

Biodegradace materiálů na bázi kyseliny polymléčné v aerobním a anaerobním vodném prostředí

Bc. Michaela Bartuňková

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Bartuňková**

Osobní číslo: **T13353**

Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Biodegradace materiálů na bázi kyseliny polymléčné
v aerobním a anaerobním vodném prostředí**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární studii týkající se chování biodegradabilního polyesteru kyseliny polymléčné (PLA) v aerobním a anaerobním vodném prostředí.
2. Provedte testy biodegradace směsných materiálů na bázi PLA ve vodném anaerobním a aerobním prostředí.
3. Vyhodnoťte stupeň mineralizace testovaných materiálů a dle možností otestujte a vyhodnoťte změny jejich morfologických vlastností způsobené působením biotického prostředí.
4. Veškeré získané výsledky zpracujte do formy diplomové práce.

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:

Ing. Marie Dvořáčková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

15. května 2015

Ve Zlíně dne 10. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu 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 15. května 2015


.....

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

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

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

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

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

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užití-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). Odírá-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 užit 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 jim 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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Studiem diplomové práce bylo sledování biodegradace materiálů na bázi kyseliny polymléčné v aerobním a anaerobním mezofilním (37 °C) a termofilním (55 °C) vodném prostředí. Současně s testy biodegradace probíhal test abiotické hydrolýzy při 37 °C a 55 °C. Testovány byly rovněž změny morfologických vlastností pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) a Fourierova transformační infračervená spektroskopie (FTIR).

Bylo zjištěno, že teplota výrazně ovlivňuje jak stupeň abiotické hydrolýzy, tak biodegradaci materiálů na bázi PLA. Za anaerobních termofilních podmínek (55 °C) bylo PLA rozloženo z 54 % a za mezofilních podmínek (37 °C) pouze z 0,2 %. Dle produkce bioplynu byla směsná fólie PLA s 15 % PHB za anaerobních termofilních podmínek (55 °C) rozložena z 29 % a za anaerobních mezofilních podmínek (37 °C) ze 7 %.

Klíčová slova: kyselina polymléčná, biodegradace, anaerobní podmínky, aerobní podmínky, abiotická hydrolýza

ABSTRACT

Study of the final thesis was monitoring the biodegradation of materials based on polylactic acid in aerobic and anaerobic mesophilic (37 °C) and thermophilic (55 °C) aqueous environment. Simultaneously with the biodegradation tests conducted test abiotic hydrolysis at 37 °C and 55 °C. Tested were also changes in morphological characteristics by differential scanning calorimetry (DSC) and a Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

It was found that the temperature significantly influences both the degree of abiotic hydrolysis and biodegradation materials based on PLA. Under anaerobic thermophilic conditions (55 °C) was degraded PLA of 54 % and under mesophilic conditions (37 °C) of only 0.2%. According to the biogas production is a compound of PLA film with 15 % PHB under anaerobic thermophilic conditions (55 °C) was degraded of 29 % and under anaerobic mesophilic conditions (37 °C) of 7 %.

Keywords: polylactic acid, biodegradation, anaerobic conditions, aerobic conditions, abiotic hydrolysis

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce paní Ing. Marii Dvořáčkové, Ph.D. za odborné vedení, čas, ochotu, cenné rady a připomínky při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat panu prof. Ing. Petru Svobodovi, Ph.D. za odborné konzultace.

A také bych na tomto místě chtěla velmi poděkovat rodičům, bratrovi a blízkým přátelům za jejich pomoc a trvalou morální podporu při vypracování diplomové práce a také během celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BIODEGRADACE	13
1.1 ANAEROBNÍ BIODEGRADACE.....	13
1.1.1 Fáze anaerobní biodegradace	14
1.1.2 Skupiny anaerobních mikroorganismů	14
1.2 AEROBNÍ BIODEGRADACE	16
1.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BIODEGRADACI.....	16
1.3.1 Teplota.....	16
1.3.2 pH.....	17
1.3.3 Složení substrátu	17
1.3.4 Kyslík	17
1.4 SROVNÁNÍ AEROBNÍ A ANAEROBNÍ BIODEGRADACE	17
2 BIODEGRADOVATELNÉ POLYESTERY	19
2.1 VYBRANÉ DRUHY ALIFATICKÝCH POLYESTERŮ.....	19
2.1.1 Kyselina polymléčná (PLA).....	19
2.1.2 Polyhydroxybutyrát (PHB)	20
2.1.3 Polykaprolakton (PCL)	21
2.1.4 Polybutylensukcinát (PBS)	22
2.1.5 Polyethylensukcinát (PES).....	22
3 BIODEGRADACE POLYMERŮ	24
3.1 HYDROLÝZA POLYESTERŮ.....	25
3.2 BIODEGRADACE PLA	27
3.2.1 Anaerobní biodegradace polymerů ve vodném prostředí	28
3.2.1.1 Anaerobní biodegradace PLA za různých teplotních podmínek ve vodném prostředí	28
3.2.1.2 Anaerobní degradace PLA ve skládkových podmínkách	30
3.2.2 Aerobní biodegradace	31
3.2.2.1 Respirometrie.....	31
3.2.2.2 Aerobní biodegradace PLA za různých teplotních podmínek	31
3.3 BIODEGRADACE SMĚSÍ NA BÁZI PLA	32
4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	35
II PRAKTICKÁ ČÁST	36
5 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	37
5.1 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	37
5.2 CHEMIKÁLIE.....	37
5.2.1 Biomédium pro anaerobní testy	37
5.2.2 Biomédium pro aerobní testy	38
5.2.3 Úprava a zpracování anaerobního mezofilního kalu.....	40
5.2.3.1 Mezofilní podmínky	40
5.2.3.2 Termofilní podmínky	40
5.2.4 Úprava a zpracování aerobního kalu.....	41
5.2.5 Fosfátový pufr pro hydrolyzu vzorků PLA	41

5.2.6	Testované materiály	41
5.3	METODY STANOVENÍ.....	43
5.3.1	Veškeré látky (VL).....	43
5.3.2	Ztráta žiháním (ZŽ).....	43
5.3.3	pH, oxidačně redukční potenciál (ORP)	43
5.3.4	Biodegradace v anaerobních podmínkách	43
5.3.4.1	Testy při různých teplotních podmínkách	43
5.3.4.2	Vyhodnocení anaerobní biodegradace.....	45
5.3.5	Biodegradace v aerobních podmínkách	46
5.3.6	Hydrolýza.....	46
5.3.7	Stanovení rozpuštěného uhlíku	47
5.3.8	Diferenční skenovací kalorimetrie	47
5.3.9	Fourierova transformační infračervená spektroskopie.....	47
5.4	VYHODNOCENÍ.....	48
5.4.1	Veškeré látky (VL).....	48
5.4.2	Ztráta žiháním (ZŽ).....	48
5.4.3	Biodegradace v anaerobních podmínkách	48
5.4.3.1	Množství vyprodukovaného C v plynné fázi ve formě CO ₂	48
5.4.3.2	Množství vyprodukovaného C v plynné fázi ve formě CH ₄	49
5.4.3.3	Stupeň biologického rozkladu z hlediska produkce CO ₂ a CH ₄ v plynné fázi	49
5.4.3.4	Stupeň biologického rozkladu z hlediska produkce CO ₂ a CH ₄ v plynné fázi a množství rozpuštěného CO ₂ v kapalně fázi	50
5.4.3.5	Stupeň biologického rozkladu na základě hmotnostního úbytku	50
5.4.4	Biodegradace v aerobních podmínkách	51
5.4.4.1	Procentuální zastoupení C v CO ₂	51
5.4.4.2	Hmotnost uhlíku z hodnoty produkce CO ₂ zjištěné respirometrem	51
5.4.4.3	Procentuální odstranění substrátu dle produkce CO ₂	51
5.4.5	Hydrolýza.....	52
5.4.5.1	Stupeň hydrolýzy stanovený na základě množství rozpuštěného uhlíku (DOC) v kapalně fázi	52
6	VÝSLEDKY A DISKUSE	53
6.1	TEST BIODEGRADACE V ANAEROBNÍCH MEZOFILNÍCH PODMÍNKÁCH	53
6.1.1	Charakteristika anaerobního mezofilního kalu a inokula.....	53
6.1.2	Biodegradace za anaerobních mezofilních podmínek.....	53
6.2	TEST BIODEGRADACE V ANAEROBNÍCH TERMOFILNÍCH PODMÍNKÁCH	57
6.2.1	Adaptace anaerobního mezofilního kalu (37 °C) na termofilní podmínky (55 °C).....	57
6.2.2	Biodegradace za anaerobních termofilních podmínek	58
6.2.2.1	Série 1	58
6.2.2.2	Série 2	61
6.3	TEST BIODEGRADACE V AEROBNÍCH PODMÍNKÁCH	65
6.3.1	Charakteristika aerobního kalu a inokula.....	65
6.3.2	Biodegradace za aerobních podmínek.....	65
6.4	TEST ABIOTICKÉ HYDROLÝZY	68
6.5	STUDIUM MORFOLOGICKÝCH ZMĚN TESTOVANÝCH FÓLIÍ	70
6.5.1	Diferenční skenovací kalorimetrie	70

6.5.2	Fourierova transformační infračervená spektroskopie.....	75
ZÁVĚR	78
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	80
SEZNAM OBRÁZKŮ	82
SEZNAM TABULEK	84
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	85

ÚVOD

Polymerní syntetické materiály jsou rezistentní vůči biologickému odbourávání a to zejména proto, že mikroorganismy nejsou schopny si vytvořit příslušný enzymový aparát.¹⁻² V roce 1980 začali vědci navrhovat polymerní materiály, které by byly schopné biologického rozkladu v environmentu. Tyto materiály jsou odvozeny od látek, jež jsou schopné podléhat mikrobiálnímu rozkladu.¹

Biodegradovatelné plasty jsou na trhu v menším měřítku oproti klasickým syntetickým materiálům, jejichž výroba vychází zejména z petrochemického zpracování. Bioplastické materiály představují levnější a ekologičtější metodu výroby plastů a to proto, že cena ropy, z níž vzniká převážná většina syntetických plastů, stále roste. Takové biodegradovatelné polymerní materiály se mohou používat ve stejných oblastech jako ty syntetické, to znamená například jako obalové materiály, kde se bez problémů dá použít místo polyethylenové tašky (syntetický materiál) taška z polykyseliny mléčné (přírodní materiál, bioplast).²

Plasty schopné biodegradace byly navrženy právě proto, aby byly schopny degradovat v přirozeném prostředí či v zařízeních na zpracování odpadu.³ Polymery, zvláště pak plasty jsou potenciálním substrátem pro heterotrofní mikroorganismy. Samotné biologické odbourávání je pak řízeno několika faktory, jako je charakteristika polymeru, typ organismu a typ prostředí, v němž má biodegradace probíhat.¹⁻²

I. TEORETICKÁ ČÁST

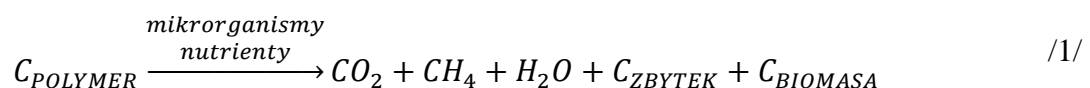
1 BIODEGRADACE

Biodegradace neboli biologický rozklad je speciálním případem degradace, při níž všeobecně dochází k odbourávání organické látky. V našem případě se biodegradací rozumí rozklad polymerů působením biologických činitelů.^{1,4}

Biologickými činiteli jsou převážně organismy, respektive mikroorganismy, které produkcí enzymů rozkládají daný substrát, jímž v tomto případě je polymer. Mikroorganismy tak tvoří tzv. biotickou složku.⁵ Nicméně k degradaci polymerů přispívají i tzv. abiotické složky prostředí.⁶ Tyto složky jsou charakterizovány fyzikálními a chemickými parametry a řadíme mezi ně například záření, tepelnou degradaci či hydrolyzu.⁵⁻⁶

1.1 Anaerobní biodegradace

Jedná se o biodegradaci bez přístupu vzduchu, tedy biodegradaci za anaerobních podmínek, odtud tedy anaerobní biodegradace. Při této biodegradaci dochází k rozkladu substrátu za vzniku metanu (CH₄), oxidu uhličitého (CO₂), vody (H₂O), zbytkového uhlíku a nové biomasy. Tento proces můžeme znázornit následující všeobecnou rovnicí /1/.⁶



Anaerobní vyhnívání je oproti aerobní fermentaci, kde jako příklad můžeme uvést kompostování, výhodnější. Hlavní výhodou, jak už bylo naznačeno, je vznik bioplynu obsahující převážně CH₄ (až 80 %), CO₂ (20 %) a v menší míře další plyny jako je sulfan, vodík, dusík. Bioplyn se následně využívá jako zdroj energie.⁷⁻⁸

Pro anaerobní vyhnívání je důležitá i hodnota oxidačně redukčního potenciálu, která se v tomto případě musí pohybovat v záporných hodnotách (pod -100 mV). Dalším vlivem, který vede ke správnému anaerobnímu pochodu je vzájemná spolupráce mikroorganismů. V různých fázích anaerobního pochodu působí na daný systém jiné mikroorganismy, přičemž jednotlivé kroky musí být v rovnovážném stavu. Proto vzájemná spolupráce a souhra těchto mikroorganismů hraje důležitou roli.⁸⁻⁹

1.1.1 Fáze anaerobní biodegradace

Jak už bylo řečeno, tak anaerobní rozklad je souborem několika na sebe navazujících procesů. V zásadě rozlišujeme 4 fáze anaerobního rozkladu organických látek.³

a) Hydrolýza

V první fázi, tedy v tzv. hydrolýze, dochází k rozkladu makromolekulárních látek na menší celky, jako jsou oligomery či monomery. K tomuto rozkladu dochází vlivem *fermentačních mikroorganismů*, které produkují extracelulární hydrolytické enzymy. Vzniklé produkty jsou potom rozpustné ve vodě a jsou schopny transportu do buňky, v níž probíhají další přeměny.^{3,9-10}

b) Acidogeneze

Zde dochází k dalšímu zpracování hydrolytických produktů na jednodušší organické látky, jako jsou organické kyseliny, alkoholy, CO₂ a vodík. Tento rozklad zapříčiňují *acidogenní mikroorganismy*.^{3,9-11}

c) Acetogeneze

Dochází k oxidaci předchozích produktů na CO₂, H₂O a kyselinu octovou. Působením *acetogenních mikroorganismů* tak vznikají prekursory tvorby methanu.^{3,9-11}

d) Methanogeneze

Závěrečná fáze anaerobní biodegradace, v níž činností *methanogenních mikroorganismů* dochází ke vzniku methanu, právě z prekursorů, které byly vyrobeny v kroku acetogeneze.^{3,9-11}

1.1.2 Skupiny anaerobních mikroorganismů

Tato kapitola přibližuje mikroorganismy, které jsou zodpovědné za anaerobní proces.

a) Hydrolytické a fermentační mikroorganismy

Jak už z pojmenování mikroorganismů vyplývá, jedná se o mikroorganismy odpovědné za hydrolýzu a acidogenezi, tedy za první dva kroky anaerobního procesu. Jedná se o rychle rostoucí a vůči změnám podmínek odolné mikroorganismy, jež produkují enzymy, které jsou uvolňovány do média a způsobují rozklad organických látek na menší fragmenty. Vzniklé fragmenty jsou schopny transportu dovnitř buněk a jejich fermentací vznikají re-

dukované produkty, jako jsou nižší mastné kyseliny, ethanol, kyselina mléčná a tak dále.¹⁰⁻¹¹

Konečné produkty metabolismu těchto mikroorganismů, kam řadíme čeledě *Streptococcaceae*, *Enterobacteriaceae* nebo například rod *Clostridium*, jsou závislé na počátečním substrátu a na vnějších podmínkách.¹¹

b) Acetogenní mikroorganismy

Přítomnost acetogenních mikroorganismů je při anaerobních procesech důležitá. Tyto mikroorganismy zapříčiňují přeměnu vyšších organických kyselin na kyselinu octovou, CO₂ a vodík. Vodík vznikající vlivem acetogenních mikroorganismů, způsobuje jejich inhibici, proto musí být ze systému odstraněn. K jeho odstranění napomáhají hydrogentrofní mikroorganismy.¹¹⁻¹²

c) Homoacetogenní mikroorganismy

Mikroorganismy rostoucí na víceuhlíkatých i jednoduhlíkatých substrátech. Netvoří vodík, ba naopak jsou schopny jej spotřebovávat a tím udržují nízké hodnoty vodíku v systému.¹¹⁻¹²

Mezi homoacetogenní mikroorganismy řadíme především *Clostridium thermoacetikum* a *Acetobacterium woodi*. Tyto zmíněné druhy homoacetogenních mikroorganismů byly identifikovány v městských anaerobně stabilizovaných kalech.¹¹⁻¹²

d) Desulfatační a denitrifikační mikroorganismy

Skupiny mikroorganismů rostoucí na víceuhlíkatých substrátech a využívající jako akceptor elektronů sírany nebo dusičnany za tvorby kyseliny octové, vodíku, sulfanu a amoniaku. Tyto vznikající produkty slouží jako methanogenní substráty při samotném procesu methanogeneze. Nicméně za určitých podmínek jsou desulfatační a denitrifikační bakterie schopny methanogenní substráty spotřebovávat a tím tvoří konkurenci právě pro methanogenní mikroorganismy.¹¹⁻¹²

e) Methanogenní mikroorganismy

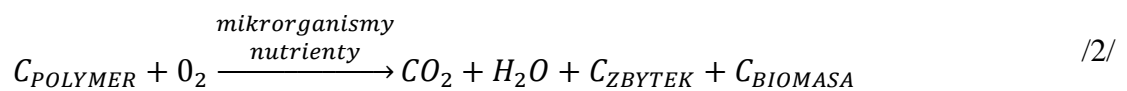
Methanogenní mikroorganismy završují anaerobní proces rozkladu organické látky. V této fázi, jak už bylo řečeno výše, dochází ke vzniku plynné fáze, bioplynu, z předchozích produktů obsahující uhlík.¹¹⁻¹²

1.2 Aerobní biodegradace

Aerobní biodegradace vyžaduje přítomnost kyslíku pro oxidaci sloučenin do jejich minerální podoby, jako CO_2 , H_2O , SO_2 , P_2O_5 a podobně.⁶ Enzymatický systém přítomných mikroorganismů vyžaduje přítomnost kyslíku. Aerobní biodegradace je katalyzována oxigenázami, které jsou schopny včlenit kyslík do substrátu a peroxidázami.¹³

Mezi aerobní biodegradaci řadíme například kompostování, při němž jsou organické látky rozkládány na CO_2 , H_2O , minerální soli a humus.¹³

Pokud bychom se tedy zaměřili na biorozklad polymeru, mohli bychom takový proces popsat pomocí rovnice /2/.⁶



1.3 Faktory ovlivňující biodegradaci

Anaerobní i aerobní biodegradace je ovlivňována vnějšími podmínkami prostředí, přičemž anaerobní procesy jsou na změny těchto vnějších podmínek více citlivé oproti aerobním procesům.¹⁰ V následujících řádcích jsou popsány základní faktory, které ovlivňují biodegradaci.

1.3.1 Teplota

Teplota je jeden z nejvýznamnějších faktorů, který ovlivňuje růst mikroorganismů, jejich morfologii, metabolismus či případnou patogenitu. Každý druh mikroorganismu má svou optimální růstovou teplotu, což je teplota, při níž dochází k rychlému růstu tohoto mikroorganismu.⁵

Podle toho jakým teplotám dávají mikroorganismy přednost, je dělíme do třech základních skupin na:

- a) *psychrofilní*, které rostou při teplotách nižších než 20 °C,
- b) *mezofilní*, jejichž optimální růst je mezi 20 °C až 40 °C,
- c) *termofilní* preferující rozmezí teplot 45 °C až 60 °C.^{5,10}

1.3.2 pH

pH je faktor prostředí, který je zásadní pro růst a přežívání. Optimální pH růstu je často v rozmezí 6,5 až 7,5, zejména u bakterií. Nicméně hodnoty pH jsou často různorodé, můžeme se pohybovat jak v rozmezí kyselého pH, tak i zásaditého.

