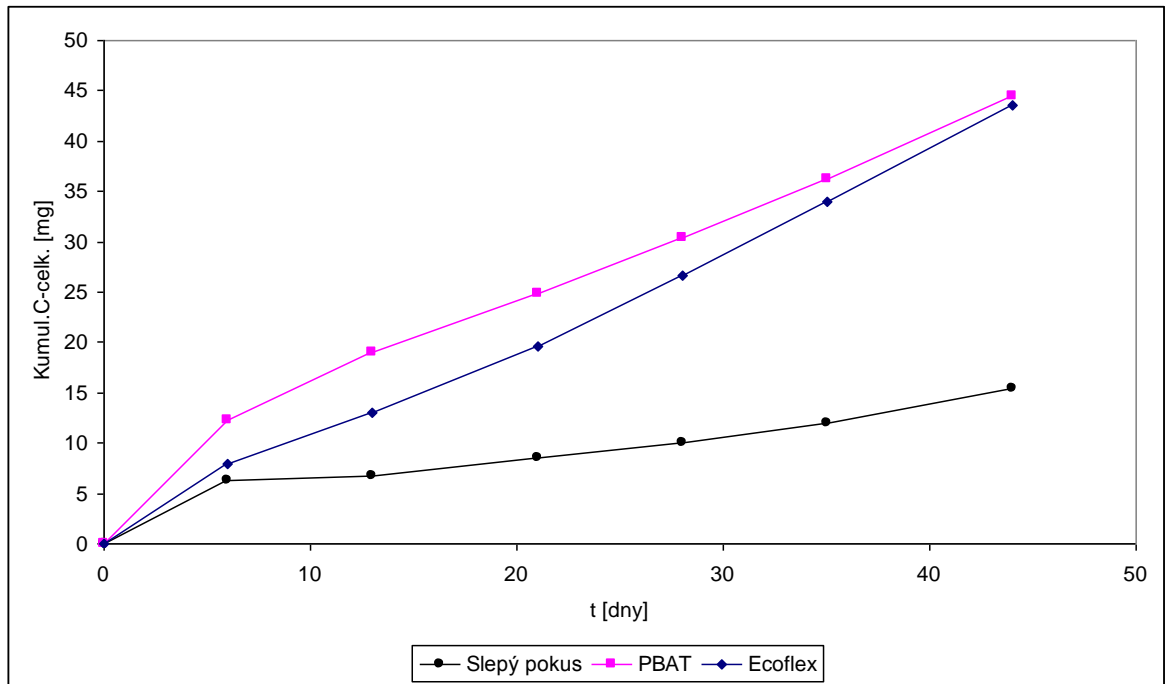
U láhví obsahující polyester PBAT a Ecoflex byl vidět rozdíl v zákalu oproti slepému pokusu (nezačkovaný kmenem mikroorganismů) a také byly pozorovány pomnožené kulovité kolonie kmenů mikroorganismů. Tudíž je zřejmé, že v těchto dvou podmínkách daný kmen mikroorganismů rostl. Nicméně výsledek byl neuspokojivý z toho titulu, že kmen rostl v kulovitých makroskopických koloniích, přičemž my bychom chtěli ideálně homogenní suspenzi. U láhví obsahujících N_PLA nebyl vidět výrazný rozdíl v zákalu oproti slepému pokusu a ani nebyly pozorovány vzniklé kolonie mikroorganismů a proto tyto kmeny nebyly dále používány. Z toho plyne závěr, že kmeny se nepodařilo tímto způsobem kultivovat.

10 HODNOCENÍ BIODEGRADACE N_PLA, PBAT A ECOFLEXU ČISTÝM KMENEM MIKROORGANISMŮ

Tento experiment byl prováděn s cílem navrhnout metodiku postupu při biodegradaci vybraných polyesterů čistým kmenem mikroorganismů. Jelikož jsme se přesvědčili, že se kmeny mikroorganismů v tekutém minerálním médiu s přídavkem daného polyesteru nerozmnožují dle našich představ (viz. kapitola 9), rozhodli jsme se experiment provést v prostředí sterilního kompostu zaočkovaném daným kmenem mikroorganismů.