Z tohoto pohledu rozeznáváme dva druhy mikroorganismů:

- a) *acidofilní druhy* preferující kyselé pH prostředí,
- b) *alkalifilní druhy*, které dávají přednost zásaditému pH prostředí.^{5,14}

1.3.3 Složení substrátu

Substrát má sloužit jako živina pro přítomné mikroorganismy, z tohoto důvodu zde musí být přítomen substrát, který je schopen enzymového rozkladu.¹⁰

V našem případě zde jako substrát bude sloužit polymerní látka, proto je důležité znát její strukturu, tedy její funkční skupiny a substituenty, popřípadě přísady v polymeru. Už dle této znalosti můžeme usoudit, zda bude daný polymer vhodným substrátem pro přítomné mikroorganismy a tudíž, jestli jej budou rozkládat.¹

Je také důležité, aby při anaerobních i aerobních procesech byly v inokulu přítomné biogenní prvky, jako příklad si můžeme uvést NH_4^+ , PO_4^{3-} , Ca^{2+} či K^+ .¹⁰⁻¹¹

1.3.4 Kyslík

Pro aerobní procesy je důležitá přítomnost kyslíku, bez jeho přítomnosti by mikroorganismy hynuly a proces by neprobíhal správně. Naopak u anaerobních procesů je důležitá absence kyslíku, ten je totiž pro anaerobní mikroorganismy toxický. Nicméně nízká koncentrace vzdušného kyslíku, je ihned odstraňována přítomnými fakultativně anaerobními mikroorganismy, tudíž nezpůsobuje výrazné potíže.^{2,10-11}

1.4 Srovnání aerobní a anaerobní biodegradace

Nespornou výhodou anaerobních procesů před aerobními procesy, jak už bylo řečeno, je transformace a využití odpadních organických látek do nového energeticky výhodného produktu, *bioplynu*. Tato skutečnost vychází z bilance energie a uhlíku při jednotlivých procesech.¹¹

U aerobních procesů je 60 % energie, která byla původně obsažena v substrátu, spotřebováváno na syntézu nové biomasy, a zbylých 40 % se ztrácí jako reakční teplo. Při anaerob-

ních procesech je skoro celá energie původního substrátu zachována ve vzniklém bioplynu, toto procento činí až 90 %. Další část energie je spotřebována pro růst nové biomasy (5-7 %) a taktéž dochází ke ztrátám ve formě reakčního tepla (3-5 %).¹¹

Co se týká srovnání aerobních a anaerobních procesů vzhledem k bilanci k uhlíku, tak u aerobních procesů je vznik biomasy a oxidu uhličitého ze substrátu rovnoměrný, to znamená, že 50 % uhlíku je přeměňováno na biomasu a 50 % na oxid uhličitý. Naopak u anaerobních procesů je převážná část, 95 %, uhlíku zabudována do bioplynu a pouze 5 % do nárůstu biomasy.¹¹

2 BIODEGRADOVATELNÉ POLYESTERY

Polyestery jsou polymery vytvořené z kyseliny dikarboxylové a diolu za vzniku esterové vazby. Jedná se o velmi významné polymery, které nacházíme v různých odvětvích, například se z nich vyrábějí vlákna pro šatstvo nebo slouží k výrobě obalového materiálu.¹⁵

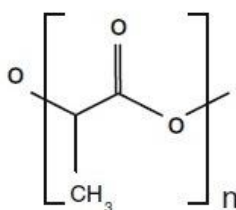
Polyestery dle chemické struktury dělíme na aromatické a alifatické polyestery. *Aromatické polyestery* mají dobré mechanické vlastnosti a dají se pokládat za téměř rezistentní polymery, to znamená, že odolávají působení mikroorganismů. *Alifatické polyestery* jsou velmi důležité vzhledem k jejich schopnosti biologické degradace, označujeme je za biopolymery. Nicméně alifatické polyestery mají horší mechanické vlastnosti, které jsou důležité vzhledem k jejich použití. Nejlepším způsobem pro zachování všech pozitivních vlastností, je kombinace aromatických a alifatických polyesterů.¹⁶

2.1 Vybrané druhy alifatických polyesterů

V následujících kapitolách budou uvedeny příklady alifatických polyesterů.

2.1.1 Kyselina polymléčná (PLA)

Kyselina polymléčná (PLA, *angl. polylactic acid*) je biodegradovatelný termoplast patřící mezi lineární alifatické polyestery.^{1,17} Tato kyselina /Obr. 1/ vzniká polykondenzací přirozeně produkované kyseliny mléčné. Dalším možným způsobem vzniku kyseliny polymléčné je katalytické rozpojení laktidového kruhu.^{1,18}



Obr. 1: Chemická struktura PLA¹⁹

Existují tři prostorové izomery kyseliny mléčné:

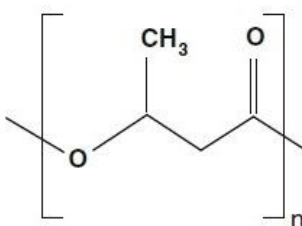
- L-mléčná kyselina,
- D-mléčná kyselina,
- D,L-mléčná kyselina.

Vlastnosti PLA závisí na optické čistotě. Například L-polymléčná kyselina je semikrystalická s teplotou tání (T_m) okolo 180-184 °C. Stupeň krystalinity a teplota tání klesá se snižující se čistotou.⁶

PLA je díky své dobré biosorpci a biokompatibilitě v lidském těle využívána v lékařství, zejména jako vstřebávací chirurgické nitě. Její další možné použití je v zemědělství a to jako mulčovací fólie, také se používá pro výrobu recyklovatelných pytlů a pro výrobu textilních vláken. Způsobem zpracování je možno z PLA vyrábět pohárky, kelímky, láhve apod., tyto výrobky získáme vyfukováním, či květináče a přístroje, které získáme vstřikováním.²⁰

2.1.2 Polyhydroxybutyrát (PHB)

Polyhydroxybutyrát (PHB, *angl. poly(3-hydroxybutyrate)*) je přírodní polymer produkovaný mnoha bakteriemi, slouží u nich jako zásobárna uhlíku a energie. Tento polymer přitahuje výzkum a celosvětové obchodní zájmy, jelikož může být syntetizován z obnovitelných levných produktů.¹⁷ Chemická struktura tohoto polymeru je znázorněna na Obr. 2.



Obr. 2: Chemická struktura PHB¹⁹

Mikroorganismy vytvářejí v nepříznivých podmínkách růstu zásobní materiály na bázi uhlíku. Tímto způsobem syntetizují poly(3-hydroxybutyrát) různé druhy bakterií, jako příklad můžeme uvést *Bacillus magaterium* či *Pseudomonas olveovorans*.^{17,21}

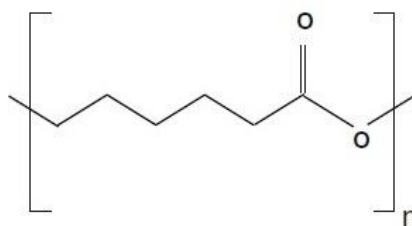
PHB z makroskopického hlediska patří mezi semikrystalické polymery se stupněm krystalinity 55-85 %, tvoří tenké laminární krystaly, které jsou organizované do destičkového tvaru, teplota tání (T_m) se pohybuje v rozmezí 168 -182 °C.²¹

Anaerobní rozklad tří lineárních polyesterů – PHB, PCL (polykaprolakton) a PHBV, což je kopolymer PHB/PHV (polyhydroxyvalerát) byl sledován ve studii Abou-Zeida a kolektivu. Testované vzorky byly podrobeny anaerobnímu rozkladu po dobu 42 dnů při 37 °C. Jako

anaerobní prostředí sloužil anaerobně vyhnílý kal z anaerobních laboratorních reaktorů. Nejvyšší stupeň rozkladu byl zaznamenán u samotného PHB, který byl zcela degradován do 9 dnů, PHBV byl rozložen z 29 % po 42 dnech testování. Rozklad v anaerobních podmínkách PHB byl rychlejší ve srovnání s PHBV, kdežto za aerobních podmínek dochází k rychlejšímu rozkladu PHBV. Pomalejší rozklad PHBV v anaerobních podmínkách byl v této studii zdůvodněn nepříznivým vlivem depolymeračního produktu, 3-hydroxyvalrové kyseliny, na růst anaerobních mikroorganismů.²²

2.1.3 Polykaprolakton (PCL)

Chemická struktura polykaprolaktonu (PCL, *angl. poly(ϵ -Caprolactone)*) je znázorněna na Obr. 3. Jedná se o biodegradabilní syntetický semikrystalický polyester s nízkým bodem tání (60 °C) a teplotou skelného přechodu (T_g) okolo -60 °C.¹⁷



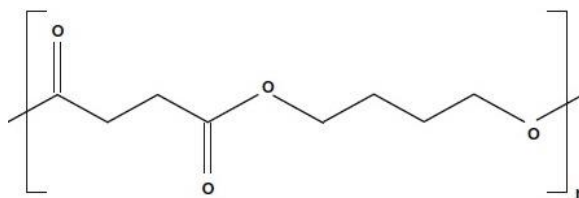
Obr. 3: Chemická struktura PCL¹⁹

Pro lepší zpracovatelské a mechanické vlastnosti je PCL míchán s pryskyřicemi, může být plněn anorganickými částicemi či se může přidávat škrob. Škrob se získává z různých plodin jako je kukuřice, rýže či brambory, kdy typ škrobu ovlivňuje výsledné vlastnosti polymeru i stupeň biodegradace, protože škrob mikroorganismy rozkládají přednostně.²³

Biodegradace PCL byla testována v různých prostředích, jako jsou sedimenty z řeky, jezera, čistírenské kaly, půda i kompost. Ve studiu Hubáčkové²³ a kolektivu bylo zjištěno, že biodegradace PCL v anaerobním prostředí je ovlivněna teplotou, molekulovou hmotností a stupněm krystalinity polymeru, přičemž vyšší stupeň degradace byl dosažen za vyšších teplot. V této studii byl sledován vliv různých typů škrobů na degradaci PCL v mezofilních podmínkách.²³

2.1.4 Polybutylensukcinát (PBS)

Polybutylensukcinát (PBS, *angl. poly(butylene succinate)*) je řazen mezi alifatické polyestery s bodem tání v rozmezí 112-114 °C. PBS /Obr. 4/ je syntetizován z dikarboxylových kyselin a glykolu.¹⁸

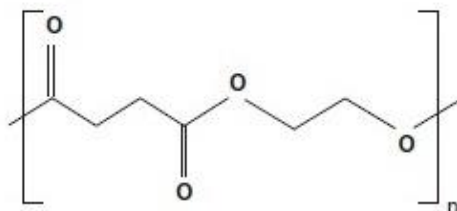


Obr. 4: Chemická struktura PBS¹⁹

Existuje široká škála mikroorganismů se schopností degradovat PBS v prostředí, nicméně procentuálně je těchto mikroorganismů méně, než mikroorganismů se schopností degradovat PCL.¹⁸ Samozřejmě probíhaly studie, které se zabývaly právě degradací PBS v prostředí a zjišťováním, které mikroorganismy jsou schopny degradovat tento polymer. Přítomností a působením *Amycolatopsis* sp. dochází k degradaci PBS, ale také PHB a PCL. K degradaci PBS dochází také vlivem termofilních aktinomycet.^{17,24}

2.1.5 Polyethylensukcinát (PES)

Polyethylensukcinát (PES, *angl. poly(ethylene succinate)*) stejně tak jako PBS patří mezi alifatické syntetické polyestery, jehož bod tání je v intervalu 103-106 °C. Taktéž vzniká syntézou dikarboxylové kyseliny a glykolu. Chemická struktura PES je znázorněna na Obr. 5.¹⁷



Obr. 5: Chemická struktura PES¹⁹

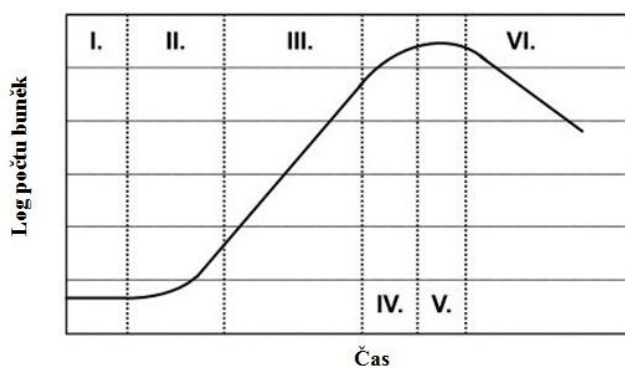
PES se připravuje reakcí anhydridu sukcinátu s etylenoxidem nebo polykondenzací kyseliny jantarové s etylenglykolem. Na rozdíl od mikrobiálních polyesterů, u nichž je biodegradace v různých prostředích víc než pravděpodobná, bylo u PES zjištěno, že jeho rozlo-

žitelnost v prostředí silně závisí na okolním prostředí. A navíc škála mikroorganismů rozkládající PES je užší oproti škále mikroorganismů, které může nalézt například při degradaci PHB či PCL.^{17,25-26}

3 BIODEGRADACE POLYMERŮ

Biodegradace polymerů může probíhat v různých prostředích, jako je půda, vodné prostředí, kompost, fermentaci v bioplynové stanici či v procesu skládkování. Každé z těchto prostředí je jiné, proto se zde vyskytují různé mikroorganismy a na biodegradaci působí různé okolní podmínky. Dané podmínky a přítomnost daného materiálu (substrátu) ovlivňují růst mikroorganismů, kteří jsou činiteli při biodegradaci. Jako nejvíce stimulující podmínky pro růst mikroorganismů je přítomnost vody, tedy vodné prostředí, a nepřítomnost přímého světla.²⁷

Růst a množení mikroorganismů lze znázornit tzv. *růstovou křivkou mikroorganismů*, jejíž průběh lze vidět na *Obr. 6*.¹⁴



*Obr. 6: Růstová křivka mikroorganismů*¹⁴

Na obrázku růstové křivky mikroorganismů si můžeme všimnout, že tato křivka je rozčleňena do několika fází.

a) **I. lagová fáze**

V této fázi dochází k zaočkování prostředí danými buňkami, přičemž tyto buňky se musí přizpůsobit prostředí, do něhož byly naočkovány a postupně se připravují na množení. Doba, po kterou lagová fáze trvá je ovlivněna prostředím, do něhož buňky byly vneseny, na druhu mikroorganismu, na jeho stáří a na fyziologickém stavu mikroorganismů.^{14,28}

b) **II. fáze zrychleného růstu**

Tempo růstu mikroorganismů je postupně zvyšováno a ke konci této fáze je tempo růstu maximální a dochází k plynulému navázání na fázi III. Faktory ovlivňující tuto fázi, jsou podobné s faktory v I. fázi.^{14,28}

c) III. logaritmická fáze

Buňky se dělí nejvyšší možnou rychlostí, tempo růstu zůstává maximální a to až do doby, kdy se koncentrace substrátu přibližuje k mezní hodnotě.^{14,28}

d) IV. fáze zpomaleného růstu

Tato fáze nastává, je-li dosaženo minimální koncentrace substrátu. Rychlost růstu závisí na přítomnosti a koncentraci daného substrátu, nicméně je to fáze, kdy dochází k vyčerpání veškerých živin.^{14,28}

e) V. stacionární fáze

V této fázi nejsou přítomny žádné živiny. Buňky se již nemnoží a nerostou. Množství buněk zůstává po určitou dobu konstantní, ale koncentrace celkové biomasy je snižována. Taktéž dochází k hromadění odpadních produktů.^{14,28}

f) VI. fáze odumírání

Nepřítomnost živin a nahromadění odpadních produktů způsobují odumírání mikroorganismů.^{14,28}

Průběh růstové křivky nám naznačuje, jak by asi mohl vypadat průběh při biodegradaci polymerů, jelikož při testování dochází k naočkování testovaného prostředí mikroorganismy, proto i zde je určitá lagová fáze, než se mikroorganismy přizpůsobí danému prostředí. A polymer, jakožto testovaná látka, slouží jako substrát pro dané mikroorganismy společně s látkami potřebnými pro růst. Dochází k postupnému odčerpávání látek, až nastane minimální koncentrace substrátu a nakonec dojde k hromadění odpadních produktů a odumírání buněk.

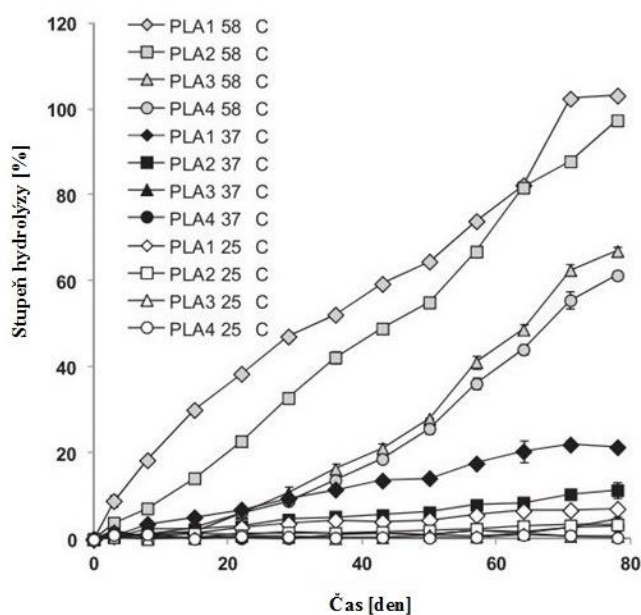
3.1 Hydrolýza polyesterů

Degradace ve vodném prostředí probíhá skrze hydrolýzu esterové vazby následujícím způsobem. Voda nejdříve vstupuje do amorfních částí polymeru, které jsou přístupnější pro průnik vody než krystalické části. Tak je docíleno hydrolytické degradace amorfních částí polymeru. Po degradaci amorfních částí polymeru je voda schopna vstupovat do krystalických částí polymeru a tím hydrolyzovat tuto část polymeru. S úbytkem krystalických částí polymeru, dochází i ke zpomalení hydrolýzy.²⁹

Poměr hydrolýzy závisí na koncentraci polymerních skupin, vodě a na kyselých produktech vznikajících během hydrolýzy, přičemž tyto kyselé produkty mohou dále katalyzovat reakci.³⁰

Degradace polyesterů mikroorganismy je zahájena extracelulárními hydrolázami, které jsou vylučovány mikroorganismy a napomáhají tak biodegradaci. Polyestery jsou napadeny hydrolázami vylučovanými z mikroorganismů, ať už mluvíme o polyesterech na bázi přírodních látek či syntetických polyesterech.³¹

Abiotická hydrolýza představuje první kroky v PLA biodegradaci, ale spolehlivé údaje dokumentující tuto domněnku nejsou běžně dostupné. V následující studii, Husárová a kolektiv, byla sledována abiotická hydrolýza čtyř vzorků PLA různých molekulových hmotností při třech různých teplotách (25 °C, 37 °C a 58 °C). Jako vzorky PLA byly použity vzorky PLA1 ($M_w=34\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) a PLA2 ($M_w=61\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) byly syntetizovány polykondenzací L-kyseliny mléčné, PLA3 ($M_w=109\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) byl zakoupen od NatureWorks® Ingeo™ (USA) a PLA4 ($M_w=160\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) z VUCHV a. s. (Svit, Slovenská republika). Vzorky PLA ve formě prášku byly smíchány s fosforečnanovým pufrům o pH 7 v trojím provedení pro každou teplotu, aby byl reprezentován vliv abiotické hydrolýzy, byla do testovacích lahví přidána látka potlačující růst mikroorganismů, konkrétně se jednalo o azid sodný (NaN_3). V pravidelných časových intervalech bylo odebráno 1,5 ml vzorku, který byl odstředěn a supernatant byl analyzován na rozpuštěný organický uhlík. Procento hydrolyzujícího polymeru pro stanovený časový interval bylo vypočítáno z množství rozpuštěného uhlíku a počátečního množství materiálu. Získané výsledky jsou znázorněny na *Obr. 7*, kde můžeme vidět, že hydrolýza testovaných vzorků rostla s teplotou, to znamená, že čím vyšší teplota, tím je dosaženo vyššího stupně hydrolýzy PLA. Tento efekt by mohl být rozhodující pro dobrou biologickou odbouratelnost.³²



Obr. 7: Stupeň hydrolyzy pro vzorky PLA při různých teplotách³²

3.2 Biodegradace PLA

Pranamuda s kolektivem byli prvními, kteří se zabývali mikrobiální biodegradací PLA v půdním prostředí za využití *Amycolatopsis* sp. Tato studie zkoumala distribuci mikroorganismů schopných degradovat PLA. Mikroorganismy pro rozklad PLA byly kultivovány na agaru, přičemž úspěšně byla izolována aktinomyceta HT-32, která byla zařazena do rodu *Amycolatopsis* a podrobila se růstu na kvasnicovém agaru. PLA bylo podrobeno rozkladu za působení *Amycolatopsis* sp. s pozitivními výsledky, to znamená, že PLA se působením *Amycolatopsis* sp. rozkládá. Z čehož můžeme usoudit, že PLA se v půdním prostředí a působením *Amycolatopsis* sp. bude odbourávat, i když v menším měřítku a pomalu.³³

Od tohoto poznatku probíhaly další studie zabývající se mikrobiální a enzymatickou degradací PLA. Enzymatickou degradací se zabýval například William, který pro degradaci PLA použil proteinázu K, bromelain a pronásu. Proteináza K byla získána z *Tritirachium album* a projevila se jako enzym, který ve většině případů dobře rozkládá PLA. Proteináza K a další proteázy na bázi serinu byly schopné degradovat L-PLA a DL-PLA, nicméně u D-PLA již tuto možnost nemá. Proteináza K přednostně hydrolyzovala amorfní část L-PLA, přičemž poměr degradace byl snižován se zvyšující se krystalinitou.^{17,34} Fukuzaki s kolektivem prohlásil, že degradace PLA oligomerů byla zrychlena esterázovými enzymy, zvláště pak lipásami *Rhizopus delemar*.³⁵

3.2.1 Anaerobní biodegradace polymerů ve vodném prostředí

Anaerobní biodegradace byla již přiblížena v kapitole 1.1. Zde bych pouze znovu zopakovala základní poznatky této problematiky.