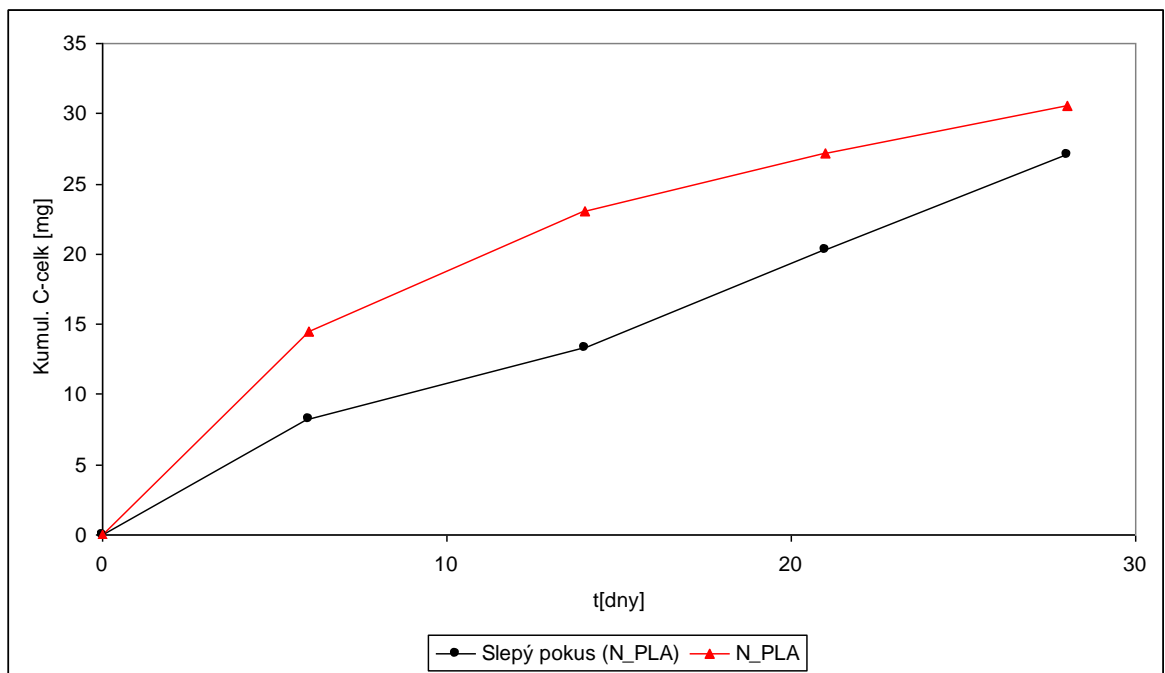
V rámci tohoto experimentu bylo připraveno celkem 9 biometrických láhví (složení viz. kapitola 6.4) ve 3 sériích, z nichž každá série obsahovala 5 g kompostu, 5 g perlitu, 5 ml minerálního média a 50 mg polyesteru (N_PLA, PBAT a Ecoflex). Po sterilizaci při teplotě 125 °C po dobu 30 minut byly láhve zaočkovány čistým kmenem mikroorganismů schopných degradovat daný polyester. Kmen FTPLA byl použit pro biodegradaci PLA a kmen FTPBAT pro biodegradaci PBAT a Ecoflexu. Láhve byly uloženy do termostatu s udržovanou teplotou 58 °C. Byla měřena produkce CO₂ a spotřeba O₂ při mineralizaci daného polyesteru čistým kmenem mikroorganismů pomocí plynového chromatografu.

Z grafu (Obrázek 7.) lze vyzorovat nižší celkovou kumulativní produkci uhlíku u slepého pokusu, což bylo očekáváno, než je tomu u vzorků daných polyesterů. Křivky kumulativní produkce uhlíku u PBAT a Ecoflexu jsou si navzájem podobné, a kumulativní produkce uhlíku v době ukončení pokusu (44. den) byla u obou polyesterů 40 mg. V rozporu s předpokladem vykazoval vysterilizovaný slepý pokus značnou produkci uhlíku, což patrně svědčí o tom, že sterilizace nebyla dokonalá.

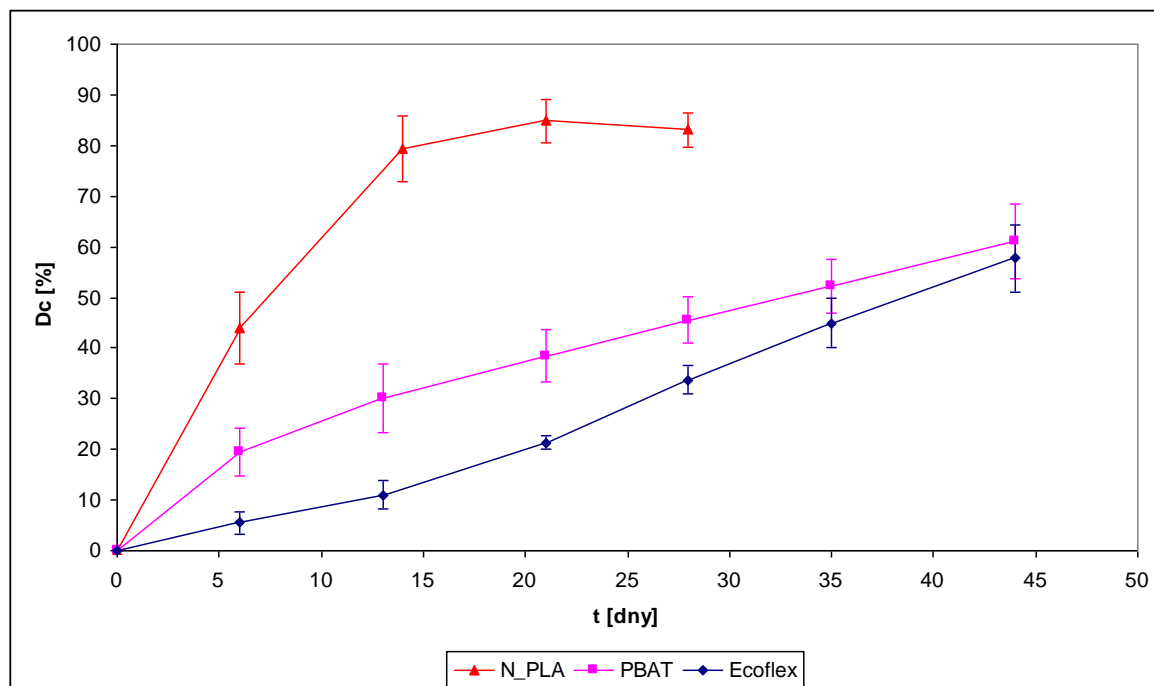


Obrázek 7. Graf celkové kumulativní produkce uhlíku ve formě CO₂ u vzorků PBAT a Ecoflex

Křivky vyjadřující kumulativní produkci uhlíku u slepého pokusu a N_PLA jsou znázorněny na obrázku 8.



Obrázek 8. Graf s křivkami znázornující kumulativní produkci uhlíku u slepého pokusu a N_PLA



Obrázek 9. Graf biodegradace vzorků N_PLA, PBAT a Ecoflexu čistým kmenem v prostředí kompostu

Z grafu (Obrázek 9.) lze spatřit u vzorku N_PLA během prvních 14 dnů inkubace rapidní nárůst biodegradace dosahující 79 %, která v době ukončení pokusu (28. den) dosahovala hodnot 83 %. V porovnání s křivkou na Obrázku 5, kdy byla prováděna biodegradace N_PLA v prostředí kompostu, můžeme pozorovat markantní rozdíl u hodnot biodegradace ve 14. a 28. dni pokusu. Na druhé straně u vzorků PBAT a Ecoflex (Obrázek 9.) si lze všimnout pozvolný nárůst biodegradace, kdy ve 14. dni pokusu dosahovala 30 % a 11% u vzorku PBAT a Ecoflexu. Za zmínku stojí fakt o poměrně odlišném průběhu biodegradace u vzorků PBAT a Ecoflex. U vzorku PBAT vidíme ze začátku (14.den) skoro 3x rychlejší biodegradaci, která ovšem v době ukončení pokusu (44.den) dosahuje hodnot obdobných jako je tomu u vzorku Ecoflex. Musíme konstatovat, že nedostatek pokusu byl v chybějící kontrole sterility kompostu (sterilní kompost nezaočkovaný čistou kulturou + vzorek polyesteru).

11 POMNOŽENÍ KMENE MIKROORGANISMŮ DEGRADUJÍCÍ DANÝ POLYESTER V RŮZNÝCH TEKUTÝCH MÉDIÍCH

Vzhledem k tomu, že pro práci s izolovanými degradačními kmeny mikroorganismů by bylo výhodné mít možnost jejich kultivace a získání většího množství biomasy, například pro zaočkování degradačních experimentů, byla testována vhodná tekutá média. Zkoumané mikroorganismy patří do skupiny aktinomycet, čímž byl dán výběr testovaných médií.

Na začátku pokusu byla všechna tekutá média čirá. Po 18 dnech byl pokus ukončen a nárůst mikroorganismů je znázorněn v tabulce 8.

Tabulka 8. Vzhled tekutých médií po ukončení pokusu

Tekuté médium	Použitý kmen	Vzhled tekutého média
TYA	FTPLA	Zákal
TYA	FTPBAT	Mírný zákal
YEME	FTPLA	Zákal
YEME	FTPBAT	Čirý

Poté byla všechna tekutá média sterilně zcentrifugována v následujícím cyklu:

- Centrifuga (10 minut, 4 °C, 8000 g)
- Roztřepání ve fyziologickém roztoku (stejný objem jako tekuté médium)
- Centrifuga (10 minut, 4 °C, 8000 g)

Cykly byly provedeny celkem 3x.

Následně byla z části biomasy vytvořena zásobní kultura v 1 ml glycerolu a uschována v mrazicím zařízení pro další použití.

Jako nejvhodnější tekuté médium pro pomnožení kultury mikroorganismů z našich dvou tekutých médií se jeví TYA médium, soudě jednak podle vzniku zákalu a také podle množství biomasy viditelné po centrifugaci.

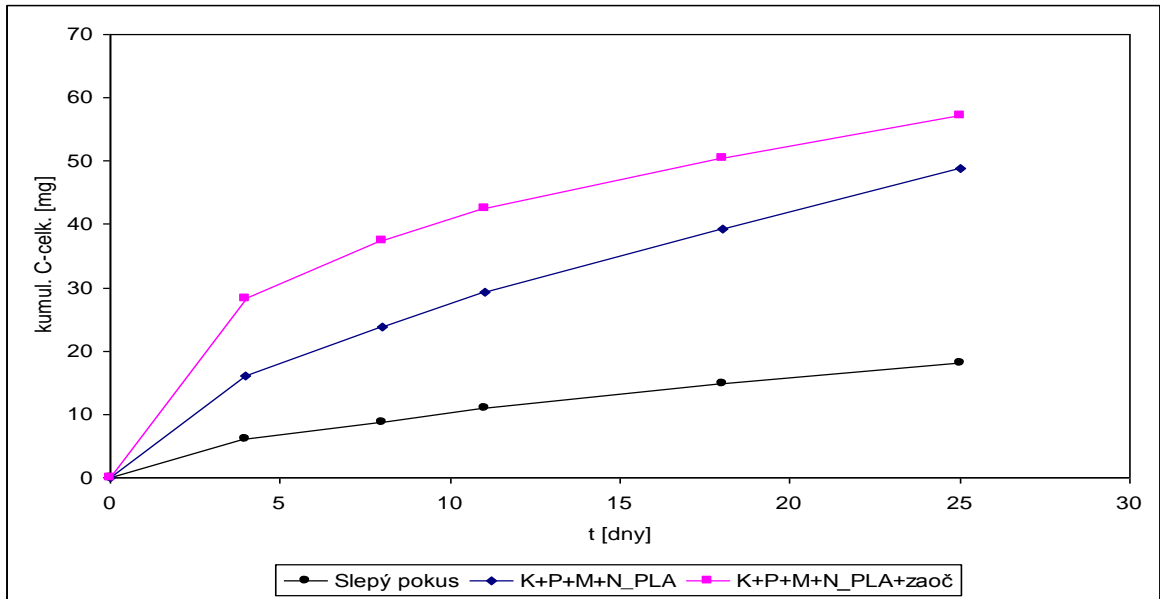
Po zaočkování minerálního agarů s daným polymerem zásobní kulturou odpovídajícího kmene nebyl viděn žádný růst kolonií mikroorganismů, z čehož jsme usoudili, že v tekutých médiích nevyrostla námi požadovaná kultura mikroorganismů, ale jednalo se s největší pravděpodobností o kontaminaci. Výsledek pokusu ukázal, že kultivace kmenů na kompletním médiu není pro tyto kmeny vhodná. Je tedy nutné je kultivovat na minerálním médiu s daným polymerem na němž rostou pouze kmeny degradující daný polymer.