Anaerobní biodegradace je definována jako biologická přeměna bez přítomnosti kyslíku, kdy akceptorem elektronů mohou být například dusičnany či sulfáty. Při tomto anaerobním procesu dochází k přeměně organického uhlíku převážně na CO_2 a CH_4 . V menší míře vzniká dusík, oxidy dusíku, vodík, amoniak a další látky. Směs těchto produktů označujeme jako bioplyn.^{6,22}

Anaerobní biodegradaci ve vodném prostředí rozumíme anaerobní biodegradaci v anaerobním kalu, který slouží jako vodné prostředí. Biodegradace v takovém prostředí může být zkoumána při různých teplotních podmínkách – mezofilních (20-40 °C) a termofilních (45-60 °C).⁷⁻⁸ Metody určené pro stanovení anaerobní biodegradace jsou založeny na měření množství vznikajících produktů. Mezi tyto produkty řadíme buď to konečný produkt (bioplyn) nebo sledujeme meziprodukty, jako jsou těkavé mastné kyseliny.³⁶

Většina metod je založena na sledování produkce bioplynu. Produkce bioplynu může být měřena jeho objemovým zvýšením pod konstantním tlakem (objemová metoda), měřením tlaku při konstantním objemu (manometrická metoda) či měřením pomocí plynové chromatografie (GC). Pro stanovení anaerobní biodegradace lze také použít metodu úbytku hmotnosti polymeru.³⁶

Metodiky plynové chromatografie mohou být rozděleny do dvou skupin dle použitého detektoru:

- a) použitím GC s *tepelně vodivostním detektorem* (TCD), měříme obě hlavní složky bioplynu a to tedy CH_4 a CO_2 ,
- b) použitím GC s *plamenově ionizačním detektorem* (FID) měříme pouze vyprodukovaný CH_4 .

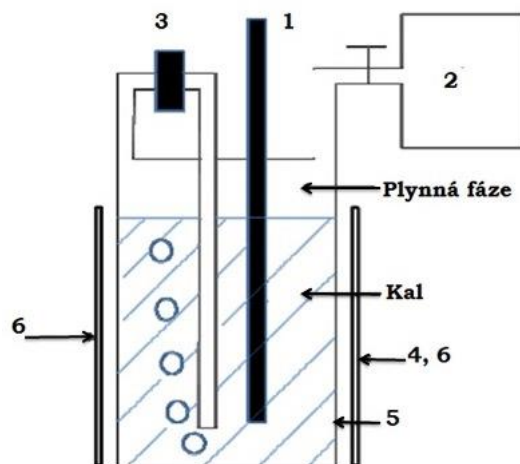
3.2.1.1 Anaerobní biodegradace PLA za různých teplotních podmínek ve vodném prostředí

Zde bych ráda zmínila studii Yagiho a kolektivu, v níž byla testována biodegradace PLA za mezofilních i termofilních podmínek v anaerobním kalu.⁸

Kal byl získán z bioplynové stanice, kde vznikl z kravského hnoje a rostlinného odpadu fermentací při 37°C ve fermentační nádobě. Tento kal byl poté inkubován na mezofilní

podmínky (35 °C) a termofilní podmínky (55 °C). V průběhu převodu mezofilního kalu na kal termofilní byla sledována produkce bioplynu a procento methanu v bioplynu. Produkce bioplynu při 35 °C od počátku inkubace vzrůstala a procento vyprodukovaného metanu v bioplynu bylo okolo 60-70 %. Naopak produkce bioplynu při 55 °C byla v prvních dnech nižší a procento methanu bylo zpočátku v nižších hodnotách. Tento fakt můžeme odůvodnit tím, že pro přípravu kalu inkubovaného v termofilních podmínkách byl použit kal z mezofilních podmínek a při změně teplotních podmínek nejdříve došlo k úhynu mezofilních mikroorganismů či muselo dojít k adaptaci těchto mikroorganismů na termofilní podmínky. Vývoj bioplynu začal narůstat po 6 dnech a produkce methanu začala stoupat po 10 dnech, to byla právě doba potřebná k adaptaci mikroorganismů.⁸

Samotné testování probíhalo pomocí aparatury označené jako MODA-B /Obr. 8/. Kal a testovaný materiál, PLA, byly uzavřeny ve zkušební láhvi a inkubovány při dané teplotě. Kal byl promícháván odsáváním plynné fáze z horní části zkušební láhve. Vyvíjející se bioplyn byl odebírán do vzorkovacího vaku, kde byl měřen objem vyvinutého bioplynu pomocí injekční stříkačky. Teplota byla kontrolována pomocí teplotního čidla.⁸



Obr. 8: Aparatura MODA-B; (1) teplotní senzor, (2) vzorkovací vak, (3) pumpa, (4) obklopující obal, (5) zkušební láhev, (6) topidlo uvnitř obalu⁸

Během anaerobních mezofilních podmínek (35 °C) byla celulóza jakožto standard degradována z 80 % po 15 dnech testování, vzorky fólie PLA nebyly za těchto podmínek prakticky rozkládány. Při termofilních podmínkách (55 °C) byla celulóza rozložena z 80 % už ve 13 dnech a PLA bylo po 60 dnech rozloženo na 90 %.⁸

3.2.1.2 Anaerobní degradace PLA ve skládkových podmínkách

Ingeo je biopolymer na bázi kyseliny polymléčné, který je využíván v mnoha odvětvích. Po ukončení životnosti může být zpracováván kompostováním, skládkováním či spalováním.³⁷

Aby bylo možné studovat chování Ingea na skládkách byly provedeny dvě studie zaměřené na anaerobní biodegradaci PLA. Jako vzorky PLA byly použity vzorky amorfni i semikrystalické.³⁷

První test stimuloval podmínky skládkování. Tato anaerobní zkouška určovala biologickou rozložitelnost materiálu v prostředí skládky. K frakcím komunálního odpadu bylo přidáno malé množství koncentrovaného anaerobního kalu z anaerobní vyhnívací nádrže. Po přidání PLA (zkoušená látka) byl reaktor inkubován při pokojové teplotě (21 °C) po dobu 6 měsíců. Souběžně byl inkubován reaktor bez PLA a srovnávací reaktor, v němž byla místo PLA použita celulóza jako srovnávací látka. Tři zkušební série byly připraveny za různých vlhkostních podmínek - 49%, 55% a 65% vlhkost.³⁷

Srovnávací látka (celulóza) degradovala jak při 49% vlhkosti, tak i při 65% vlhkosti. Test při 55% vlhkosti nebyl jednoznačný, jelikož došlo k odumření mikroorganismů a test neprobíhal stejně jak při předchozích dvou pokusech. Složení bioplynu ve třech vlhkostních úrovních bylo zpočátku testování bohaté na CO₂ a ke konci testu byl bohatší na CH₄, jehož zastoupení bylo v průměru 55 obj. % v souladu s očekáváním pro tento výchozí produkt. U PLA neproběhla významná produkce bioplynu.³⁷

Druhý test byl označen jako anaerobní vyhnívání s vysokým obsahem sušiny. Norma pro tento test říká, že by se mělo testovat v termofilních podmínkách (52 °C) podobu 15-30 dní. Nicméně v tomto postupu byl test prováděn při teplotě 35 °C po dobu 170 dní, aby se lépe reprezentovaly podmínky na skládkách. V tomto testu bylo přidáno malé množství zkoušené látky k většímu množství vysoce aktivního inokula.³⁷

Po 15 dnech testování, byla celulóza rozložena už z 84 %. Semikrystalické vzorky PLA nepřinesly významnou produkci bioplynu a při rozkladu amorfni vzorků PLA došlo k malé produkci metanu při 35 °C. Bylo dospěno k závěru, že semikrystalické PLA za anaerobních mezofilních podmínek nepovede k významné produkci methanu, a že za těchto podmínek není žádná významná populace organismů, která by přímo degradovala PLA s vysokou molekulovou hmotností.³⁷

3.2.2 Aerobní biodegradace

Aerobní biodegradaci se rozumí rozklad organických látek v přítomnosti kyslíku za vzniku vody a CO₂. Bližší přiblížení této problematiky nalezneme v kapitole 1.2.

3.2.2.1 *Respirometrie*

Jedná se o jednu z mnoha metod, kterými lze sledovat aerobní biodegradace. Tuto metodu zde uvádím z toho důvodu, že byla použita v experimentální části diplomové práce.

Respirometrické stanovení probíhá v uzavřeném systému, v němž sledujeme změnu tlaku nebo změnu objemu plynné fáze. K těmto změnám dochází vlivem přestupu kyslíku do kapalné fáze.^{10,28}

Mezi standardní respirometrické metody patří standardní zředovací metoda biochemické spotřeby kyslíku. Při této metodě dochází v uzavřeném systému ke spotřebě organických sloučenin aerobními mikroorganismy, které přítomné organické sloučeniny využívají jako zdroj energie a zdroj uhlíku pro syntézu zásobních látek a tvorbu nových buněk. Rozložitelný substrát je odstraněn během prvních 48 hodin, jedna část je oxidována a zbývající druhá část je přeměňována na zásobní látky, jako jsou polysacharidy a lipidy.²⁸

Existuje široká škála respirometrů, zde bude zmíněno pouze základní dělení:

- a) dle *indikace spotřeby kyslíku*, kam patří respirometry založené na objemové změně či tlakové změně,
- b) dle *objemu reakční nádoby* na nízké a vysoké objemy,
- c) dle *provedení* na manuální a automatizované.²⁸

3.2.2.2 *Aerobní biodegradace PLA za různých teplotních podmínek*

Stejně tak jako anaerobní biodegradace, tak i aerobní biodegradace se dá testovat za různých teplotních podmínek. V následující studii byly zvoleny čtyři teploty pro testování biodegradace PLA za aerobních podmínek.¹⁸

Itävara s kolektivem studoval biodegradaci granulí PLA ve vodném aerobním prostředí metodou headspace. Do testovacích lahví (headspace láhve) byl vložen vzorek, k němuž bylo přidáno minerální solný roztok a mikrobiální inokulum. Takto přichystané láhve byly poté inkubovány při čtyřech zvolených teplotách a to při 25 °C, 37 °C, 55 °C a 60 °C. Tento teplotní rozsah by měl poukázat na to jaký vliv má teplota při biodegradaci na PLA. Bylo zjištěno, že za mezofilních podmínek (25 °C a 37 °C), prakticky nedochází

k biodegradaci a za dobu 210 dnů bylo vyprodukováno pouze 10 % teoretického množství CO₂. U termofilních podmínek (55 °C a 60 °C) byla zpočátku pozorována dlouhá lagová fáze, téměř 40 dnů. Nicméně poté došlo k významné biodegradaci, produkce CO₂ vzrůstala a míra mineralizace po 120 dnech inkubace byla téměř 90 %.¹⁸

3.3 Biodegradace směsí na bázi PLA

Pro lepší zpracovatelské vlastnosti a pro vylepšení celkových vlastností vznikajícího polymeru je využito přidavku různých aditiv (přídavných látek). Tato aditiva ovšem mohou zásadně ovlivnit biodegradabilitu výsledného materiálu. Na straně první by tato aditiva napomohla biodegradaci a tento proces urychlila, na druhé straně mohou být přidávána aditiva, která proces biodegradace znemožňují, dochází tak k tzv. *řízené biodegradaci*.³⁸⁻³⁹

Nejčastější přídavnou látkou ve směsi s kyselinou polymléčnou je škrob, který v této směsi působí jako plnivo, jeho použitím dochází ke snížení nákladů na zpracování této směsi. Škrob je relativně dostupný materiál, který jsme schopni získat z obnovitelných zdrojů a který je dobře rozložitelnou látkou.⁴⁰

PLA se může taktéž smíchávat s dalšími komerčně dostupnými polymery, jako jsou například polyglykoly, polyvinyl acetáty (PVA), polykaprolakton (PCL) či polyethylen (PE).⁴¹ Směs polymeru PLA s PCL, který je také řazen mezi rozložitelné polyestery, je velmi dobře rozkládající se směsí, jež přináší mírné zlepšení mechanických vlastností. Nicméně nemísitelnosti těchto dvou polymerů přináší značné potíže.⁴²

Ve studii Moura a kolektiv byla sledována biodegradace směsí PE s PLA a PE s PCL dvěma metodami, a to biochemickou spotřebou kyslíku v uzavřeném respirometru a metodou mikrobiálního růstu zkušebních mikroorganismů. Oba testy prokázaly, že směs obsahující PCL, je lépe rozkládána než směs obsahující PLA. Nicméně přidáním škrobu ke směsi PLA, byla navýšena biologická odbouratelnost této směsi.⁴¹

V další studii byl sledován úbytek hmotnosti polymerních filmů směsí PLA/PHB za podmínek kompostování. V této směsi byly také přítomny dva druhy změkčovadel, polyethylen glykol (PEG) a acetyl-tri-n-butyl citrát (ATBC). Vzorčky byly v kompostu zahrabány do hloubky 6 cm a takto připravené reakční nádoby byly inkubovány při 58 °C po dobu 35 dnů. Stupeň biodegradace byl vyhodnocen z hmotnostního úbytku dané fólie pomocí termogravimetrické analýzy. Po 7 dnech kompostování nebyly pozorované žádné významné úbytky hmotnosti, ve 14 dnech se rychlost rozpadu značně zvýšila pro všechny testované

vzorky, došlo k významnějšímu úbytku hmotností. Rozpad u směsi PLA/PEG byl rychlejší než u PLA/ATBC. Tato skutečnost může být zdůvodněna hydrofilní povahou PEG, na rozdíl od hydrofobního ATBC. To znamená, že u směsi PLA/PEG došlo k vyšší hydrolyze v polymerním řetězci a došlo k rozpadu na menší molekuly, které jsou přístupnější pro mikroorganismy přítomné v kompostu. Nicméně, směs PLA/PHB/ATBC byla rozkládána naopak rychleji než směs PLA/PHB/PEG, a to až do 65 % po 21 dnech. Toto chování může být vysvětleno vytvořením kyselinotvorných skupin během zpracování směsi PLA/PHB/ATBC, které jsou schopny podpořit hydrolyzu v polymerním řetězci a následně urychlit proces biodegradace. Samotné PLA filmy byly rozloženy z více než 85 % po 21 dnech a všechny ostatní testované materiály ukázaly hmotnostní úbytky vyšší než 90 % po 28 dnech.⁴³

Autorem Arrieta a jeho kolektivem byla sledována biodegradace za podmínek kompostování směsi PLA/PHB a limonenu (LIM), což je přírodní terpen, který byl použit jako změkčovač s cílem získat flexibilní filmy pro potravinové aplikace. Byly připraveny následující vzorky PLA, PLA/LIM, PHB, PLA/PHB, PLA/PHB/LIM, které byly podrobeny biodegradaci za podmínek kompostování po dobu 35 dní. Stupeň rozpadu byl vypočítán z váhového úbytku v různých dnech inkubace. Film PHB nebyl prakticky za těchto podmínek rozkládán, po 35 dnech kompostování jeho rozklad dle hmotnostního úbytku dosáhl pouze 1,5 %. PLA za těchto podmínek překročilo po 28 dnech hranici rozložitelnosti 90 %, nicméně směs PLA/PHB tuto hranici překročila až po 35 dnech. Ve směsi PLA/PHB/LIM byl pozorován znatelný vliv přidaného limonenu. V porovnání se směsí PLA/PHB, u níž byla biodegradace po 21 dnech 12 %, tak ve směsi s limonenem byl prokázán dvakrát vyšší poměr rozpadu. Ve 28 dnech biodegradace směsi PLA/PHB/LIM byla již překročena hranice rozložitelnosti 90 %, zatímco směs PLA/PHB byla za stejnou dobu rozložena pouze z 50 %. Může být tedy usouzeno, že přidávek limonenu navyšuje stupeň biodegradace.⁴⁴

Jako další možná aditiva se mohou používat anorganická aditiva, která zlepšují mechanické a fyzikální vlastnosti PLA. Nejznámějšími anorganická aditiva jsou silikáty (SiO_2) či uhličitán vápenatý (CaCO_3). Využívají se jako plniva v polymerech, tím snižují náklady na zpracování. SiO_2 dává kyselou reakci a můžeme očekávat, že urychlí tepelnou degradaci, jelikož dochází k urychlení rozštěpení řetězce polyesteru. Tato skutečnost může být prospěšná pro následující biodegradaci kompostování, kde je nižší pH. Naopak CaCO_3 dává reakci alkalickou a může tak redukovat aciditu karboxylových skupin, které jsou vytvořeny během tepelné degradace a mohou katalyzovat hydrolyzu esterových vazeb během zapracování.

vání a tak redukovat degradaci. Tato výhoda během zpracování může následně snížit poměr biodegradace, což přináší samozřejmě značnou nevýhodu.⁴⁵

Pokud bychom chtěli záměrně potlačit biodegradaci z důvodu delší životnosti výrobku, je možno ke směsi PLA přidat činidla potlačující hydrolýzu, která má zásadní vliv na biodegradaci. V práci Stloukal⁴⁶ a kolektiv byl sledován vliv antihydrolyzačního činidla na bázi karbodiimidu. Konkrétně bylo použito činidlo, které můžeme nalézt pod komerčním názvem ZIKA-AH362 vykazuje mimořádné antihydrolyzační vlastnosti ve všech typech polymerů s amidovou nebo esterovou skupinou. Činidlo bylo součástí fólie PLA, a byl sledován vliv tohoto činidla během termického procesu, abiotické hydrolýzy a při kompostování. Vliv tohoto aditiva byl porovnáván s nemodifikovaným polymerem. Antihydrolyzační činidlo se prokázalo jako účinný stabilizátor během termického procesu. Taktéž bylo prokázáno, že toto aditivum zpomaluje biodegradaci během kompostování stejně tak jako abiotickou hydrolýzu.⁴⁶

4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bude sledování biodegradace směsné polymerní fólie ve vodném prostředí, jak v aerobních podmínkách, tak i v anaerobních podmínkách. Přičemž u anaerobních podmínek bude sledován i vliv teploty, tato biodegradace bude probíhat v mezofilních (37 °C) a termofilních (55 °C) podmínkách. Jako vodné prostředí bude použit aerobní, popřípadě anaerobní kal z čistírny odpadních vod Zlín-Malenovice. Současně s biodegradací bude sledována abiotická hydrolýza při těchto dvou zmíněných teplotách a to z toho důvodu, že hydrolýza a teplota zásadně ovlivňují stupeň biodegradace.

Směsná fólie, jejíž biodegradace bude sledována, je složena z kyseliny polymléčné (PLA), polyhydroxybutyrátu (PHB) a škrobu. Fólie byla získána ze Slovenské technické univerzity v Bratislavě, která společně s Ústavem polymerů ze Slovenské akademie věd tuto fólii vyrobila a patentovala.

Další zkoumanou fólií je fólie vyrobená z PLA s různými procentuálními přísadami anti-hydrolyzačního činidla na bázi aromatického karbodiimidu (prodáváno pod komerčním názvem ZIKA-AH362). U této fólie bude zkoumán vliv přítomného anti-hydrolyzačního činidla na biodegradaci ve vodném termofilním prostředí.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

5.1 Přístroje a zařízení

- Analytické váhy KERN, Německo
- Předvážky KERN, Německo
- Biologický termostat BT 120, Česká republika
- Vodní lázeň GFL 1092, Česká republika
- pH metr inoLab WTW 720, Německo
- Žíhací pec LAC, Německo
- Sušárna Memmert, Německo
- Centrifuga Rotanta 460 R, Německo
- Plynový chromatograf GC Agilent 7890 A, USA
- Injekční stříkačka Hamilton, Švýcarsko
- Tedlarův vak, ČR
- Analyzátor uhlíku Schimadzu TOC – 5000 A, Rakousko
- Micro-Oxymax, USA
- Chladnička Samsung, ČR
- Biometrické láhve 100 ml a 250 ml
- Diferenční skenovací kalorimetr Mettler Toledo DSC 1, Indie
- FTIR ATR Nicolet is 10, USA
- Mikrometr, ČR
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

5.2 Chemikálie

5.2.1 Biomédium pro anaerobní testy

Na přípravu 1 l biomédia byly použity následující chemikálie čistoty p.a.:

- | | |
|--|---------|
| ▪ KH_2PO_4 (bezvodý dihydrogenfosforečnan draselný) | 0,27 g |
| ▪ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného) | 1,12 g |
| ▪ NH_4Cl (chlorid amonný) | 0,53 g |
| ▪ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (dihydrát chloridu vápenatého) | 0,075 g |
| ▪ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (hexahydrát chloridu hořečnatého) | 0,10 g |
| ▪ $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tetrahydrát chloridu železnatého) | 0,02 g |

- | | |
|--|-------|
| ▪ Na ₂ S·9H ₂ O (nonahydrát sulfidu sodného) | 0,1 g |
| ▪ Zásobní roztok stopových prvků | 1 ml |

Odměrná baňka byla doplněna na 1 l odkysličenou vodou. Poté bylo změřeno pH takto připraveného biomédia a popřípadě byla upravena hodnota pH na $7 \pm 0,2$.