12 HODNOCENÍ BIODEGRADACE NÍZKOMOLEKULÁRNÍ PLA ČISTÝM KMENEM MIKROORGANISMŮ V PROSTŘEDÍ STERILNÍHO KOMPOSTU

Důvodem uskutečnění tohoto pokusu bylo zjistit rozdíl biodegradace N_PLA ve sterilním kompostu nezaočkovaném a zaočkovaném čistým kmenem FTPLA degradující daný polyester. Od výsledků tohoto pokusu byl očekáván viditelný rozdíl v hodnotách biodegradace vzorku N_PLA nezaočkovaném a zaočkovaném čistým kmenem mikroorganismů v prostředí sterilního kompostu, přičemž u nezaočkovaného vzorku N_PLA jsou čekány zanedbatelné hodnoty biodegradace, z důvodu nepřítomnosti mikroorganismů schopných degradovat N_PLA. Stěžejním předpokladem u tohoto pokusu je důkladně sterilizovaný kompost, jehož postup sterilizace je popsán v kapitole 6.6. Sterilizace se skládala ze 3 kroků: 1 - sterilizace při teplotě 125 °C po dobu 30 minut, 2 - inkubace při teplotě 58 °C po dobu 4 dnů, 3 - sterilizace při teplotě 125 °C po dobu 30 minut.

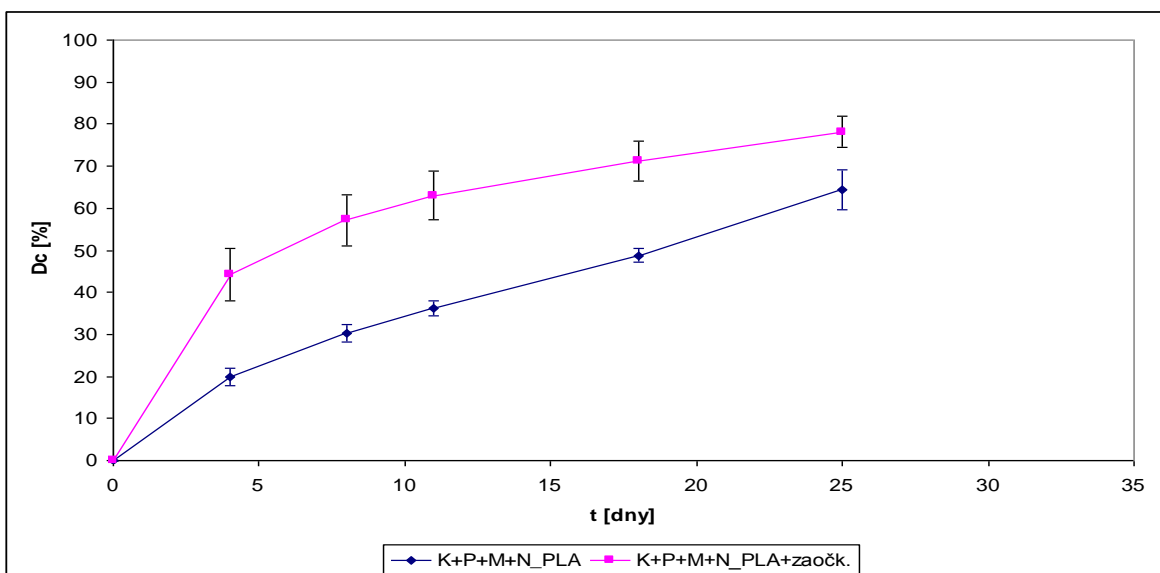
Jelikož aktinomycety, jejichž spóry jsou schopné přežívat v nepříznivých (extrémních) podmínkách, žijící v kompostu by mohly negativně ovlivnit (zkreslit) výsledky biodegradace, zvolili jsme 3 cykly sterilizace, za účelem eliminace těchto aktinomycet. Dalším důvodem důkladné sterilizace je získání prokazatelného rozdílu v biodegradaci N_PLA zaočkované a nezaočkované čistým kmenem mikroorganismů v prostředí sterilního kompostu.

Kumulativní produkce uhlíku v prostředí sterilního kompostu je znázorněna na Obrázku 10. U N_PLA zaočkované čistým kmenem mikroorganismů a nezaočkované jsou významně vyšší než u slepého pokusu. Očekávali jsme však, že N_PLA nezaočkovaná kmenem mikroorganismů a slepý pokus budou mít minimální produkci uhlíku.



Obrázek 10. Graf celkové kumulativní produkce uhlíku vzorků v prostředí sterilního kompostu.

Křivky, vyjadřující hodnoty biodegradace, nám ukazují (Obrázek 11), že vzorek N_PLA zaočkovaný čistým kmenem mikroorganismů vykazuje po 8 dnech trvání pokusu 57 % biodegradace, kdežto nezaočkovaný vzorek N_PLA vykazuje 30 % biodegradace. Biodegradace v době ukončení pokusu (25. den) u zaočkované N_PLA čistým kmenem dosáhla hodnoty 78 % a u nezaočkované N_PLA na 64 %.



Obrázek 11. Graf biodegradace N_PLA nezaočkované a zaočkované čistým kmenem FTPLA v prostředí sterilního kompostu.

Dále je patrné (z Obrázku 11.), že křivky znázorňující procenta biodegradace N_PLA nezaočkované a zaočkované čistým kmenem mikroorganismů jsou, jak jsme předpokládali, od sebe odlišné, ovšem hodnoty biodegradace N_PLA nezaočkované kmenem mikroorganismů jsou příliš vysoké, než dle našeho očekávání. Můžeme si tedy dovolit říci, že sterilizace kompostu, skládající se ze 3 cyklů (popsána v kapitole 6.6) byla nedostatečná a v kompostu po sterilizaci byly přítomny aktinomycety s přeživšími spory schopné degradovat N_PLA .

Je zjevné, že biodegradace N_PLA zaočkovaná čistým kmenem mikroorganismů probíhá rychleji, nežli je tomu v případě nezaočkované N_PLA, kdy se na biodegradaci N_PLA podílí mikroorganismy přeživší sterilizaci kompostu.

ZÁVĚR

V diplomové práci byla zkoumána biodegradabilita polyesterů PLA, PBAT a Ecoflex. Největší pozornost byla věnována PLA. Tyto polyestery mají podobné vlastnosti jako běžně používané konvenční plasty a navíc mají tu výhodu, že jsou rozložitelné v prostředí kompostu.

Cílem této diplomové práce bylo sledovat biodegradaci vzorků PLA o různé molekulové hmotnosti v prostředí kompostu a kombinací PLA s různou molekulovou hmotností zjistit, zdali přídavek N_PLA ovlivní délku či přítomnost lagové fáze vyskytující se při biodegradaci V_PLA. Pracovalo se s práškovými formami N_PLA a V_PLA, kdy N_PLA byla postupně přidávána k V_PLA v hmotnostním poměru 0-20 %. Láhve se vzorky byly uloženy do termostatu s udržovanou teplotou 58 °C po dobu 96 dnů a v přibližně jednotýdenních intervalech byl analyzován pomocí plynového chromatografu produkovaný CO₂ a spotřebovaný O₂. Po vyhodnocení naměřených dat se potvrdila přítomnost lagové fáze vyskytující se při biodegradaci V_PLA, trvající cca 34 dnů, zřejmě způsobená nutností rozštěpení dlouhých řetězců V_PLA na menší oligomerní fragmenty, které již mohou být snadněji degradovány přítomnými mikroorganismy. Po uplynutí této doby byla rychlost biodegradace V_PLA mezi 40-60 dnem srovnatelná s rychlostí biodegradace N_PLA mezi 0-30 dnem, což je zřejmé po srovnání směrnice křivek biodegradace V_ a N_PLA v daném rozmezí intervalů. Konečná hodnota biodegradace V_ a N_PLA v době ukončení pokusu byla téměř shodná a dosahovala 80 % (Obrázek 5.).

Přídavek 0-20 hmotnostních % N_PLA k V_PLA, jenž dle naší původní domněnky měl vést k indukci enzymů a pomnožení mikroorganismů schopných degradovat V_PLA, což by mohlo vést ke zkrácení či vymizení lagové fáze, ovlivnil biodegradaci V_PLA a to tak, že se biodegradace V_PLA zvyšovala s rostoucím zastoupením N_PLA, ale i nadále s přítomností lagové fáze (Obrázek 6.).

Dále byla testována možnost kultivace kmenů mikroorganismů a průkaz biodegradace zkoumaných polymerů v prostředí tekutého minerálního média s přídavkem suspenze submikročásteček zkoumaných polymerů, které takto představovaly jediný zdroj uhlíku pro růst mikroorganismů. Po 14 dnech inkubace při 58 °C ve vodní lázni byl v tekutých médiích, které obsahovaly vzorky PBAT a Ecoflex, vidět zákal oproti slepému pokusu a současně byly pozorovány kulovité kolonie mikroorganismů. Z toho vyplývá, že v těchto teku-

tých médiích rostou mikroorganismy degradující daný polyester, což se na druhou stranu nedá říct o médiu s PLA u kterého nebyl evidentní rozdíl v zákalu oproti slepému pokusu a tak můžeme konstatovat, že v tomto médiu dané kmeny mikroorganismů nerostou. I přes to všechno byl výsledek pokusu nedostačující z toho důvodu, že jsme očekávali ideálně homogenní suspenzi mikroorganismů namísto kulovitých kolonií mikroorganismů.