Před samotným použitím bylo biomédium minimálně 20 min probubláváno dusíkem, aby bylo dosaženo anoxických podmínek.⁴⁷

Zásobní roztok stopových prvků

Zásobní roztok stopových prvků použitý pro přípravu biomédia v anaerobním testu o objemu 1 l byl složen z:

- | | |
|---|--------|
| ▪ H ₃ BO ₃ (kyselina boritá) | 0,75 g |
| ▪ FeSO ₄ ·7H ₂ O (heptahydrát síranu železnatého) | 3,00 g |
| ▪ ZnSO ₄ ·7H ₂ O (heptahydrát síranu zinečnatého) | 0,10 g |
| ▪ MnSO ₄ ·4H ₂ O (tetrahydrát síranu manganatého) | 0,50 g |
| ▪ CuSO ₄ ·5H ₂ O (pentahydrát síranu měďnatého) | 0,05 g |
| ▪ CoSO ₄ ·7H ₂ O (heptahydrát síranu kobaltnatého) | 0,18 g |
| ▪ (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O (tetrahydrát molybdenanu amonného) | 0,03 g |

5.2.2 Biomédium pro aerobní testy

Na přípravu 1 l biomédia bylo potřeba:

- | | |
|---|-------|
| ▪ MgSO ₄ ·7H ₂ O (heptahydrát síranu hořečnatého) | 1 ml |
| ▪ CaCl ₂ (chlorid vápenatý) | 1 ml |
| ▪ FeCl ₃ ·6H ₂ O (hexyhydrát chloridu železitého) | 1 ml |
| ▪ (NH ₄) ₂ SO ₄ (síran amonný) | 5 ml |
| ▪ Fosfátový pufr | 20 ml |
| ▪ Roztok stopových prvků | 1 ml |

K 500 ml provzdušněné (24 h) destilované vody bylo přidáno dané množství roztoků, poté byla odměrná baňka doplněna provzdušněnou destilovanou vodou na objem 1 l.

Zásobní roztoky

Pro přípravu daného zásobního roztoku bylo naváženo určité množství látky, které bylo rozpuštěno v menším množství destilované vody a poté v odměrné baňce doplněno na objem 1 l.

▪ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (heptahydrát síranu hořečnatého)	22,5 g
▪ CaCl_2 (chlorid vápenatý)	27,5 g
▪ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (hexahydrát chloridu železitého)	0,25 g
▪ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (síran amonný)	10 g

Fosfátový pufr

Fosfátový pufr, který byl součástí biomédia pro testování v aerobních podmínkách, byl složen z:

▪ KH_2PO_4 (dihydrogen fosforečnan draselný)	8,2 g
▪ K_2HPO_4 (hydrogen fosforečnan draselný)	21,8 g
▪ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	44,7 g

Dané množství látky bylo naváženo a rozpuštěno v 1 l destilované vody.

Roztok stopových prvků

Roztok stopových prvků, který byl součástí biomédia pro testování v aerobních podmínkách, byl složen z:

▪ H_3BO_3 (kyselina boritá)	0,75 g
▪ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (heptahydrát síranu železnatého)	3,00 g
▪ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (heptahydrát síranu zinečnatého)	0,10 g
▪ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tetrahydrát síranu manganatého)	0,50 g
▪ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (pentahydrát síranu měďnatého)	0,05 g
▪ $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (heptahydrát síranu kobaltnatého)	0,18 g
▪ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tetrahydrát molybdenanu amonného)	0,05 g

5.2.3 Úprava a zpracování anaerobního mezofilního kalu

Pro stanovení biologické rozložitelnosti testovaných materiálů ve vodném prostředí byl použit anaerobní mezofilní kal z Čistírny odpadních vod Zlín – Malenovice. Dovozený kal byl ponechán v termostatu při 37 °C po dobu 2 dnů, poté byl kal zpracován. Jelikož testování biodegradace probíhalo při dvou teplotních podmínkách, bylo nutné anaerobní mezofilní kal dle daných podmínek upravit.

5.2.3.1 *Mezofilní podmínky*

Mezofilní anaerobní kal byl zbaven hrubých nečistot cezením přes síto a takto přecezený kal byl 20 minut probubláván dusíkem, aby se vytěsnil kyslík, který se zde mohl objevit během zpracování kalu. U kalu byly stanoveny jeho základní vlastnosti – sušina (VL), ztráta žiháním (ZŽ), pH a oxidačně redukční potenciál (ORP). Tento kal byl použit pro testování biodegradace polymerních materiálů za mezofilních anaerobních podmínek.

Dle zjištěné aktuální sušiny kalu, bylo zvoleno ředění pro přípravu inokula, tak aby sušina získaného inokula byla v rozmezí 1-5 g.l⁻¹. Definované množství kalu bylo tedy odstředěno při 4600 ot.min⁻¹ po dobu 15 min a při 37 °C. Kalová voda byla slita a kal byl resuspendován médiem do 2 l odměrné baňky a probubláván dusíkem po celou dobu práce.

5.2.3.2 *Termofilní podmínky*

Anaerobní termofilní kal byl připraven z kalu mezofilního, který byl opět zbaven hrubých nečistot cezením přes síto. Zde byla taktéž stanovena základní charakteristika kalu, to znamená, že byla stanovena sušina, ztráta žiháním, pH a ORP.

Adaptace mezofilního kalu na termofilní podmínky (55 °C) probíhala 2 způsoby:

1. způsob

Asi 1,5 l anaerobního mezofilního kalu bylo převedeno do 2 l skleněné láhve, která byla uzavřena plynotěsným uzávěrem skládajícím se ze septa pro odběr plynné fáze a otvory pro probublání dusíkem. Tento kal byl označen jako neupravený kal, jednalo se teda o anaerobní kal bez úprav.

Tento kal byl poté vložen do termostatu, jenž byl vyhříván na teplotu (55 ± 2) °C. Každý den adaptace (15 dnů) byla sledována produkce bioplynu.

2. způsob

Další 1,5 l anaerobního mezofilního kalu bylo nejdříve odstředěno při 4600 ot.min⁻¹ po dobu 15 min. Kalová voda byla slita a odstředěný kal byl resuspendován biomédiem do 2 l skleněné láhve, která byla opět uzavřena plynotěsným víčkem. Tento kal byl označen jako upravený kal a byl uložen do stejného termostatu jako neupravený. Opět zde byla sledována produkce bioplynu každý den adaptace na termofilní podmínky (55 °C).

Během adaptace z mezofilních podmínek do termofilních byla sledována produkce methanu ve vyvíjejícím se bioplynu. Po převodu mezofilního kalu (37 °C) do termofilních podmínek (55 °C) nejdříve docházelo k poklesu produkce methanu v bioplynu pod 60 %. Postupně zase kal produkoval methan a jeho množství v bioplynu narůstalo. Po 15 dnech od uložení do termostatu na 55 °C kal obsahoval více jak 80 % methanu a bylo možno jej použít k testům.

5.2.4 Úprava a zpracování aerobního kalu

Pro stanovení biologické rozložitelnosti testovaných materiálů byl použit aerobní kal (aktivovaný kal) z ČOV Zlín-Malenovice. Nejdříve byl kal zbaven hrubých nečistot cezením přes síto a následně byl dekantován 3x pitnou vodou. Takto upravený kal byl přelit do fermentoru, aby bylo zajištěno provzdušňování.

Dle aktuální sušiny aktivovaného kalu bylo odebráno dané množství kalu, tak aby při samotném testu byla sušina kalu 500 mg.l⁻¹. Toto odebrané množství kalu bylo odstředěno při 3000 ot.min⁻¹ po dobu 10 min a po odlití kapalné fáze byla biomasa suspendována ve zvoleném objemu biomédia.

5.2.5 Fosfátový pufr pro hydrolýzu vzorků PLA

Pro přípravu 1 l fosfátového pufru bylo potřeba navážit 13,61 g KH₂PO₄ a pro potlačení mikrobiálního růstu 2 g NaN₃. Poté byla odměrná baňka doplněna na 1 l. Pomocí elektrody bylo změřeno pH tohoto pufru a pomocí roztoku NaOH bylo pH upraveno na hodnotu 7.

5.2.6 Testované materiály

Testovanými materiály byly fólie na bázi kyseliny polymléčné, jednalo se o dva druhy takovýchto vzorků fólií, které byly pracovně označeny jako série 1 a série 2 testovaných materiálů.

Sérii 1 tvořily fólie získány ze Slovenské akademie věd. Jednalo se o samotnou fólii kyseliny polymléčné, označenou jako PLA, dále pak o směsnou fólii skládající se z kyseliny polymléčné a polyhydroxybutyrátu (PHB), označenou jako PLA/PHB. Také byly testovány tytéž fólie s přísadami označenými jako STRUNA (PLA + přísady) a SVIT (PLA + PHB + přísady, 15 % PHB). Jako přísady zde byly použity kompatibilizátory a plastifikátory. U těchto testovaných fólií bylo stanoveno procentuální zastoupení uhlíku (w_C). Základní charakteristika fólií je uvedena v *Tab. 1*.

Tab. 1: Základní charakteristika fólií série 1

Název	Složení	Tloušťka [μm]	w_C [%]
PLA	PLA	15,0	50,92
PLA/PHB	PLA + PHB	3,5	52,91
SVIT	85 % PLA + 15 % PHB + přísady	16,0	53,10
STRUNA	PLA + přísady	20,0	51,47

Série 2 byla tvořena opět fóliemi na bázi kyseliny polymléčné, které byly vyrobeny na Fakultě technologické UTB ve Zlíně. Tyto fólie obsahovaly různé procentuální zastoupení (0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %) antihydrolyzačního činidla (CDI), jenž můžeme najít pod obchodním názvem ZIKA-AH362. Jedná se o antihydrolyzační činidlo na bázi aromatického karboimidu, který působí proti hydrolýze ve všech typech polymerů s amidovou nebo esterovou vazbou. *Tab. 2* prezentuje základní charakteristiku těchto fólií.

Tab. 2: Základní charakteristika fólií série 2

Název	Tloušťka [μm]	w_C [%]	M^{48} [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]
PLA	17,0	50,00	78 590
PLA + 0,5 % CDI	20,0	50,00	128 709
PLA + 1,0 % CDI	21,0	50,00	152 781
PLA + 1,5 % CDI	19,0	50,00	nebylo stanoveno
PLA + 2,0 % CDI	19,0	50,00	133 199

5.3 Metody stanovení

5.3.1 Veškeré látky (VL)

Do předem vyžíhaných (550 °C, 2 h) a zvážených porcelánových kelímků, bylo pipetováno 5 ml vzorku (anaerobní kal či inokulum) pro stanovení sušiny. Poté byly kelímky sušeny při 105 °C do konstantní hmotnosti (2-3 h). Po sušení byly kelímky uloženy v exikátoru, kde byly ponechány vychladnutí na laboratorní teplotu. Stanovení bylo provedeno trojmo vedle sebe a sušina byla vyjádřena v g.l⁻¹.

5.3.2 Ztráta žiháním (ZŽ)

Odparek po sušení byl vložen do žihací pece, kde proběhlo žihání při teplotě 550 °C po dobu 2 h. Zbytek po žihání byl uložen v exikátoru, aby došlo k jeho vychladnutí na laboratorní teplotu. Stanovení bylo provedeno trojmo vedle sebe a ztráta žiháním byla vyjádřena v g.l⁻¹ a také v %.

5.3.3 pH, oxidačně redukční potenciál (ORP)

U anaerobního kalu, který byl dovezen z ČOV Zlín-Malenovice, bylo sledováno pH a ORP. Tyto dva parametry byly také sledovány před použitím kalu, respektive již připraveného inokula, do testovacích lahví a také na konci testování.

Měření těchto parametrů probíhalo pomocí pH metru inoLab WTW 720. pH bylo měřeno skleněnou elektrodou a ORP pomocí redox elektrody s platinovým čidlem v jednotkách mV.

5.3.4 Biodegradace v anaerobních podmínkách

5.3.4.1 Testy při různých teplotních podmínkách

Mezofilní anaerobní podmínky (37 °C)

Za těchto podmínek byly testovány fólie z první série vzorků, to znamená pouze vzorky získané z Bratislavy.

Do skleněných testovacích lahví o objemu 250 ml byly naváženy vzorky těchto fólií o hmotnosti cca 100 mg. Láhve byly opatřeny plynotěsnými uzávěry s otvory pro probublání dusíkem a septem pro odběr plynné fáze.

Inokulum, které zde bylo použito, bylo připraveno dle kapitoly 5.2.3.1 a po celou dobu práce bylo probubláváno dusíkem, aby byl vytěsněn kyslík v co nejvyšší míře. Před samotným nadávkováním inokula byly testovací láhve probublávány dusíkem, poté bylo přidáno 100 ml inokula a láhve byly uzavřeny plynotěsným uzávěrem a otvory pro probublání dusíkem byly láhve ještě 10 min dusíkem probublávány. Poté byly láhve uloženy do termostatu, jehož teplota byla (37 ± 2) °C.

Slepý pokus byl tvořen pouze 100 ml inokula, jako standardní látky bylo použito cca 100 mg mikrokrystalické celulózy a 100 ml inokula.

Obsah láhví byl promícháván v nepravidelných intervalech. Ve zvolených časových intervalech (1x týdně) byla sledována produkce bioplynu v testu biodegradace pomocí plynového chromatografu (GC). Plynná fáze o objemu 100 μ l byla odebírána přes septum plynotěsného víčka pomocí injekční stříkačky Hamilton a dávkována na kolonu plynového chromatografu.

Testy jednotlivých fólií probíhaly minimálně 3x vedle sebe. Na konci pokusu bylo v jednotlivých testovacích lahvích stanoveno pH, oxidačně redukční potenciál (ORP), celkový uhlík (TC), anorganický uhlík (IC) a celkový organický uhlík (TOC).

Termofilní anaerobní podmínky

Stanovení biodegradace za termofilních anaerobních podmínek proběhlo u obou sérií vzorků. To tedy znamená, že tomuto testu byly podrobeny vzorky z Bratislavy i vzorky vyrobeny na FT UTB ve Zlíně.

Pro tento test byly použity testovací láhve o objemu 100 ml, do nichž byly naváženy testované vzorky o hmotnosti cca 50 mg. Láhve byly opět opatřeny plynotěsnými víčky se septem pro odběr plynné fáze a otvory pro probublání dusíkem.

Inokulum, které zde bylo použito, bylo připraveno dle kapitoly 5.2.3.2 a bylo zvoleno to, které se připravilo dle druhého způsobu. Jednalo se tedy o inokulum, které bylo již smícháno s biomédiem a adaptováno na termofilní podmínky po dobu 15 dnů. Během přidavku inokula do testovacích lahví, bylo inokulum probubláváno dusíkem. Dusíkem byly také probublávány testovací láhve, před přidáním inokula i po jeho přidání jako v předchozím případě. Inokulum bylo přidáno o objemu 50 ml. Po přípravě testovacích lahví, byly láhve uloženy v termostatu, jehož teplota byla (55 ± 2) °C.

Obsah láhví byl opět promícháván v nepravidelných intervalech a průběh biodegradace fólií byl sledován 1x týdně pomocí analýzy plynné fáze za využití GC a současně byl měřen přetlak vznikající během biodegradace.

5.3.4.2 *Vyhodnocení anaerobní biodegradace*

Plynová chromatografie

Produkce vznikajícího plynu, tedy oxidu uhličitého (CO₂) a methanu (CH₄), byla detekována pomocí GC Agilent 7890A a vyhodnoceny softwarem ChemStation.

Plynová chromatografie pracuje na principu dělení směsí na jednotlivé složky mezi dvě fáze. První fází je fáze stacionární (Porapak Q) a druhou fází označujeme jako mobilní fází (nosný plyn helium o průtoku 50 ml.min⁻¹). Vzorek vzniklého plynu byl odebrán z testovací láhve skrze septum do injekční stříkačky Hamilton a to v objemu 100 µl. Tento vzorek byl nastříknut přes septum GC do injektoru (200 °C) a odtud byl odnášen nosným plynem kolonou o délce 1,828 m, na níž docházelo k zachycení jednotlivých složek směsi. K tomuto ději dochází vlivem různé schopnosti složek poutat se na stacionární fází, jednotlivé složky pak vstupují na tepelně vodivostní detektor (250 °C).⁴⁹

Tepelně vodivostní detektor (TCD) pracuje na principu tepelné vodivosti. TCD je složen ze dvou cel. První celou prochází nosný plyn společně s plynným vzorkem. Druhou celou protéká čistý nosný plyn, tato cela slouží jako referentní. Obě cely jsou vybaveny žhavicím vláknem. Teplota tohoto žhavicího vlákna se sníží, pokud je tepelná vodivost plynného vzorku vyšší než plynu referentního. Tato změna teploty zapříčiní změnu elektrického odporu, jež je přímo úměrná koncentraci stanovované látky v plynném vzorku.⁵⁰ V našem případě byl TCD vyhříván na teplotu 250 °C, referenční průtok byl 30 ml.min⁻¹ a průtok He byl 3 ml.min⁻¹.

Kalibrační plyn byl složen ze 4,04 % CH₄ a 0,799 % CO₂ a byl zakoupen od výrobce Linde Gas a.s. Kalibrační plyn byl odebírán do Tedlarova vaku, odkud se pomocí injekční stříkačky Hamilton odebíral v množství 100 µl a dávkoval přes injektor GC na kolonu.

Hmotnostní úbytek

Po ukončení experimentu byly z jednotlivých testovacích lahví znovu vytaženy vzorky fólií. Vzorky byly opláchnuty destilovanou vodou, poté byly na Petriho miskách sušeny volně na vzduchu a po několika dnech byly vzorky přesunuty do exikátoru, kde došlo k jejich vysušení do konstantní hmotnosti.

Z hmotnosti fólie před biodegradací a z hmotnosti fólie po biodegradaci byl vypočítán hmotností úbytek fólie.

5.3.5 Biodegradace v aerobních podmínkách

Do testovacích lahví o objemu 100 ml byly naváženy vzorky první série (vzorky Bratislava) o hmotnosti cca 10 mg. Poté bylo odměřeno 45 ml biomédia připraveného dle kapitoly 5.2.2 a 5 ml inokula připraveného dle kapitoly 5.2.4. Takto připravené testovací láhve byly zapojeny na přístroj Micro-Oxymax.

Jedná se o uzavřený a plně automatizovaný systém měřící změnu koncentrace O_2 a CO_2 v plynné fázi uzavřených testovacích lahví, v nichž dochází k biologickému rozkladu. Vzduch, který je přítomen v testovacích láhvích, je nejdříve čerpán do detektorů a poté vrácen zpět do testovacích lahví. Pro detekci O_2 se využívá detektor na principu paramagnetické rezonance a pro detekci CO_2 je využito detektoru pracujícího na principu infračervené spektroskopie. Přičemž přítomný O_2 a CO_2 v plynné fázi je měřen v pravidelných intervalech a změny v jejich koncentracích jsou vyjádřeny jako spotřeba O_2 a produkce CO_2 .⁵¹

U testovacích lahví bylo měřeno pH a celkový organický uhlík (TOC) a to na začátku i na konci pokusu. Vyhodnocení biodegradace proběhlo na základě produkce CO_2 .

5.3.6 Hydrolýza

Do 100 ml testovacích lahví byly nastříhány fólie o hmotnosti cca 50 mg, které byly nastříhány na čtverečky o velikosti cca 0,5x0,5 cm. Poté bylo přidáno 50 ml fosfátového pufru připraveného dle kapitoly 5.2.5. Testovací láhve byly umístěny do termostatu, pro hydrolýzu za mezofilních podmínek to bylo při teplotě $(37 \pm 2) ^\circ C$ a pro hydrolýzu za termofilních podmínek to bylo při teplotě $(55 \pm 2) ^\circ C$.

Ve zvolených časových intervalech (1x týdně) bylo odebíráno 1,5 ml vzorku do ependorfky a vzorek byl zmražen před dalším zpracováním. Poté bylo přidáno 1,5 ml fosfátového pufru, v testovacích lahvích byl tak stále udržován objem 50 ml.

U získaných vzorků byl stanoven rozpuštěný organický uhlík pomocí analyzátoru uhlíku Schimadzu TOC – 5000 A.

5.3.7 Stanovení rozpuštěného uhlíku

Stanovení rozpuštěného uhlíku probíhalo na analyzátoru uhlíku Schimadzu TOC – 5000 A, který je schopen stanovit celkový uhlík (TC), anorganický uhlík (IC) a celkový organický rozpuštěný uhlík (TOC).

Pro stanovení TC je třeba, aby došlo k oxidaci veškerého uhlíku obsaženého v kapalném vzorku, k této oxidaci dochází ve spalovací trubici s platinovým katalyzátorem při teplotě 680 °C. Po oxidaci veškerého uhlíku vzniká CO₂, který byl veden na infračervený detektor. Absorbací záření příslušné vlnové délky vzniká signál, jenž byl zaznamenán ve formě píku, přičemž plocha píku byla přímo úměrná koncentraci TC v testovaném vzorku.⁵²

Při stanovení IC dochází k vytěsnění CO₂ do proudu kyslíku vedoucí do nádoby s kyselinou fosforečnou. Samotný CO₂ vzniká z nastříknutého kapalného vzorku. Jako detektor byl použit opět infračervený detektor. TOC byl získán odečtením IC od TC.

Jako kalibrační roztok pro stanovení TC bylo využito hydrogenftalátu draselného a pro stanovení IC byly využity roztoky hydrogenuhličitanu sodného a uhličitanu sodného.

5.3.8 Diferenční skenovací kalorimetrie

Pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) byly vyhodnoceny teplotní změny polymeru před samotnými testy biodegradace a hydrolýzy a také po těchto testech. Pomocí DSC mohou být sledovány tepelné kritické body, jako je teplota tání (T_m), teplota skelného přechodu (T_g) či teplota studené krystalizace (T_c).

Principem je měření elektrické energie přídavného zdroje, které je potřeba k udržení izotermních podmínek mezi zahříváním vzorkem a referentní látkou. Na hliníkovou pánvičku bylo naváženo 8 mg vzorku a měření bylo provedeno ku o průtoku 50 ml.min⁻¹, teplotním programem 0-200 °C a rychlosti ohřívání/ochlazování 10 ml.min⁻¹.

5.3.9 Fourierova transformační infračervená spektroskopie

Fourierova transformační infračervená spektroskopie (FTIR) má široké uplatnění v objasnění struktur látek, ať už syntetizovaných či přírodních.

FTIR pracuje na principu pohlcení infračerveného záření o různé vlnové délce analyzovaným materiálem, přičemž při průchodu infračerveného záření dochází ke změně rotačně vibračních stavů molekuly v závislosti na změně dipólového momentu molekuly.⁵³

Vlastní měření probíhalo pomocí FTIR ATR Nicolet is 10 za použití nástavce ART s diamantovým krystalem. Na nástavec byl položen vzorek, který byl proměřen na vlnočtu (400-4000) cm^{-1} , přičemž byly zaznamenány hodnoty absorbancí.

5.4 Vyhodnocení

5.4.1 Veškeré látky (VL)

$$VL_{105} = \frac{m_2 - m_1}{V_0} \quad /3/$$

Kde:

- VL_{105} ... hmotnostní koncentrace veškerých látek, [g.l^{-1}];
 m_1 ... hmotnost porcelánového kelímku, [g];
 m_2 ... hmotnost porcelánového kelímku a odparku, [g];
 V_0 ... objem vzorku použitého pro stanovení, [l].

5.4.2 Ztráta žiháním (ZŽ)

$$Z\check{Z}_{550} = \frac{m_3 - m_1}{V_0} \quad /4/$$

$$Z\check{Z}_{550} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100 \quad /5/$$

Kde:

- $Z\check{Z}_{550}$... ztráta žiháním v sušině, [g.l^{-1}], popř. [%];
 m_1 ... hmotnost porcelánového kelímku, [g];
 m_2 ... hmotnost porcelánového kelímku a odparku, [g];
 m_3 ... hmotnost porcelánového kelímku se zbytkem po žihání, [g];
 V_0 ... objem vzorku použitého pro stanovení, [l].

5.4.3 Biodegradace v anaerobních podmínkách

5.4.3.1 Množství vyprodukovaného C v plynné fázi ve formě CO_2

$$m_{C(\text{CO}_2)} = \frac{M_C \cdot p}{R \cdot T} \cdot \frac{V_g}{1000} \cdot w(\text{CO}_2) \cdot \frac{V_{ST}}{S_{ST}} \cdot \frac{S_{VZ}}{V_{VZ}} \cdot 1000 \quad /6/$$

Kde:

- $m_{C(CO_2)}$... množství vyprodukovaného uhlíku ve formě CO₂, [mg];
 M_C ... atomární hmotnost uhlíku, [g.mol⁻¹];
 p ... tlak v den měření, [kPa];
 R ... molární plynová konstanta, [J.K⁻¹.mol⁻¹];
 V_g ... plynný objem inkubační láhve, [ml];
 $w(CO_2)$... množství CO₂ v kalibračním plynu, [%];
 V_{ST} ... dávkovaný objem plynné fáze standardu, [μl];
 S_{ST} ... signál detektoru pro standardní plyn, [μV.s];
 S_{VZ} ... signál detektoru pro vzorek, [μV.s];
 V_{VZ} ... dávkovaný objem plynné fáze vzorku, [μl].

5.4.3.2 Množství vyprodukovaného C v plynné fázi ve formě CH₄

$$m_{C(CH_4)} = \frac{M_C \cdot p}{R \cdot T} \cdot \frac{V_g}{1000} \cdot w(CH_4) \cdot \frac{V_{ST}}{S_{ST}} \cdot \frac{S_{VZ}}{V_{VZ}} \cdot 1000 \quad /7/$$

Kde:

- $m_{C(CH_4)}$... množství vyprodukovaného uhlíku ve formě CH₄, [mg];
 M_C ... atomární hmotnost uhlíku, [g.mol⁻¹];
 p ... tlak v den měření, [kPa];
 R ... molární plynová konstanta, [J.K⁻¹.mol⁻¹];
 V_g ... plynný objem inkubační láhve, [ml];
 $w(CH_4)$... množství CH₄ v kalibračním plynu, [%];
 V_{ST} ... dávkovaný objem plynné fáze standardu, [μl];
 S_{ST} ... signál detektoru pro standardní plyn, [μV.s];
 S_{VZ} ... signál detektoru pro vzorek, [μV.s];
 V_{VZ} ... dávkovaný objem plynné fáze vzorku, [μl].

5.4.3.3 Stupeň biologického rozkladu z hlediska produkce CO₂ a CH₄ v plynné fázi

$$D_g = \frac{[m_{C(CO_2)} + m_{C(CH_4)}]_{VZ} - [m_{C(CO_2)} + m_{C(CH_4)}]_{SL}}{m_C \cdot T_C} \cdot 100 \quad /8/$$

Kde:

- D_g ... stupeň biologického rozkladu z hlediska CO_2 a CH_4 , [%];
 $m_{C(\text{CO}_2)}$... množství vyprodukovaného uhlíku ve formě CO_2 , [mg];
 $m_{C(\text{CH}_4)}$... množství vyprodukovaného uhlíku ve formě CH_4 , [mg];
 VZ, SL ... označení dat pro vzorek, popřípadě pro slepý pokus;
 m_C ... hmotnost testovaného materiálu, [mg];
 T_C ... obsah celkového uhlíku v testovaném materiálu, [%].

5.4.3.4 *Stupeň biologického rozkladu z hlediska produkce CO_2 a CH_4 v plynné fázi a množství rozpuštěného CO_2 v kapalně fázi*

$$D_T = D_g + \frac{m_{C(IC)-VZ} - m_{C(IC)-SL}}{m_C \cdot T_C} \cdot 100 \quad /9/$$

Kde:

- D_T ... stupeň biologického rozkladu dle produkce CO_2 a CH_4 a množství CO_2 rozpuštěného v kapalně fázi, [%];
 D_g ... procento mineralizace uhlíku z hlediska CO_2 a CH_4 , [%];
 $m_{C(IC)}$... množství CO_2 rozpuštěného v kapalně fázi, [mg];
 m_C ... hmotnost testovaného materiálu, [mg];
 T_C ... obsah celkového uhlíku v testovaném materiálu, [%].

5.4.3.5 *Stupeň biologického rozkladu na základě hmotnostního úbytku*

$$m = \frac{m_{\text{před}} - m_{\text{po}}}{m_{\text{po}}} \cdot 100 \quad /10/$$

Kde:

- m ... stupeň biologického rozkladu na základě hmotnostního úbytku, [%];
 $m_{\text{před}}$... hmotnost vzorku před biodegradací, [g];
 m_{po} ... hmotnost vzorku po biodegradaci, [g].

5.4.4 Biodegradace v aerobních podmínkách

5.4.4.1 Procentuální zastoupení C v CO₂

$$C_{\%} = \frac{n \cdot M_C}{M_{CO_2}} \cdot 100 \quad /11/$$

Kde:

$C_{\%}$... procentuální zastoupení C v CO₂, [%];

n ... počet molekul C v CO₂, [1];

M_C ... molekulová hmotnost C, [g.mol⁻¹];

M_{CO_2} ... molekulová hmotnost CO₂, [g.mol⁻¹].

5.4.4.2 Hmotnost uhlíku z hodnoty produkce CO₂ zjištěné respirometrem

$$m_C = \frac{C_{\%}}{100} \cdot (CO_{2(VZ)} - CO_{2(SL)}) \quad /12/$$

Kde:

m_C ... hmotnost C z hodnoty CO₂ stanovené respirometrem, [mg];

$C_{\%}$... procentuální zastoupení C v CO₂, [%];

$CO_{2(VZ)}$... hmotnost CO₂ vzorku stanovená respirometrem, [mg];

$CO_{2(SL)}$... hmotnost CO₂ slepého pokusu stanovená respirometrem, [mg].

5.4.4.3 Procentuální odstranění substrátu dle produkce CO₂

$$m = \frac{m_C}{m_{C-fólie}} \cdot 100 \quad /13/$$

Kde:

m ... procentuální odstranění substrátu, [%];

m_C ... hmotnost uhlíku z hodnoty CO₂ stanovené respirometrem, [mg];

$m_{C-fólie}$... hmotnost uhlíku ve fólii podrobené testu, [mg].

5.4.5 Hydrolýza

5.4.5.1 *Stupeň hydrolýzy stanovený na základě množství rozpuštěného uhlíku (DOC) v kapalné fázi*

$$\text{Stupeň hydrolýzy} = \frac{c_{DOC} \cdot V}{m_{fólie} \cdot w_C} \cdot f_{\text{ř}} \cdot 100 \quad /14/$$

Kde:

- c_{DOC} ... koncentrace DOC ve vzorku, [mg.l⁻¹];
 V ... objem pufru, [l];
 $m_{fólie}$... hmotnost fólie podrobená testu, [mg];
 w_C ... procentuální zastoupení C ve fólii, [%];
 $f_{\text{ř}}$... faktor ředění, [1].

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

V následujících kapitolách budou sepsány a diskutovány jednotlivé výsledky, které byly v průběhu jednotlivých testů zjištěny.

6.1 Test biodegradace v anaerobních mezofilních podmínkách

6.1.1 Charakteristika anaerobního mezofilního kalu a inokula

Pro testování rozkladu fólií série 1 byl použit anaerobní kal dovezen z ČOV Zlín-Malenovice o vlastnostech uvedených v *Tab. 3*.

Tab. 3: Charakteristika anaerobního mezofilního kalu a připraveného inokula

Vlastnost	Jednotka	Hodnota anaerobního mezofilního kalu	Hodnota mezofilního inokula
VL	g.l ⁻¹	25,57	3,44
ZŽ	g.l ⁻¹	11,67	1,79
ZŽ	%	54,38	48,15
ORP	mV	-232,9	-218,7
pH	1	7,23	7,43

Hodnota ORP tohoto anaerobního mezofilního kalu byla -232,9. Poukazuje to na skutečnost, že při převozu tohoto kalu a jeho následujících úpravách byly zachovány anaerobní podmínky. Kal byl po dobu dvou dnů uchováván v termostatu při teplotě (37±2) °C.

Po těchto dvou dnech bylo z kalu připraveno inokulum a to postupem uvedeným v kapitole 5.2.3.1, výsledné inokulum mělo vlastnosti uvedené v *Tab. 3*.

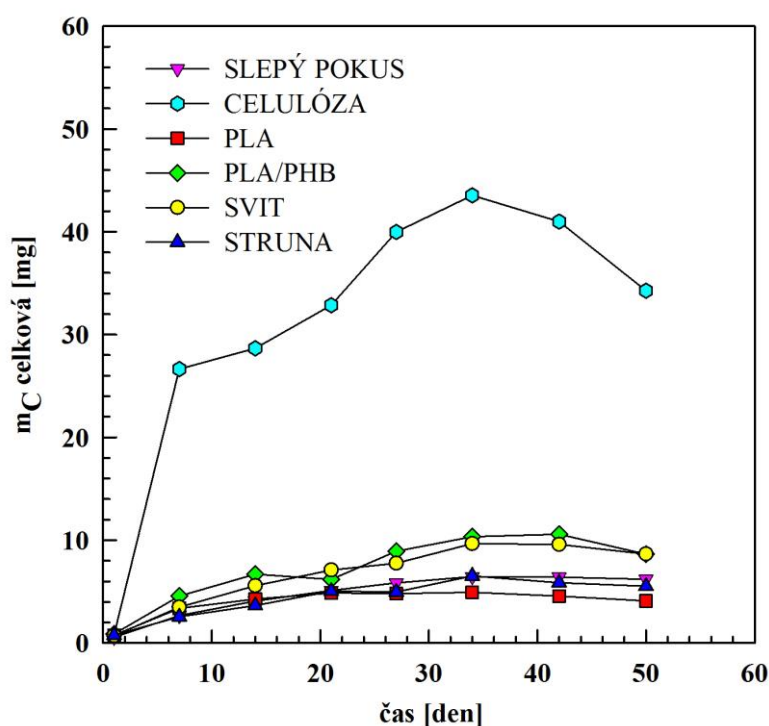
Hodnota ORP, která je -218,7, říká, že při veškeré manipulaci s kalem během přípravy inokula, byly zachovány anaerobní podmínky. Toto inokulum bylo použito jako vodné prostředí pro testování biodegradace fólií na bázi PLA za mezofilních anaerobních podmínek.

6.1.2 Biodegradace za anaerobních mezofilních podmínek

Vzorky fólií série 1, což jsou vzorky směsi PLA/PHB, byly podrobeny biodegradaci za anaerobních mezofilních podmínek. Vedle testovacích lahví se vzorky, současně probíhal test slepého pokusu, což bylo pouze inokulum a standardu, kterým v tomto případě byla

mikrokrystalická celulóza. Testy pro jednotlivé vzorky probíhaly 3x vedle sebe, nicméně níže jsou výsledky pro vybrané testovací láhve a to z toho důvodu, že během testu v některých případech nedocházelo k žádné produkci bioplynu.

Na Obr. 9 je znázorněn průběh biodegradace vzorků vzhledem k celkové produkci uhlíku v plynné fázi. Lze si povšimnout, že nejvyšší hmotnost uhlíku byla zjištěna pro vzorek celulózy, která v tomto testu sloužila jako standard. Maximální produkce uhlíku v tomto testu pro celulózu byla dosažena ve 34. dni biodegradace a činila 43,5 mg C, což odpovídá 92,91 % mineralizace celulózy.

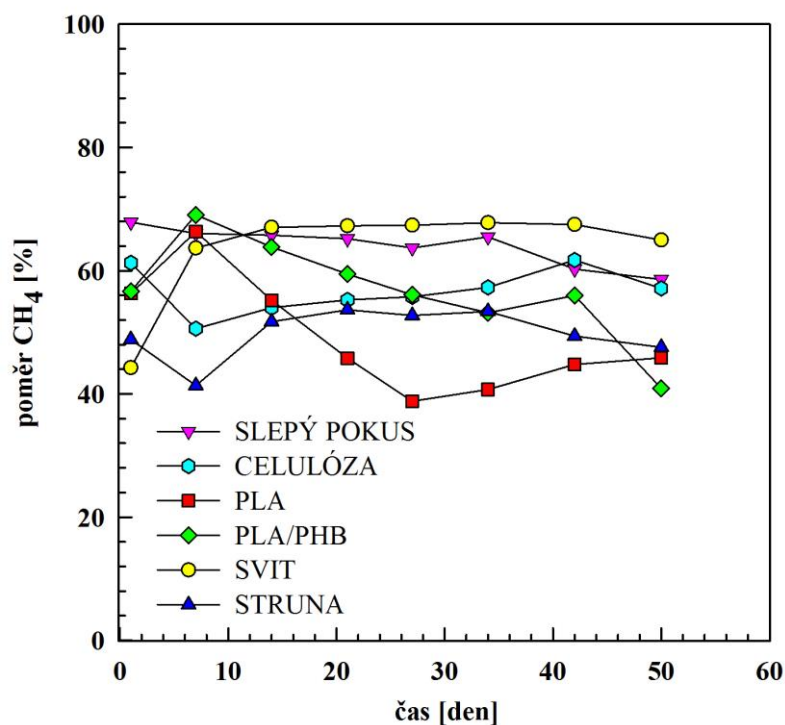


Obr. 9: Celková produkce uhlíku v plynné fázi za anaerobních mezofilních podmínek

Produkce bioplynu, respektive celkového množství uhlíku ve formě methanu a oxidu uhličitého, testovaných vzorků fólií se pohybovalo mírně nad hodnotami slepého pokusu. Množství bioplynu v 42 dnech testování začalo klesat. V 50 dnech testování byl pokles výrazný pro všechny testované vzorky, proto byl test biodegradace za anaerobních mezofilních podmínek ukončen.

Obr. 10 znázorňuje procentuální zastoupení CH_4 ve vyprodukovaném bioplynu v testu biodegradace. U vzorku SVIT byl nejvyšší poměr CH_4 a to téměř 68 %, přičemž poměr

CH₄ u tohoto vzorku byl téměř stálý. Naopak nejnižší poměr CH₄ byl pro vzorek PLA, kde maximální poměr CH₄ byl 66 % po 7 dnech biodegradace, poté tento poměr klesal. Tato skutečnost mohla být způsobena odumíráním mikroorganismů, pro které nebyl v testovací láhvi přítomen vhodný organický substrát, s čímž souvisí právě i nízký rozklad vzorku PLA.



Obr. 10: Procentuální zastoupení CH₄ ve vyprodukovaném bioplynu za anaerobních mezofilních podmínek

Po ukončení testu byly v jednotlivých lahvích stanoveny hodnoty ORP, pH, také byly odebrány vzorky inokula, v němž bylo stanoveno množství anorganického uhlíku (IC). Ze získaných dat bylo vypočteno procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce CH₄ a CO₂ (D_g) a také stupeň mineralizace dle produkce CH₄ a CO₂ a množství CO₂ rozpuštěného v kapalně fázi (D_T). Tyto získaná data jsou shrnuta v Tab. 4

Tab. 4: Stupeň mineralizace testovaných vzorků dle produkce bioplynu (D_g), celkový rozklad dle produkce bioplynu a množství CO_2 rozpuštěného v kapalně fázi (D_T) a rozklad dle úbytku hmotnosti (Δm) v testu anaerobní mezofilní biodegradace

Vzorek	pH [1]	ORP [mV]	IC [mg.l ⁻¹]	D_g [%]	D_T [%]	Δm [%]
CELULÓZA	7,78	-232,4	8,23	92,91	93,30	-
PLA	7,43	-189,9	5,34	0,22	0,28	0,55
PLA/PHB	7,51	-221,3	5,94	7,25	7,36	12,24
SVIT	7,78	-220,1	4,97	6,28	6,30	8,02
STRUNA	7,51	-212,5	5,31	0,54	0,58	1,01

Hodnota pH téměř u všech vzorků vzrostla, oproti hodnotě pH samotného inokula (pH=7,43), které bylo použito pro tento test, což nasvědčuje tomu, že zde došlo k uvolnění látek do kapalně fáze. ORP po 50 dnech testování byl v záporných hodnotách, což poukazuje na skutečnost, že po celou dobu testu byly zajištěny anaerobní podmínky.

V Tab. 4 máme taktéž shrnuty data pro procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce bioplynu. Procento mineralizace pro celulózu, která v tomto testu sloužila jako standard, bylo 92,9 %. Tato skutečnost nám také naznačuje dobrou kvalitu použitého anaerobního kalu v tomto testu biodegradace.

Celkový rozklad dle produkce bioplynu a množství rozpuštěného CO_2 v kapalně fázi (D_T) byl nejvyšší pro směsnou fólii PLA/PHB a to 7,36 %, přičemž pro tuto fólii byl zaznamenán i nejvyšší rozklad dle úbytku hmotnosti (Δm) a to 12,24 %. Pro fólii SVIT, stejného složení, ale rozdílné tloušťky, byl zjištěn rozklad D_T z 6,30 % a rozklad Δm z 8,02 %. Pravděpodobně se na celkovém rozkladu podílí i menší povrch a způsob zpracování. Teoretický stupeň biodegradace pro tuto směsnou fólii je cca 14 %, za předpokladu, že přítomné PHB dosahuje za anaerobních mezofilních podmínek stupně mineralizace až 90 %.⁵⁴ Můžeme předpokládat, že pokud by samotný test probíhal delší dobu, mohlo by být dosaženo teoretického stupně mineralizace.

Naopak pro fólii vyrobenou z PLA bylo celkové procento mineralizace 0,28 % a jí podobnou fólii STRUNA (PLA + kompatibilizátory) dosáhlo 0,58 %. U těchto fólií bylo zjištěno také nejnižší procento úbytku hmotnosti fólie, konkrétně pro PLA to bylo 0,55 % a pro

fólii STRUNA 1,0 %. Test potvrdil, že PLA se za mezofilních anaerobních podmínek nerozkládá.

6.2 Test biodegradace v anaerobních termofilních podmínkách

6.2.1 Adaptace anaerobního mezofilního kalu (37 °C) na termofilní podmínky (55 °C)

Pro tento test byl použit anaerobní mezofilní kal z ČOV Zlín-Malenovice o vlastnostech, které jsou uvedeny v *Tab. 5*. Hodnota ORP byla v záporných hodnotách, tudíž byla jistota, že při převozu a manipulaci s kalem, nedošlo k porušení anaerobních podmínek.