V dalším experimentu byl proveden pokus biodegradace N_PLA, PBAT a Ecoflexu čistým kmenem mikroorganismů v prostředí kompostu. Připravené láhve byly po sterilizaci při teplotě 125 °C po dobu 30 minut zaočkovány čistým kmenem mikroorganismů degradující daný polyester a uloženy do termostatu s udržovanou teplotou 58 °C. Po porovnání křivky znázorňující biodegradaci N_PLA v lahvích zaočkovaných čistým kmenem v prostředí kompostu (Obrázek 9.) a křivky znázorňující biodegradaci sterilních lahví s N_PLA v prostředí kompostu (Obrázek 5.) je vidět značný rozdíl v biodegradaci, přičemž biodegradace N_PLA zaočkované čistým kmenem dosahuje ve 14. dni inkubace hodnot 79 % naopak nezaočkovaná N_PLA v prostředí kompostu 23 %. U vzorku PBAT si lze povšimnout počáteční téměř 3x vyšší biodegradaci než u vzorku Ecoflexu.

Při testování tekutých medií YEME a TYA (složení kapitola 5.1) použitých pro kultivaci degradujících kmenů mikroorganismů se jako nejvhodnější ukazovalo TYA médium. Ale po přeočkování na minerální agar s daným polymerem nebyl viděn růst kolonií, což nás dovedlo k úsudku, že kultivace těchto kmenů není v kompletním médiu vhodná a je nutnost je kultivovat na minerálním agaru s daným polymerem.

Vliv na biodegradaci N_PLA zaočkované a nezaočkované čistým kmenem degradující N_PLA v prostředí sterilního kompostu byl sledován v posledním experimentu. Výsledky ukazují (Obrázek 11.), že zaočkování N_PLA čistým kmenem FTPLA vede k rychlejší biodegradaci než je tomu v případě nezaočkované N_PLA. Ovšem i přes to všechno jsou hodnoty biodegradace u nezaočkované N_PLA neadekvátně vysoké, v rozporu s tím, že kompost byl důkladně sterilizován a tudíž, by se v něm neměly vyskytovat žádné mikroorganismy schopné degradace.

Biodegradace PBAT pomocí čistého kmene FTPBAT v době odevzdání diplomové práce stále probíhala.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TOKIWA, U., UGWU, CH., AIBA, S. Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*. vol. 2009, no. 10, p. 3722-2742. ISSN 1422-0067.
- [2] SONG, J. et al. Biodegradable and Compostable Alternatives to Conventional Plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-biological Sciences*. 2009, vol. 364, no. 1526, p. 2127-2139. DOI: 10.1098/rstb.2008.0289. ISSN 1471-2970.
- [3] AVEROUS L. Biodegradable polyesters: PLA, PCL, PHA ... *Biodegradable Polymer, Biopolymer, Agro-polymer, Bioplastic, Biomaterial, Compostable Packaging* [online]. 2009 [cit.2012-01-07]. Dostupné z WWW: <<http://www.biodeg.net/bioplastic.html>>.
- [4] BREULMANN, M.; et al. *Polymers, Biodegradable*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. vol. 2009. [online]. [cit.2012-01-10]. Dostupné z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.n21_n01/abstract>.
- [5] LUCAS, N., et al. Polymer biodegradation: Mechanism and estimation techniques. *Chemosphere*. vol. 2008, no. 73, p. 429-442.
- [6] HOFFMANN, J., RŮŽIČKA, J., ŘEZNÍČKOVÁ, I. *Technologická cvičení z ochrany prostředí*. Zlín. část II. Zlín, 2000.
- [7] KUPEC, J. *Zpracování odpadních vod a kalů*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická ES, 2002.
- [8] LIPSA, R.; TUDORACHI, N.; VASILE, C. Poly(α -hydroxyacids) in biomedical applications: synthesis and properties of lactic acid polymers. *e-Polymers*. vol. 2010, no. 87.
- [9] *Poly lactide (PLA) - a new way of production*. - Free Online Library. [online]. [cit. 2012-01-08]. Dostupné z WWW:<[http://www.thefreelibrary.com/Poly+lactide+\(PLA\)+a+a+new+way+of+production.-a055683836](http://www.thefreelibrary.com/Poly+lactide+(PLA)+a+a+new+way+of+production.-a055683836)>.
- [10] JACOBSEN, S., et al., *Poly lactide (PLA) - a new way of production*. *Polymer Engineering and Science*. 1999, vol. 39, no. 7, p. 1311-1319. ISSN 1548-2634