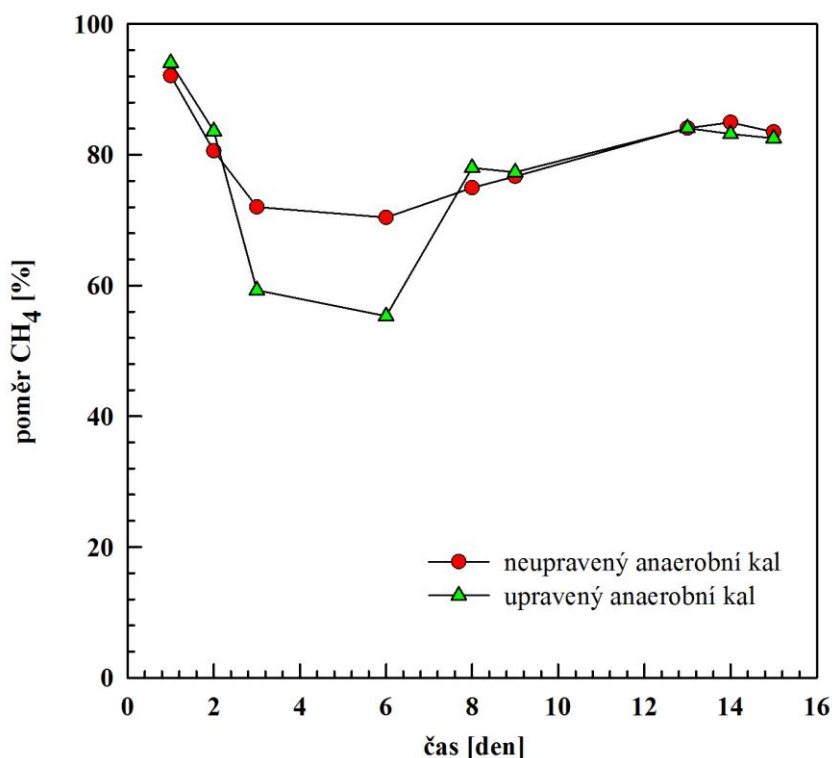
Tab. 5: Charakteristika anaerobního mezofilního kalu pro adaptaci na termofilní podmínky a připraveného termofilního inokula

Vlastnost	Jednotka	Hodnota anaerobního mezofilního kalu	Hodnota termofilního inokula
VL	g.l ⁻¹	32,72	30,41
ZŽ	g.l ⁻¹	15,21	16,29
ZŽ	%	46,49	46,41
ORP	mV	-242,3	-288,8
pH	1	7,21	7,07

Tento anaerobní mezofilní kal byl upraven postupem uvedeným v kapitole 5.2.3.2. Po úpravě anaerobního kalu, který proběhl dvěma způsoby, byla sledována produkce bioplynu u obou upravených kalů během adaptace na termofilní podmínky (55 °C).

Obr. 11 ukazuje procentuální množství CH₄ ve vyprodukovaném bioplynu během adaptace na termofilní podmínky. V prvních dnech došlo k poklesu procentuálního množství CH₄ pod 60 %, to bylo způsobeno právě adaptací mikroorganismů na nové teplotní podmínky. Po 6 dnech adaptace došlo k nárůstu procenta CH₄, přičemž po 15 dnech adaptace bylo procentuální množství CH₄ ve vyprodukovaném bioplynu nad 80 % u obou zpracovaných kalů. Je velmi důležité, aby již adaptovaný anaerobní kal produkoval více jak 60 % CH₄, což bylo splněno.⁷⁻⁸

Jako inokulum pro samotné testování biodegradace za anaerobních termofilních podmínek byl použit již upravený anaerobní kal, který byl použit ve stavu, v jakém se nacházel. Vlastnosti použitého termofilního inokula jsou uvedeny v *Tab. 5*.



Obr. 11: Procentuální zastoupení CH₄ ve vyprodukovaném bioplynu během adaptace anaerobního kalu

6.2.2 Biodegradace za anaerobních termofilních podmínek

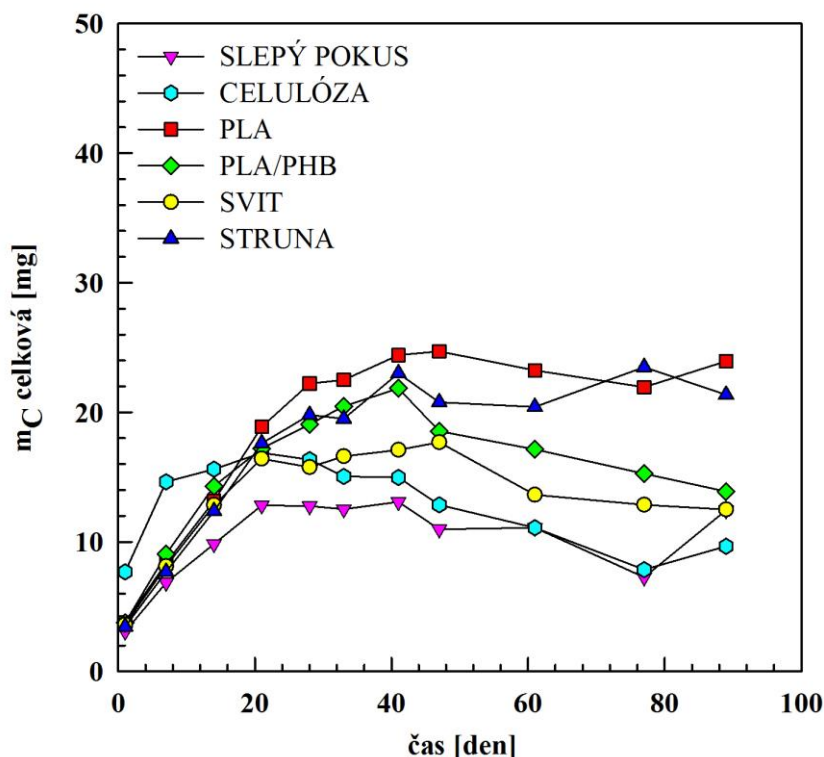
Tomuto testu byly podrobeny fólie z obou sérií, to znamená fólie na bázi PLA/PHB (Slovenská akademie věd) a fólie na bázi PLA s antihydrolyzačním činidlem (Fakulta technologická UTB ve Zlíně).

6.2.2.1 Série 1

Do této série vzorků jsou řazeny tedy následující vzorky: PLA, PLA/PHB, SVIT a STRUNA, jejichž bližší popis je uveden v *Tab. 1*.

Obr. 12 prezentuje výsledky během anaerobní termofilní biodegradace pro vzorky série 1. Z tohoto obrázku je patrné, že nejvyšší množství C bylo vyprodukovaného při biodegradaci fólie PLA a to v množství téměř 25 mg po 90 dnech biodegradace.

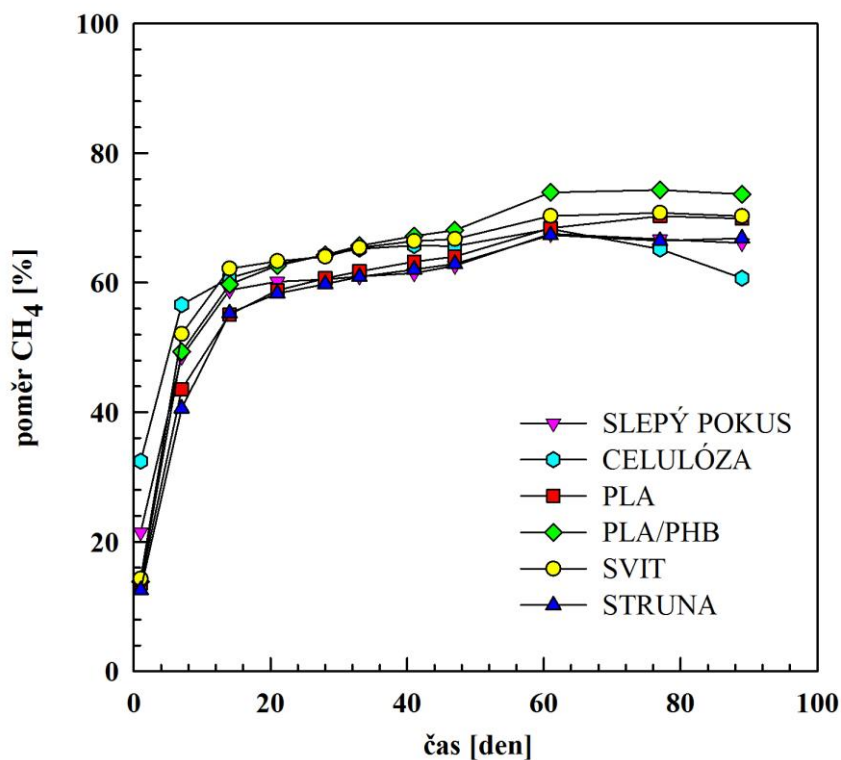
Průběh celulózy, jakožto standardu nebyl ideální, množství uhlíku po 20 dnech začalo klesat. Mohlo to být způsobeno tím, že při promíchávání testovacích lahví došlo k ulpění celulózy na stěnách láhve, celulóza tak nebyla přítomna v anaerobním kalu a tudíž se nemohla rozkládat.



Obr. 12: Celková produkce C v plynné fázi za anaerobních termofilních podmínek pro vzorky série 1

Na následujícím obrázku /Obr. 13/, je znázorněn poměr CH_4 ve vyprodukovaném bioplynu za anaerobních termofilních podmínek. Zde lze vidět, že poměr CH_4 všech testovaných vzorků je vyšší než poměr CH_4 u slepého stanovení, to znamená, že došlo k významné biodegradaci fólií za těchto podmínek.

Nejvyšší poměry CH_4 byly zaznamenány pro směsnou fólii PLA/PHB, u níž byl maximální poměr CH_4 stanoven na hodnotu 74 % po 90 dnech biodegradace. Poměr CH_4 pro standardní látku, celulózu, byl po stejné době pouze 65 %.



Obr. 13: Množství CH_4 ve vyprodukovaném bioplynu za anaerobních termofilních podmínek pro vzorky série 1

Po ukončení testování, bylo v jednotlivých testovacích lahvích stanoveno pH, ORP a v kalové vodě byl stanoven anorganický uhlík (IC). Taktéž byl vypočítán stupeň mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO_2 a CH_4 (D_g) a procento odstranění substrátu dle produkce CO_2 a CH_4 a množství CO_2 rozpuštěného v kapalně fázi (D_T) po 90 dnech biodegradace.

Tato data jsou shrnuta v Tab. 6 pro vzorky, u nichž to bylo možné. Testování probíhalo 4x vedle sebe, nicméně v průběhu testu byly některé testovací láhve vyloučeny vzhledem k nízké produkci bioplynu.

Tab. 6: Stupeň mineralizace testovaných vzorků dle produkce bioplynu (D_g) a celkový rozklad dle produkce bioplynu a množství CO_2 rozpuštěného v kapalně fázi (D_T) testu anaerobní termofilní biodegradace pro vzorky série 1

Vzorek	pH [1]	ORP [mV]	IC [mg.l ⁻¹]	D _g [%]	D _T [%]
CELULÓZA	8,09	-237,1	434,9	38,9	41,6
PLA	7,43	-211,3	473,6	53,9	64,9
PLA/PHB	7,96	-207,1	372,2	29,2	-
SVIT	8,09	-206,1	416,9	19,9	-
STRUNA	7,58	-201,7	449,9	59,9	83,7

Za anaerobních termofilních podmínek dochází k zvýšení přetlaků v testovacích láhvích, taktéž dochází ke generaci anorganického uhlíku, který je rozpuštěn v kapalně fázi. U slepého pokusu v tomto případě byla zjištěna hodnota 413 mg.l⁻¹ IC. Vzhledem k tomu, že v každé testovací láhvi mohl proces biodegradace za těchto podmínek probíhat různě, tak v případě směsné fólie PLA/PHB a SVIT nebylo možné dopočítat hodnotu D_T a to z toho důvodu, že hodnota IC v této láhvi byla nižší než u slepého pokusu. Taktéž nebylo možno zjistit stupeň rozkladu dle úbytku hmotnosti (Δm), jelikož po ukončení testu nebyly fólie v testovacích láhvích nalezeny.

S ohledem na to, že fólie PLA byla rozložena z hlediska naměřených hodnot produkce bioplynu a rozpuštěného oxidu uhličitého v kapalně fázi téměř z 65 %, dá se očekávat v souladu s teorií, že směsná fólie se bude rozkládat úplně. Tuto skutečnost nešlo vyhodnotit přes produkci bioplynu, ale byla potvrzena tím, že po ukončení testu biodegradace vzorky fólií nebyly nalezeny v testovacích lahvích. Z toho lze usoudit, že za termofilních podmínek došlo k úplnému rozkladu a to všech testovaných vzorků. Tato teorie je podpořena testem abiotické, jejíž výsledky jsou uvedeny v kapitole 0.

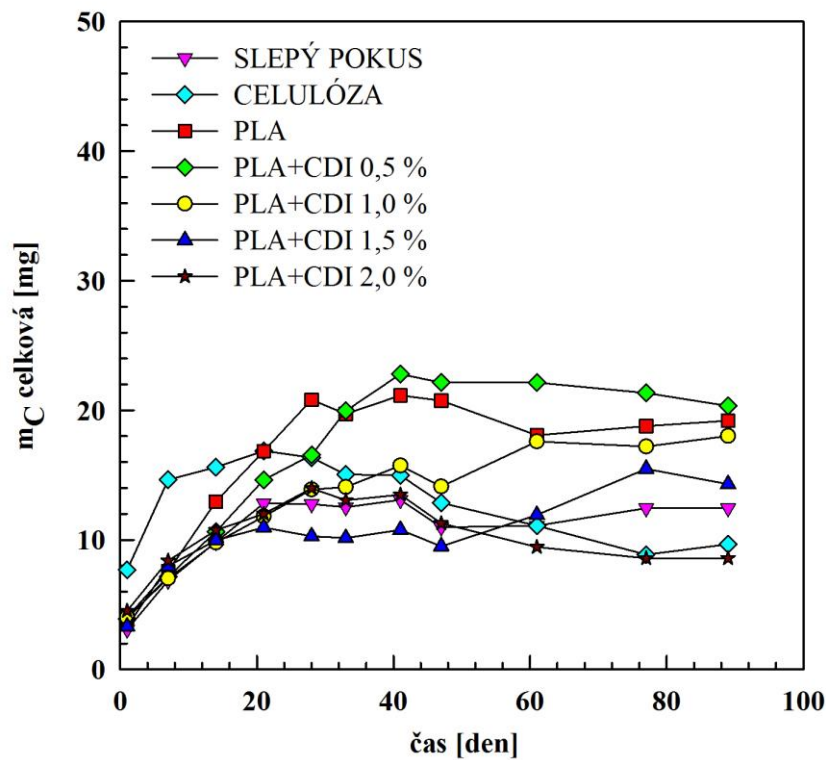
6.2.2.2 Série 2

Zde patří vzorky na bázi PLA s různými procentuálními přídávky antihydrolyzačního činidla (CDI), jejichž bližší popis nalezneme v Tab. 2.

Pokud bychom mezi sebou porovnávali produkci množství uhlíku z uvolněného bioplynu během testování u různých vzorků PLA s různými přídávky antihydrolyzačního činidla na bázi aromatického karboimidu (CDI), tak bychom mohli říci, že čím vyšší procentuální

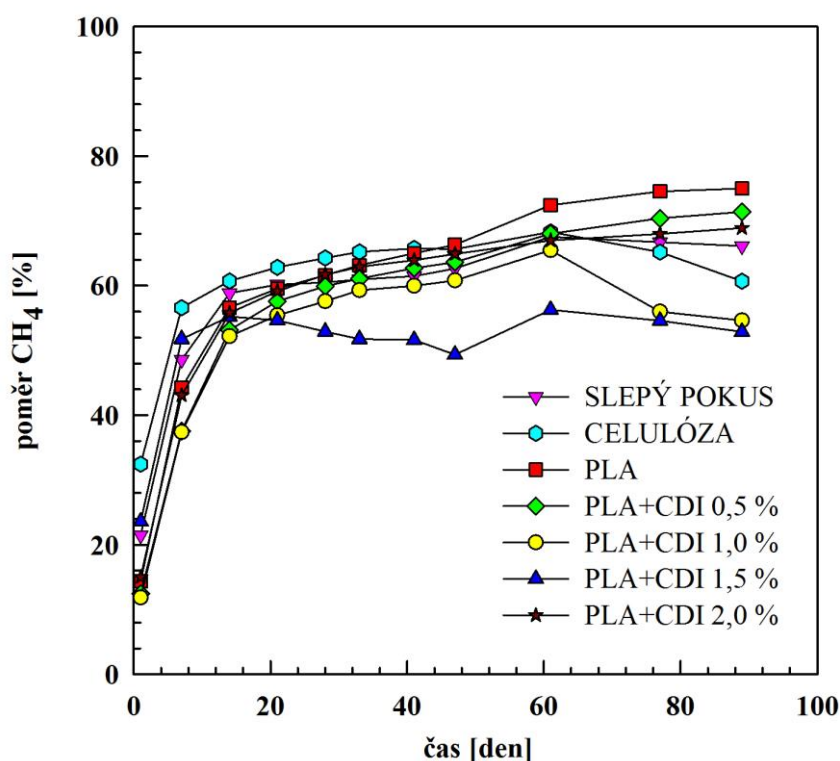
zastoupení CDI, tím nižší produkce bioplynu. Tuto domněnku znázorňuje *Obr. 14*, kde jak můžeme vidět, tak pro PLA bez přídavku CDI a pro PLA s 0,5 % CDI bylo množství C přítomného ve vyprodukovaném bioplynu již od počátku testu významné. Maximální množství uhlíku bylo pro vzorek PLA po 41 dnech testování a to v množství 21,1 mg C a pro PLA+CDI 0,5 % to bylo za stejnou dobu v množství 22,8 mg C. Naopak pro vzorek s nejvyšším procentuálním zastoupením CDI (PLA+CDI 2,0 %) bylo maximálního množství uhlíku přítomného ve vyprodukovaném bioplynu dosaženo po 28 dnech biodegradace a to pouze v množství 13,9 mg C, poté produkce již klesala.

Produkce bioplynu u vzorků PLA s obsahem 1,5 % a 2 % CDI se pohybovala téměř 50 dní pod slepým pokusem, což je doba lagové fáze nebo dokonce se dá mluvit o toxicitě vzorku vůči mikroorganismům. Poté došlo k nárůstu produkce bioplynu u vzorku PLA s obsahem 1,5 % CDI, ale vzorek s 2 % CDI se pohyboval celou dobu testu (90 dní) poblíž slepého pokusu. Biodegradace vzorku PLA s obsahem 0,5 % CDI mělo lagovou fází pouze 20 dnů a vzorek PLA s obsahem 1,0 % CDI mělo lagovou fází 30 dnů. Poté docházelo u obou vzorků k významné produkci bioplynu. Z tohoto faktu se dá usoudit, že přídavek CDI zásadně ovlivňuje průběh biodegradace, to znamená, že toto činidlo napomáhá řízené biodegradaci polymeru.



Obr. 14: Celková produkce C v plynné fázi za anaerobních termofilních podmínek pro vzorky série 2

Co se týče procentuálního zastoupení uhlíku z CH_4 ve vyprodukovaném bioplynu, tak nejvyšší zastoupení bylo u vzorku PLA a to ze 75 %. Naopak nejnižší zastoupení bylo pro vzorek PLA s přidavkem 1,5 % CDI, což je pod slepým pokusem. Tato fólie na inokulum působí jako inhibiční či toxická látka. Tato skutečnost je znázorněna na Obr. 15, což je závislost procentuálního zastoupení uhlíku z CH_4 z vyprodukovaného bioplynu v závislosti na čase během anaerobní termofilní biodegradace pro vzorky série 2.



Obr. 15: Množství CH_4 ve vyprodukovaném bioplynu za anaerobních termofilních podmínek pro vzorky série 2

V Tab. 7 jsou shrnuta data získaná po ukončení testu biodegradace za anaerobních termofilních podmínek, který trval 90 dnů. V testovacích lahvích, stejně jako v předchozím případě, bylo změřeno pH, ORP, byl stanoven IC a byla dopočítána hodnota D_g a D_T .

Tab. 7: Stupeň mineralizace testovaných vzorků dle produkce bioplynu (D_g) a celkový rozklad dle produkce bioplynu a množství CO_2 rozpuštěného v kapalně fázi (D_T) testu anaerobní termofilní biodegradace pro vzorky série 2

Vzorek	pH [1]	ORP [mV]	IC [mg.l ⁻¹]	D_g [%]	D_T [%]
CELULÓZA	8,09	-237,1	434,9	38,9	41,6
PLA	7,96	-203,4	460,9	45,9	53,1
PLA+CDI 0,5 %	7,44	-199,4	475,0	51,1	60,2
PLA+CDI 1,0 %	7,22	-211,6	414,8	35,4	-
PLA+CDI 1,5 %	7,75	-200,8	431,2	39,9	41,8
PLA+CDI 2,0 %	7,57	-194,7	440,8	30,2	33,3

Nejvyšší procento mineralizace z hlediska produkce bioplynu a množství CO₂ rozpuštěného v kapalně fázi nastalo u vzorku PLA+CDI 0,5 % a to z 60,2 %, naopak nejnižší procento nastalo u vzorku PLA+CDI 2,0 % a to z 33,3 %. Což nasvědčuje tomu, že antihydrolyzační činidlo ovlivňuje průběh hydrolyzy během biodegradace ve vodném anaerobním prostředí a tím následně ovlivňuje stupeň mineralizace..