- [11] PIŠ, V., *Biodegradace nových syntetických materiálů*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická, diplomová práce 2011.
- [12] DVOŘÁČKOVÁ, M., STLOUKAL, P., KOUTNÝ, M., GREGOVSKÁ, M., *Biodegradability of aliphatic-aromatic copolyester in aqueous anaerobic and aerobic environments*. ISBN: 978-1-61804-032-9
- [13] YAMOMOTO, M., WITT, U., SKUPIN, G., BEIMBORN, D., MÜLLER, R.J. *Biodegradable Aliphatic-Aromatic Polyesters: "Ecoflex®"*. [on-line]. [cit. 2012-01-15]. Dostupné z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600035.bpol4011/full>>.
- [14] KOSUKE, T., et al., Degradation of poly(L-lactic acid) by a newly isolated thermophile. *Polymer Degradation and Stability*. vol. 2004, no. 84, p. 433-438.
- [15] HO, KAI-LAI G. and POMETTO, A., Temperature Effects on Soil Mineralization of Polylactic Acid Plastic in Laboratory Respirometers. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 1999, vol. 7, no. 2, p. 101-108.
- [16] TOKIWA, Y., JARERAT, A., Accelerated Microbial Degradation of Poly(L-lactide). *Macromolecular Symposium*. vol. 2005, no. 224, p. 367-376.
- [17] ARENA, M., et al., Degradation of Poly (Lactic Acid) and Nanocomposites by *Bacillus Licheniformis*. *Environmental Science & Pollution Research*. 2011, vol. 18, no. 6, p. 865-870.
- [18] KIM, M.-N., PARK, S. -T., Degradation of Poly(L-lactide) by a Mesophilic Bacterium. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010, vol. 117, p. 67-74.
- [19] ITÄVAARA, M., KARJOMAA, S., SELIN, J., Biodegradation of Polylactide in Aerobic and Anaerobic Thermophilic Conditions. *Chemosphere*. 2002, vol. 46, p. 879-885. ISSN 0045-6535.
- [20] KIJCHAVENGKUL, T., et al., Development of an automatic laboratory –scale respirometric system to measure polymer biodegradability. *Polymer Testing*. 2006, 25(8): p. 1006-1016.
- [21] FUNABASHI, M., NINOMIYA, F., KUNIOKA, M., Biodegradability Evaluation of Polymers by ISO 14855-2. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009. 10(8), p. 3635-3654.

- [22] STLOUKAL, P., Assessment of the interrelation between photooxidation and biodegradation of selected polyesters after artificial weathering. *Elsevier Editorial System for Chemosphere*. 2012. V tisku.
- [23] GERYCH, P., *Biodegradace polyethylenu s peroxidanty*. UTB ve Zlíně, fakulta technologická, diplomová práce 2008.
- [24] YANG, H.-S., YOON, J.-S., KIM, M.-N., Dependence of biodegradability of plastics in compost on the shape of specimens. *Polymer Degradation and Stability*, 2005. 87(1), p. 131-135.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ASTM	Americká organizace pro testování a materiály (American Society for Testing and Materials).
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography).
ISO	Mezinárodní organizace zabývající se tvorbou norem (International Standard Organization).
LDPE	Nízkohustotní polyetylen (Low density polyethylen).
MODA	Microbial Oxidative Degradation Analyzer
PBAT	Kopolymer polybutandiolu s kyselinou adipovou a tereftalovou (Polybutylene adipe-co-terephthalate)
PCL	Polykaprolakton (Polycaprolactonate).
PET	Polyetylentereftalát (Polyethylenerephthalate).
PLA	Polymléčná kyselina (Polylactic acid).
PVA	Polyvinylalkohol (Polyvinylalcohol).
ROP	Ring Opening Polymerization
TCD	Tepelně vodivostní detektor (Temperature capture detector).
UV	Ultrafialový (Ultraviolet).
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Chemické struktury biodegradabilních polymerů [3].....	13
Obrázek 2. Optické izomery kyseliny mléčné [8].....	16
Obrázek 3. Způsoby přípravy PLA polymeru [10]	17
Obrázek 4. Chemická struktura aromaticko-alifatického kopolyesteru Ecoflex [12].....	19
Obrázek 5. Graf biodegradace N_PLA a V_PLA v prostředí kompostu.....	49
Obrázek 6. Graf biodegradace vzorků N_PLA, V_PLA a jejich směsí v prostředí kompostu	50
Obrázek 7. Graf celkové kumulativní produkce uhlíku ve formě CO ₂ u vzorků PBAT a Ecoflex.....	55
Obrázek 8. Graf s křivkami znázorňující kumulativní produkci uhlíku u slepého pokusu a N_PLA	55
Obrázek 9. Graf biodegradace vzorků PLA, PBAT a Ecoflexu čistým kmenem v prostředí kompostu	56
Obrázek 10. Graf celkové kumulativní produkce uhlíku vzorků v prostředí sterilního kompostu.	60
Obrázek 11. Graf biodegradace N_PLA nezaočkované a zaočkované čistým kmenem FTPLA v prostředí sterilního kompostu.....	60

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Chemické struktury alifatického polyesteru, polykarbonátu, polyuretanu, polyamidů a jejich teploty tání	15
Tabulka 2. Charakteristiky komerčního polymeru PLA [3]	18
Tabulka 3. Základní vlastnosti materiálu Ecoflex	19
Tabulka 4. Obsah jednotlivých láhví při biodegradačním pokusu.....	37
Tabulka 5. Parametry plynového chromatografu Agilent 7890	38
Tabulka 6. Hodnoty sušin a spalitelného podílu kompostu	47
Tabulka 7. Hodnoty biodegradace V_PLA po odečtu N_PLA ze směsi	51
Tabulka 8. Vzhled tekutých médií po ukončení pokusu.....	57

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I

**PŘÍLOHA P I: UKÁZKA ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH HODNOT
PRO VYSOKOMOLEKULÁRNÍ PLA PŘI BIODEGRADACI
V KOMPOSTU (VŠECHNY NAMĚŘENÉ HODNOTY JSOU
K DISPOZICI V ELEKTRONICKÉ PODOBĚ).**

100% Vysokomol. PLA											
Datum	Inkubace (dny)	TC (w/w %)	mC (mg)	Vhead (ml)	Vnástřik (ul)	Signál A.U., ul, %	denni C (mg)	kumul. C (mg)	substr. C (mg)	Degrad. (%)	Součet degrad.
komp 1	0				100	0,00000	0	0	0	0	0
4.10.2011	4				100	249,72000	6,06624	6,06624	0,35333	1,38561	1,38561
10.10.2011	10				100	338,37000	8,07918	14,1454	0,16702	0,65497	2,04058
14.10.2011	14				100	197,61000	4,80713	18,9526	0,21529	0,84427	2,88485
20.10.2011	20				100	253,82000	6,14395	25,0965	0,15855	0,62176	3,50661
27.10.2011	27				100	258,89000	6,32408	31,4206	0,53020	2,07923	5,58583
3.11.2011	34				100	261,36000	6,3648	37,7854	0,78890	3,09374	8,67957
14.11.2011	45				100	468,29000	9,40851	47,1939	4,72023	18,5107	27,19026
21.11.2011	52				100	365,96000	7,57464	54,7685	3,15468	12,3713	39,56157
29.11.2011	60				100	346,22000	7,65099	62,4195	2,41914	9,48681	49,04839
6.12.2011	67	50	51,0	580,0	100	300,17000	6,28311	68,7026	2,13044	8,35467	57,40306
13.12.2011	74				100	279,53000	5,96661	74,6692	1,93078	7,57168	64,97473
22.12.2011	83				100	318,83000	6,63505	81,3043	1,99792	7,83499	72,80973
5.1.2012	96				100	413,79000	9,14078	90,4451	2,66112	10,4358	83,24548
komp 2	0				100	0,00000	0	0	0	0	0
4.10.2011	4				100	246,12000	5,97879	5,97879	0,26588	1,0509	1,05090
10.10.2011	10				100	331,21000	7,90823	13,887	-0,00394	-0,0156	1,03533
14.10.2011	14				100	196,34000	4,77624	18,6633	0,18439	0,72883	1,76416
20.10.2011	20				100	245,72000	5,94788	24,6111	-0,03752	-0,1483	1,61586
27.10.2011	27				100	255,03000	6,22979	30,8409	0,43591	1,72297	3,33883
3.11.2011	34				100	258,42000	6,2932	37,1341	0,71731	2,8352	6,17403
14.11.2011	45				100	445,29000	8,94641	46,0805	4,25813	16,8305	23,00458
21.11.2011	52				100	285,84000	5,91631	51,9968	1,49636	5,91447	28,91905
29.11.2011	60				100	339,11000	7,49387	59,4907	2,26202	8,94078	37,85983
6.12.2011	67	50	50,6	580,0	100	309,07000	6,4694	65,9601	2,31673	9,15705	47,01688
13.12.2011	74				100	285,11000	6,08572	72,0458	2,04988	8,10231	55,11919
22.12.2011	83				100	311,31000	6,47855	78,5244	1,84143	7,27837	62,39756
5.1.2012	96				100	385,82000	8,52291	87,0473	2,04325	8,07609	70,47364
komp 3	0				100	0,00000	0	0	0	0	0
4.10.2011	4				100	241,31000	5,86194	5,86194	0,14903	0,67071	0,67071
10.10.2011	10				100	339,55000	8,10736	13,9693	0,19519	0,87845	1,54917
14.10.2011	14				100	198,80000	4,83608	18,8054	0,24424	1,09917	2,64834
20.10.2011	20				100	249,05000	6,02849	24,8339	0,04309	0,19391	2,84225
27.10.2011	27				100	273,82000	6,68878	31,5227	0,89491	4,02749	6,86974
3.11.2011	34				100	250,09000	6,09034	37,613	0,51445	2,31525	9,18499
14.11.2011	45				100	451,00000	9,06113	46,6741	4,37265	19,6798	28,86478
21.11.2011	52				100	288,91000	5,97986	52,654	1,55990	7,02027	35,88505
29.11.2011	60				100	345,30000	7,63066	60,2846	2,39881	10,7957	46,68076
6.12.2011	67	50	50,2	580,0	100	315,16000	6,59687	66,8815	2,44421	11	57,68080
13.12.2011	74				100	301,05000	6,42596	73,3075	2,39013	10,7566	68,43744
22.12.2011	83				100	309,48000	6,44047	79,7479	1,80334	8,11586	76,55330
5.1.2012	96				100	400,90000	8,85603	88,604	2,37637	10,6947	87,24805

EVIDENČNÍ LIST DIPLOMOVÉ PRÁCE

Sigla (místo uložení diplomové práce)	Ústřední knihovna UTB ve Zlíně
Název diplomové práce	Faktory ovlivňující biodegradabilitu vybraných polyesterů
Autor diplomové práce	Bc. Jaromír Krumpolc
Vedoucí diplomové práce	doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
Vysoká škola	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Adresa vysoké školy	Nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín
Fakulta (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Fakulta technologická, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
Katedra (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Rok obhájení DP	2012
Počet stran	71
Počet svazků	2
Vybavení (obrázky, tabulky...)	11 obrázků, 8 tabulek
Klíčová slova	Biodegradace, polymléčná kyselina, polyester, kompost, PBAT, Ecoflex.