Jak si můžeme všimnout v *Tab. 6* a *Tab. 7*, jsou uvedeny výsledky pro PLA, které se liší, při tom byly podrobeny degradaci za stejných podmínek ve stejně zpracovaném kalu. Tento rozdíl může být ovlivněn způsobem zpracování PLA a jejich molekulovou hmotností. PLA v *Tab. 6* pochází ze Slovenské akademie věd a její molekulová hmotnost není známa a naopak PLA v *Tab. 7* pochází z FT a její molekulová hmotnost je 78 590 g.mol⁻¹.

6.3 Test biodegradace v aerobních podmínkách

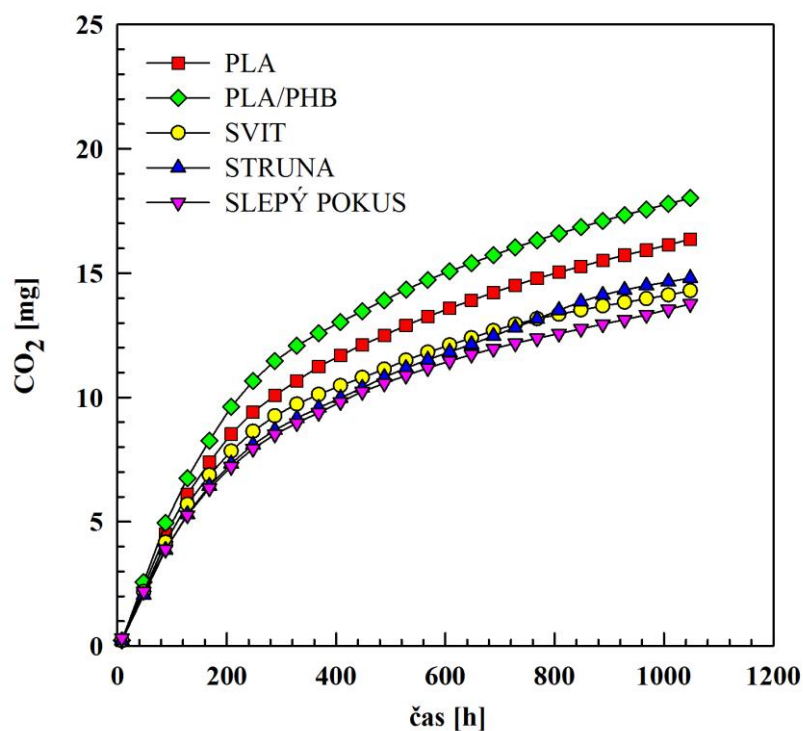
6.3.1 Charakteristika aerobního kalu a inokula

Pro test biodegradace za aerobních podmínek byl použit aerobní kal, který byl dovezen z ČOV Zlín-Malenovice, u tohoto kalu byla stanovena sušina na hodnotu 6,80 g.l⁻¹ a po té byl upraven dle kapitoly 5.2.4.

Po úpravě a přípravě inokula pro tento test, byla stanovena sušina pro samotné inokulum na hodnotu 4,03 g.l⁻¹ a taktéž bylo změřeno pH, jež mělo hodnotu 7,68. Toto inokulum bylo použito jako vodné prostředí pro biodegradaci za aerobních podmínek.

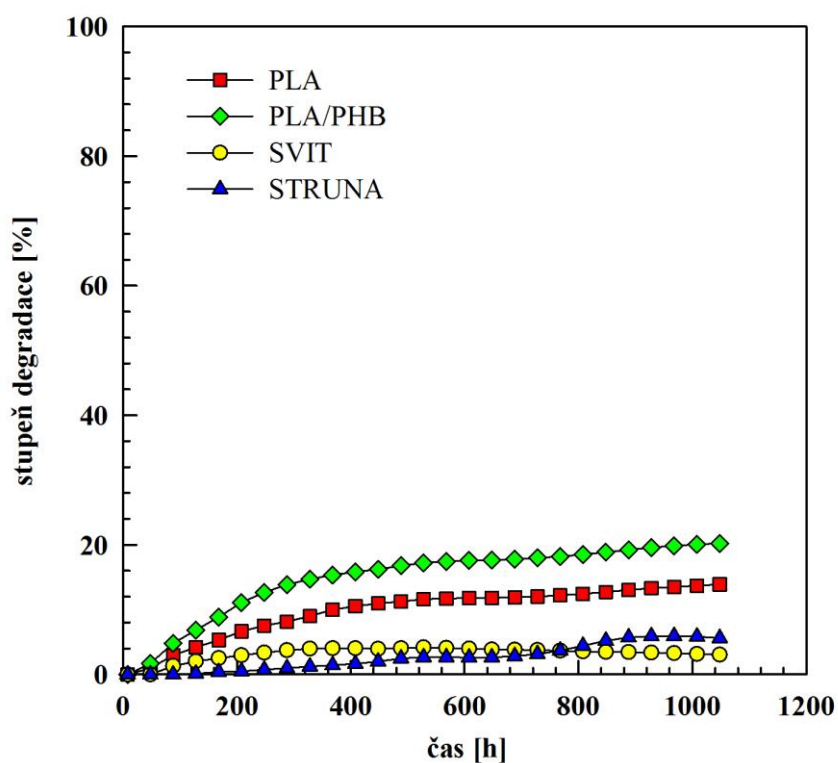
6.3.2 Biodegradace za aerobních podmínek

Biodegradaci za aerobních podmínek, tedy v aerobním kalu, byly podrobeny fólie získané ze Slovenské akademie věd. Jednalo se tedy o fólie na bázi PLA s přísadami PHB a dalších přísad. Na *Obr. 16* je znázorněna závislost produkce CO₂ na čase. Jak můžeme vidět, tak nejvyšší produkce CO₂ byla zaznamenána pro směsnou fólii PLA/PHB, u níž po 44 dnech biodegradace bylo vyprodukováno 18,0 mg CO₂, na druhou stranu nejnižší produkce CO₂ byla vyprodukována u fólie SVIT a to v množství 14,3 mg po 44 dnech biodegradace.



Obr. 16: Závislost produkce CO₂ na čase

Obr. 17 znázorňuje průběh stupně biodegradace testovaných fólií na čase. Z těchto průběhů vyplývá, že nejvyšší stupeň degradace byl dosažen u směsné fólie PLA/PHB a to z 20,2 % po 44 dnech testování. Fólie PLA byla rozložena téměř ze 14 % po 44 dnech testu. Tento výsledek koresponduje s prací Itäv18ara¹⁸, který udává cca 10% rozklad za mezofilních aerobních podmínek. Nízký stupeň degradace byl zjištěn u fólií SVIT a STRUNA, přičemž fólie SVIT byla rozložena z necelých 4 % a fólie STRUNA byla rozložena téměř z 6 %. Stejně jako u anaerobního mezofilního testu i zde je patrný vliv příměsi PHB, který podporuje biologický rozklad, respektive navyšuje stupeň degradace.



Obr. 17: Stupeň biodegradace testovaných fólií

Tab. 8 reprezentuje data získaná po ukončení aerobního testu, kdy v jednotlivých testovacích lahvích bylo změřeno pH a v kapalně fázi bylo stanoveno množství uhlíku.

Tab. 8: Stupeň biodegradace fólií v aerobním testu

Vzorek	pH [1]	TC [mg.l ⁻¹]	IC [mg.l ⁻¹]	TOC [mg.l ⁻¹]	Stupeň degradace [%]
SL _{začatek}	7,68	13,0	3,6	9,5	-
SL _{konec}	6,41	10,2	0,8	9,4	-
PLA	6,57	9,9	0,8	9,1	13,88
PLA/PHB	6,54	18,7	0,9	17,9	20,23
SVIT	6,56	13,5	0,8	12,7	3,03
STRUNA	6,48	12,1	0,7	11,4	5,61

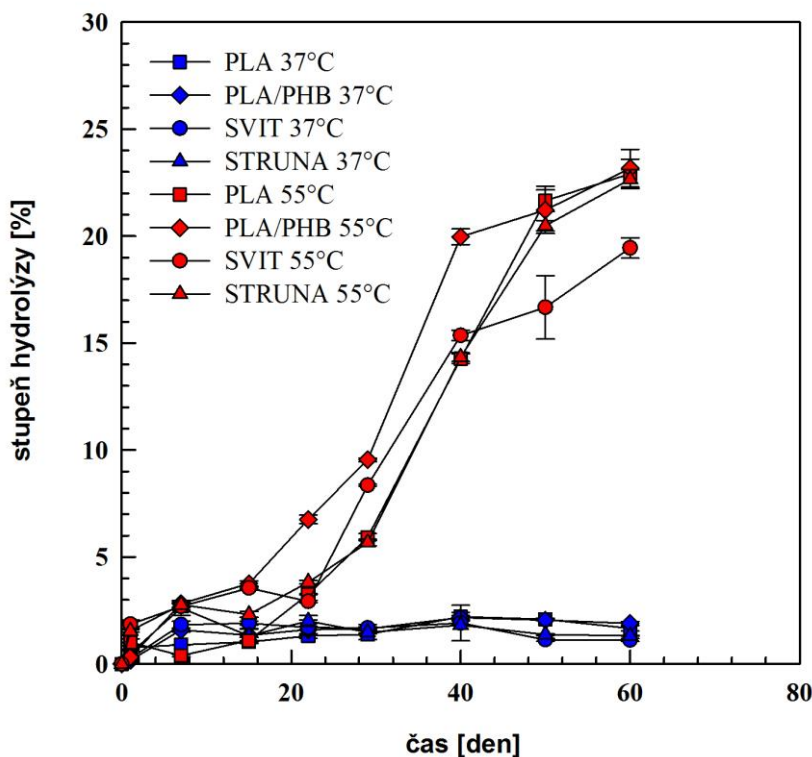
Hodnota IC reprezentuje množství CO₂ rozpuštěného v kapalně fázi. Oproti původní hodnotě ve slepém pokusu, jsou další hodnoty IC nižší, což znamená, že během testu v kapalně

fázi zůstala zanedbatelná část CO₂. Zvýšené hodnoty TOC u některých lahví se vzorky, mohou indikovat, že fólie podléhala i hydrolyze a ne pouze biodegradaci.

6.4 Test abiotické hydrolyzy

Fólie ze Slovenské akademie věd byly podrobeny abiotické hydrolyze. Tato abiotická hydrolyza trvala 60 dní a její průběh je zobrazen na *Obr. 18*. Výsledky byly vyhodnoceny na základě množství rozpuštěného organického uhlíku v kapalně fázi.

Na tomto obrázku /*Obr. 18*/ lze jasně vidět, že zásadní vliv na stupeň hydrolyzy má teplota. Za mezofilních podmínek (37 °C) bylo dosaženo stupně hydrolyzy okolo 2 % a to pro fólie PLA a PLA/PHB. Průběh stupně hydrolyzy za mezofilních podmínek byl víceméně ustálený. Naopak za termofilních podmínek (55 °C) můžeme vidět nejdříve mírný nárůst stupně hydrolyzy a po 22 dnech hydrolyzy (lagová fáze) lze spatřit výrazný růst stupně hydrolyzy a to pro všechny testované vzorky. I za těchto podmínek bylo nejvyššího stupně hydrolyzy dosaženo pro fólie PLA a PLA/PHB, a to z 23 % pro oba případy, přičemž stupeň hydrolyzy by s časem stále narůstal.



Obr. 18: Stupeň abiotické hydrolyzy pro testované vzorky

Během průběhu abiotické hydrolýzy bylo zpozorováno u fólií v hydrolýze za mezofilních podmínek mléčné zbarvení a to po 7 dnech pro vzorek SVIT, po 15 dnech to bylo vzorek STRUNA a po 22 dnech pro vzorky PLA a PLA/PHB.

Tyto změny v barvě fólií (zmléčnění) byly pozorovány i při hydrolýze za termofilních podmínek, ovšem zde byl průběh o něco jiný. Zmléčnění fólie SVIT bylo pozorováno také po 7 dnech stejně jako u mezofilních podmínek, nicméně u zbývajících fólií bylo následné zmléčnění zpozorováno již po 15 dnech abiotické hydrolýzy.

Zmléčnění fólií během procesu hydrolýzy bylo způsobeno vlivem strukturních změn v testovaných fóliích. Mohly nastat dva případy strukturních změn v těchto fóliích, buď to docházelo ke krystalizaci, nebo došlo k fázové separaci, kdy ve fólii byly přítomny dvě fáze s různým indexem lomu.

Po 30 dnech testu byly také viditelný rozpad fólií v termofilních podmínkách na menší kousky, po 60 dnech, tedy na konci testu, fólie byly rozpadnuty na velmi malé částičky. U mezofilních podmínek rozpad fólií nebyl vůbec viditelný, čemuž odpovídá i průběh stupně hydrolýzy na čase, kde jak už bylo zmíněno, nedošlo k významnému rozpadu.

Hydrolýza je krok, který uděluje počátek biodegradace, to znamená, že nejdříve dochází k hydrolýze a až poté k samotné biodegradaci. Z tohoto důvodu je studium hydrolýzy nezbytnou součástí během testů biodegradace. Jak už bylo řečeno v teoretické části diplomové práce, tak ve studii Husárová a kolektiv³² byla provedena hydrolýza za různých teplot pro vzorky PLA o různých molekulových hmotnostech. V této studii bylo uvedeno, že po 80 dnech hydrolýzy při 58 °C je možno dosáhnout stupně hydrolýzy až 100 %. Tento konkrétní výsledek byl zjištěn pro syntetizované PLA ($M_w=34\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) Můžeme se tedy domnívat, že pokud bychom test hydrolýzy sledovali delší dobu, bylo by dosaženo podobných výsledků.

Lagová fáze u hydrolýzy při 55 °C trvala 22 dnů a při biodegradaci za anaerobních termofilních podmínek (55 °C) trvala 20 dnů. To znamená, že při biodegradaci byl vliv hydrolýzy a také přítomných mikroorganismů, proto zde lagová fáze trvala kratší dobu než při samotném testu hydrolýzy. Toto porovnání lagových fází můžeme provést i u hydrolýzy při 37 °C, kde průběh hydrolýzy byl víceméně ustálený, a u anaerobní biodegradace za mezofilních podmínek (37 °C), kde lagová fáze trvala 22 dní, opět zde tedy došlo k působení jak samotné hydrolýzy, tak mikroorganismů.

V průběhu abiotické hydrolýzy byly z jedné testovací láhve odebírány vzorky fólie pro další stanovení, jako je Fourierova transformační infračervená spektroskopie (FTIR) a diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), jejichž výsledky jsou uvedeny v následující kapitole. Taktéž by mohlo být zajímavé odebírat vzorky fólií pro stanovení molekulových hmotností, která by se měla v průběhu hydrolýzy měnit, anebo sledovat morfologické změny pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM). Nicméně tyto studie nebyly provedeny.

6.5 Studium morfologických změn testovaných fólií

U fólií, které byly podrobeny biodegradaci a abiotické hydrolýze, byly sledovány tepelné změny pomocí DSC a také změny ve struktuře fólie pomocí FTIR.

Tato studie byla konkrétně provedena pro vzorek fólie PLA a SVIT, které byly podrobeny anaerobní biodegradaci za mezofilních podmínek a abiotické hydrolýze při 37 °C.

6.5.1 Diferenční skenovací kalorimetrie

Krystalinita (X) je ovlivněna pohybem segmentů, tedy řetězci daného polymeru. Tento pohyb je ohraničen dvěma teplotami, a to teplotou skelného přechodu (T_g) a teplotou tání (T_m). Obě teploty ovlivňují pohyb řetězce, přičemž pokud je teplota pod T_g , tak dochází k zastavení pohybu, naopak pokud je teplota nad T_m , je pohyb řetězců intenzivní.

V *Tab. 9* jsou již shrnuta získaná data teploty tání, teploty studené krystalizace (T_c) a procenta krystalinity pro fólii PLA. T_c je teplota tzv. studené krystalizace, což je jev, kdy při ohřevu polymer krystalizuje. Tento jev byl zaznamenán pro některé vzorky fólie PLA. V *Tab. 9* vidíme, že došlo k mírnému nárůstu T_m oproti původnímu vzorku. Pokud bychom porovnali hodnoty X fólie PLA před samotnými testy, tzn. hydrolýzou a biodegradací, s hodnotami po těchto testech, které probíhaly při 37 °C, lze si všimnout, že došlo k nárůstu X .

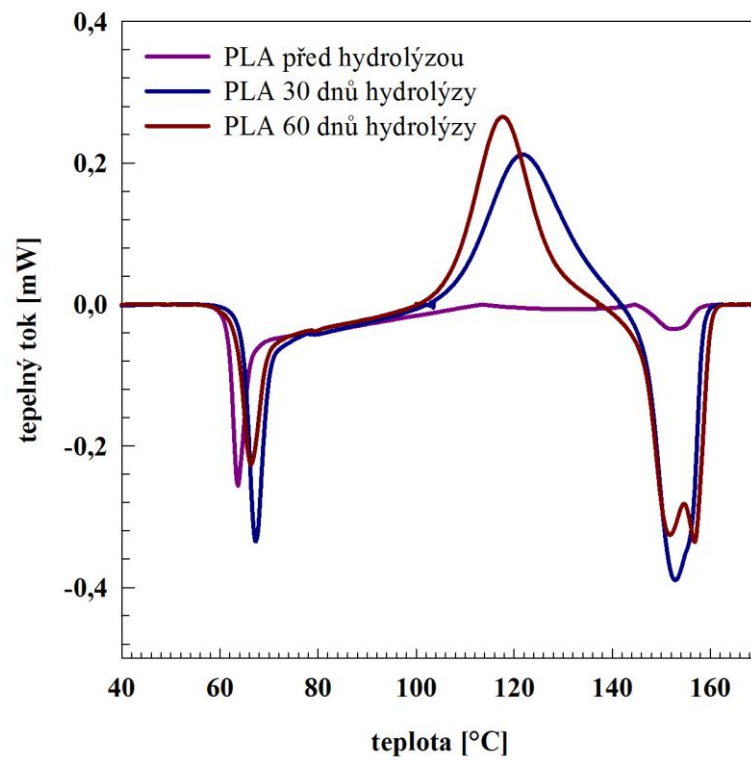
Touto skutečností se potvrdilo i to co dříve napsali autoři jako je Chu C.C. či Pegoretti A. s Penati A., kteří tvrdili, že degradace se nejdříve projeví v amorfních částech a až posléze v krystalické fázi.⁵⁵⁻⁵⁶

Tab. 9: Teplota tání (T_m), teplota studené krystalizace (T_c) a krystalinita (X) pro fólii PLA

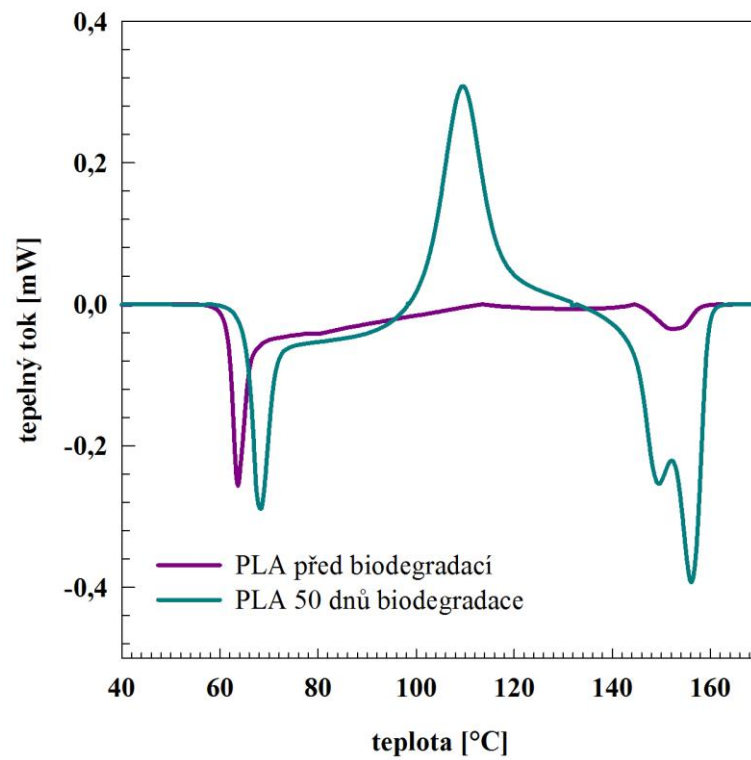
Název vzorku	T_m	X_1	T_c	X_2
	[°C]	[%]	[°C]	[%]
PLA před hydrolyzou/biodegradací	63,53	4,56	-	-
	151,84	2,20		
PLA 30 dnů hydrolyzy při 37 °C	67,03	7,05	121,29	18,25
	152,57	20,97		
PLA 60 dnů hydrolyzy při 37 °C	66,23	5,71	117,51	20,64
	151,45	0,73		
PLA po 50 dnech biodegradace při 37 °C	156,61	22,75		
	68,02	7,22	109,49	21,35
	149,25	0,33		
	155,86	24,38		

Na *Obr. 19* a *Obr. 20* jsou znázorněny DSC termografy pro fólii PLA, která byla podrobena testu hydrolyzy a testu biodegradace. Na *Obr. 20* lze vidět, že pro PLA před hydrolyzou byly zaznamenány dvě teploty tání (63,53 °C a 151,84 °C). Po testu hydrolyzy došlo k posunu teplot tání a byly zaznamenány tři hodnoty, jak můžeme vidět na *Obr. 19*. Tento záznam, kde lze spatřit rozdělení teploty tání vlivem vzniklého píku, lze odůvodnit tím, že jsou zde přítomny krystaly dvou velikostí. Během hydrolyzy, a to jak v 30. dnu, tak v 60. dnu, byla díky DSC zpozorována studená krystalizace pro PLA, to znamená, že při ohřevu PLA krystalizovalo.

Obr. 20 znázorňuje posun T_m po 50 denní biodegradaci ve vodném anaerobním prostředí při teplotě 37 °C, zde nastal posun asi o 4 °C (vyhodnoceno pro poslední zaznamenanou T_m). To znamená, že během samotných testů, hydrolyzy a biodegradace, došlo k určitému odbourání nejdříve amorfních částí řetězce polymeru a až poté krystalických částí řetězce. I u fólie po 50 denní biodegradaci byla zaznamenána teplota studené krystalizace.



Obr. 19: DSC termografy pro fólii PLA podrobnou hydrolyze



Obr. 20: DSC termografy pro fólii PLA podrobnou biodegradaci

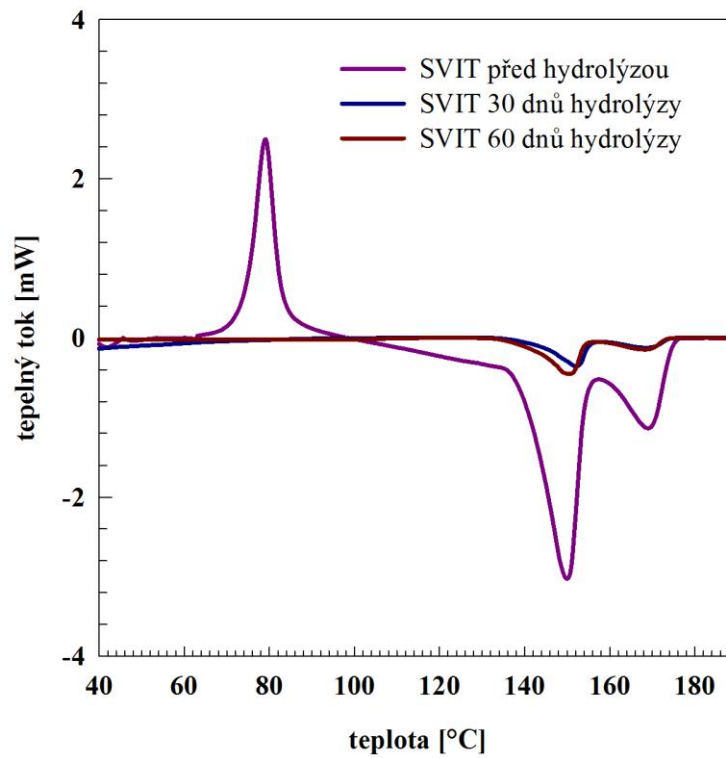
Tab. 10 shrnuje získaná data z DSC pro fólii SVIT, která je složena z PLA a PHB, z tohoto důvodu jsou zde uvedeny vždy dvě hodnoty pro T_m i X . Posuny u T_m nejsou významné, pohybují se kolem hodnot původního vzorku, tato skutečnost je znázorněna i na Obr. 21 a Obr. 22. Naopak posuny X jsou značně viditelné. Krystalinita této fólie byla pro první zaznamenaný pík vyšší než u původního vzorku, kdežto pro druhý zaznamenaný pík byla nižší než v původním vzorku.

Tab. 10: Teplota tání (T_m), teplota studené krystalizace (T_c) a krystalinita (X) pro fólii SVIT

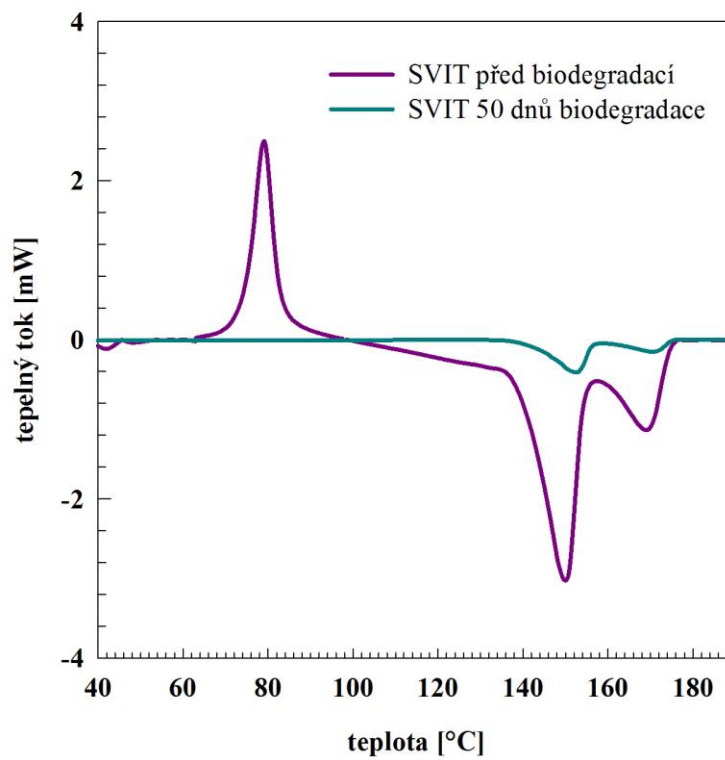
Název vzorku	T_m [°C]	X_1 [%]	T_c [°C]	X_2 [%]
SVIT před hydrolyzou/biodegradací	149,76	10,99.10 ³	79,18	10,99.10 ³
	169,16	10,99.10 ³		
SVIT 30 dnů hydrolyzy při 37 °C	151,96	17,44	-	-
	169,04	5,39		
SVIT 60 dnů hydrolyzy při 37 °C	150,03	25,19	-	-
	168,28	6,42		
SVIT po 50 dnech biodegradace při 37 °C	152,37	21,98	-	-
	170,44	7,30		

Obr. 21 a Obr. 22 znázorňují DSC termogramy pro fólii SVIT podrobenou hydrolyze a testu biodegradace. Obr. 21 znázorňují posun T_m fólie SVIT v testu hydrolyzy a Obr. 22 znázorňují posun T_m fólie SVIT v testu biodegradace.

Jak už bylo zmíněno, nedocházelo k výraznému posunu T_m . U testu hydrolyzy byl rozdíl T_m před hydrolyzou a po 60 dnech hydrolyzy stanoven na hodnotu 0,27 °C pro první pík a 0,88 °C pro pík druhý. Po testu biodegradace za anaerobních mezofilních podmínek byl posun T_m 2,61 °C a 1,28 °C. To znamená, že můžeme předpokládat strukturální změnu polymeru. Teplota studené krystalizace byla zaznamenána pouze pro vzorek před samotnými testy, činila 79,18 °C.



Obr. 21: DSC termografy pro fólii SVIT podrobnou hydrolyze



Obr. 22: DSC termografy pro fólii SVIT podrobnou biodegradaci

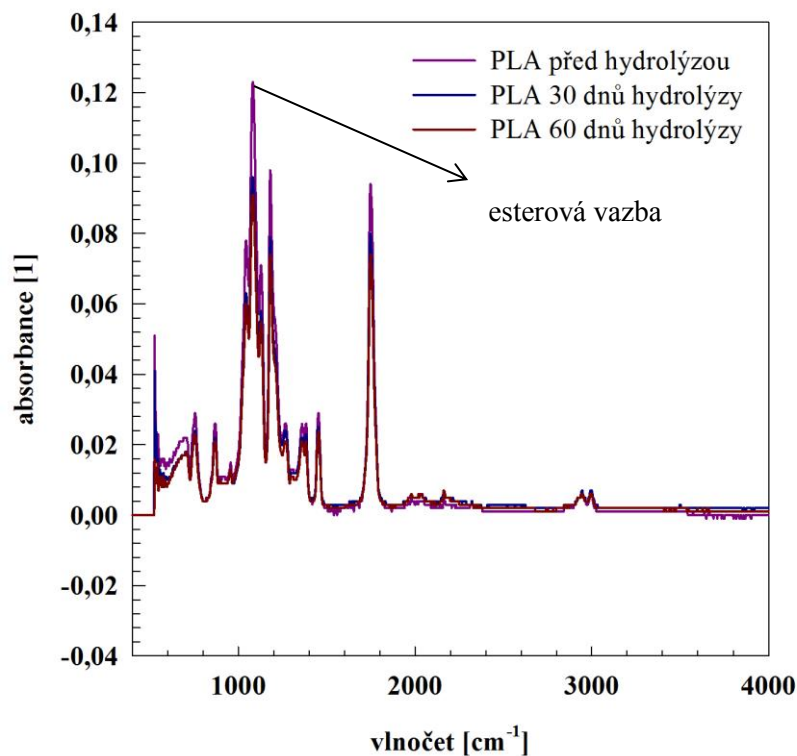
6.5.2 Fourierova transformační infračervená spektroskopie

FTIR spektra pro vzorky fólií PLA a SVIT jsou znázorněna na *Obr. 23–Obr. 26*. Přičemž na všech obrázcích je označen pík specifický pro esterovou vazbu, ta je detekována při hodnotě vlnočtu 1083 cm^{-1} .

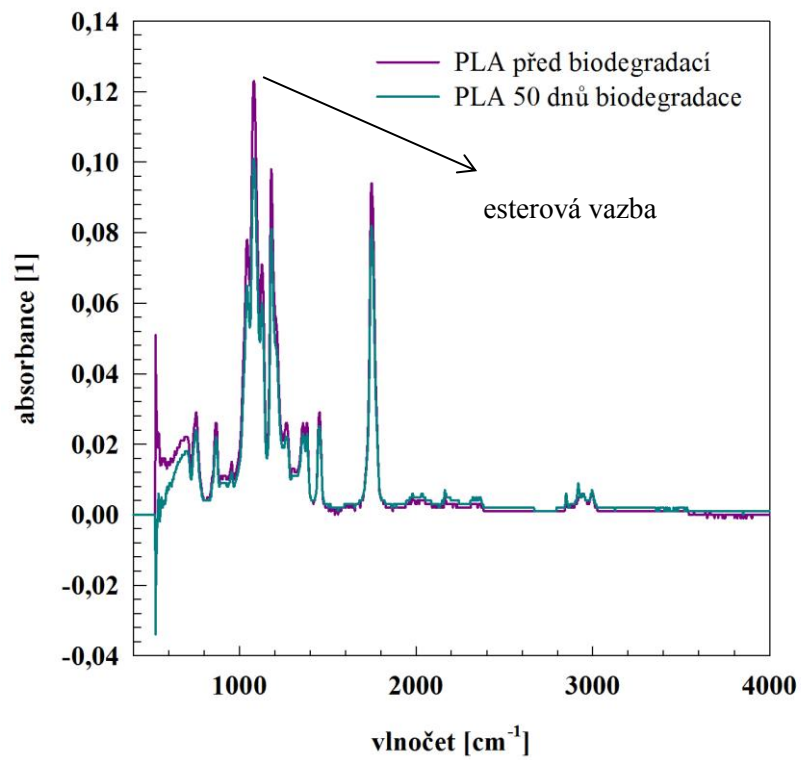
Obr. 23 ukazuje změnu výšky píku esterové vazby pro fólii PLA před hydrolyzou a po 60 dnech hydrolyzy, je zde patrné snížení tohoto píku, což naznačuje skutečnost, že došlo k přerušování esterových vazeb této fólie během testu hydrolyzy.

Na *Obr. 24* je tento průběh naznačen po anaerobní mezofilní biodegradaci, zde došlo opět ke snížení polohy píku pro esterovou vazbu oproti původnímu vzorku PLA, z čehož můžeme usoudit, že došlo ke změně struktury fólie za anaerobních mezofilních podmínek.

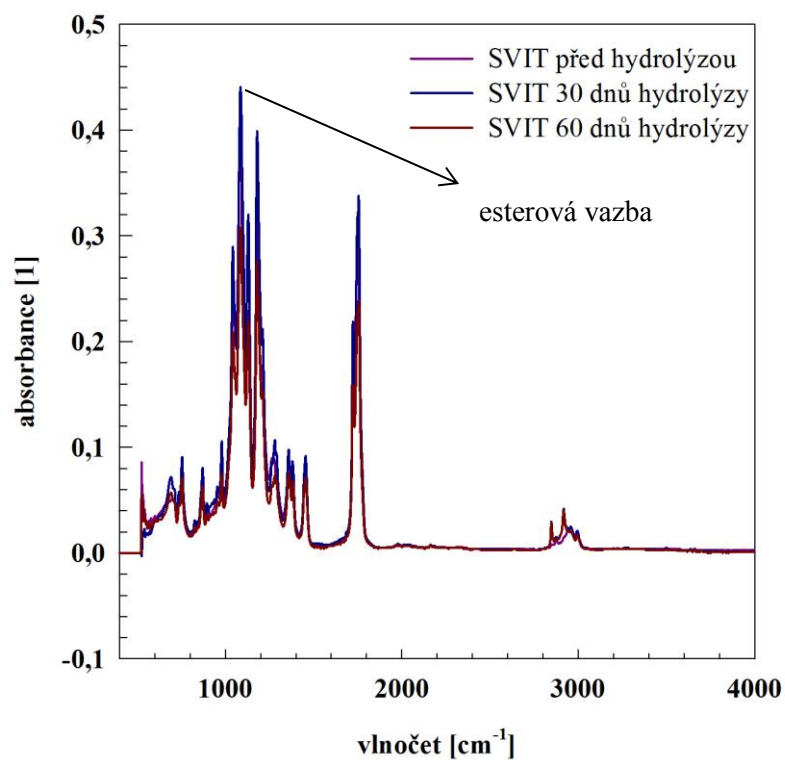
Obr. 25 a *Obr. 26* reprezentují spektra pro fólii SVIT (PLA/PHB), u níž taktéž byla sledována výška píku esterové vazby. *Obr. 25* znázorňuje změnu během testu hydrolyzy a *Obr. 26* znázorňuje opět změnu během testu biodegradace za anaerobních mezofilních podmínek. V obou dvou případech vidíme, že došlo ke snížení výšky píku esterové vazby, což znamená, že došlo k narušení této vazby a tudíž ke změně struktury tohoto polymeru.



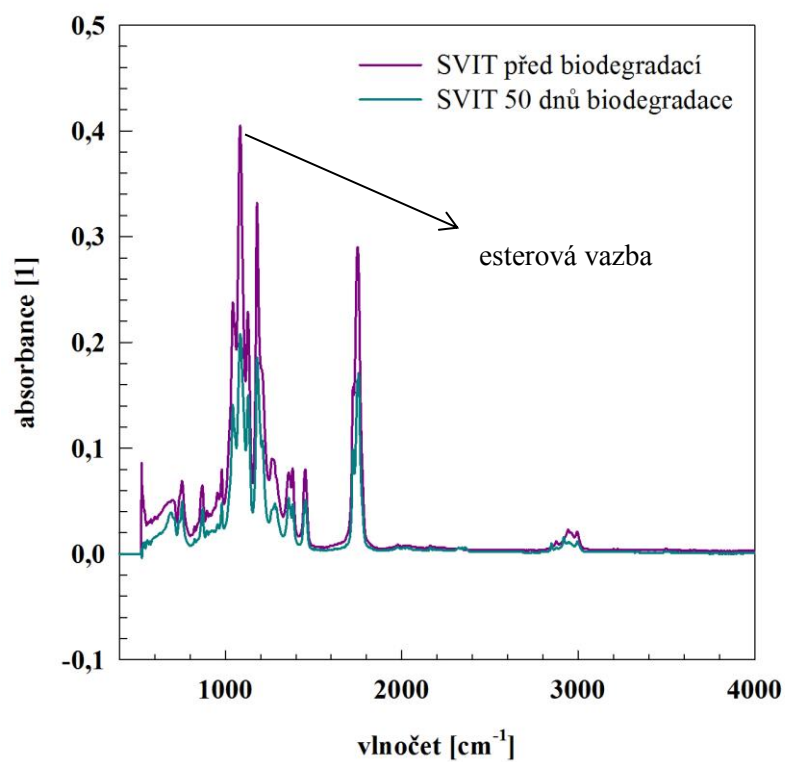
Obr. 23: FTIR spektrum pro fólii PLA během abiotické hydrolyzy



Obr. 24: FTIR spektrum pro fólii PLA před a po biodegradaci



Obr. 25: FTIR spektrum pro fólii SVIT během abiotické hydrolyzy



Obr. 26: FTIR spektrum pro fólii SVIT před a po biodegradaci

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo sledování biodegradace fólie na bázi kyseliny polymléčné v aerobním a anaerobním vodném prostředí. Pro studium biodegradace byly zvoleny dvě série vzorků. Série 1 obsahovala fólie na bázi PLA spolu s PHB a dalšími přísadami. Série 2 byla složena z fólií PLA společně s různými přísadami antihydrolyzačního činidla. Fólie ze série 1 byly podrobeny biodegradaci v anaerobním mezofilním i termofilním prostředí a také v prostředí aerobním a současně probíhal test hydrolýzy. Fólie ze série 2 byly podrobeny pouze biodegradaci za anaerobních termofilních podmínek a to z toho důvodu, že se zde předpokládal vliv antihydrolyzačního činidla, proto pro biodegradaci těchto fólií byly zvoleny náročnější podmínky, v tomto případě tedy vysoká teplota 55 °C.

Na základě uvedených testů bylo potvrzeno, že samotná PLA a PLA v kombinaci s přísadami (STRUNA) nepodléhá biodegradaci za mezofilních podmínek (25 °C, 37 °C) ani v aerobním ani v anaerobním prostředí. Rozklad PLA v aerobních podmínkách dosáhl maximálně 14 %, v anaerobních podmínkách dle produkce bioplynu to bylo pouze 0,2 %. Vzorek označený jako STRUNA dosáhl stupně degradace v aerobních podmínkách 6 % a v anaerobních dle produkce bioplynu 0,5 %. Vzorky PLA ve směsi s cca 15 % PHB (fólie PLA/PHB, SVIT) byly za anaerobních podmínek dle produkce bioplynu rozloženy z 6-7 %. U aerobních podmínek byl rozklad obou fólií rozdílný. Směsná fólie PLA/PHB se za těchto podmínek rozkládala z 20 % a SVIT z 3 %.

Naopak všechny vzorky PLA i jejich směsí jsou biodegradovatelné za anaerobních termofilních podmínek. Na základě měření produkce bioplynu během testu bylo stanoveno, že u fólie PLA došlo k odstranění z 54 % a u fólie STRUNA z 60 %. Pokud jde o stanovení rozkladu vzorků dle úbytku jejich hmotnosti, lze konstatovat, že u všech vzorků došlo za termofilních podmínek k úplnému rozkladu.

To, že PLA podléhá degradaci při vyšší teplotě, bylo potvrzeno i abiotickou hydrolýzou při 55 °C, která byla u těchto fólií stanovena. Stupeň hydrolýzy dosažený během 60 dní při 55 °C pro PLA, PLA/PHB a STRUNU byl okolo 23 % a pro SVIT 19 %. A taktéž zde byl pozorován rozpad fólií na malé kousky, které byly velmi křehké. Na základě těchto výsledků lze tvrdit, že biologický rozklad PLA a jejich směsí je jednoznačně ovlivněn stupněm hydrolýzy, přičemž hydrolýza je závislá na teplotě.

Za anaerobních termofilních podmínek byly sledovány taktéž směsí PLA s různými procentuálními přísadami antihydrolyzačního činidla (CDI). I u těchto fólií byl potvrzen roz-

klad, přičemž nejnižšího stupně rozkladu dle produkce bioplynu bylo dosaženo u vzorku PLA s 2 % CDI, tento vzorek se rozkládal z 30 %, naopak nejvyššího stupně rozkladu dle produkce bioplynu bylo dosaženo u vzorku PLA s 0,5 % CDI, kde byl zjištěn rozklad z 51 %. Lze tedy konstatovat, že čím vyšší procentuální zastoupení CDI ve směsi, tím nižšího stupně rozkladu se dosáhne.

I přesto, že za anaerobních mezofilních podmínek a při abiotické mezofilní hydrolýze nebylo dosaženo vysokých hodnot rozkladu, jako je tomu u termofilních podmínek, tak lze říci, že zde došlo ke strukturálním změnám daného polymeru, což bylo potvrzeno DSC a FTIR fólií PLA a PLA/PHB (SVIT), u nichž byly sledovány změny v průběhu hydrolýzy a po biodegradaci. Test DSC u obou fólií potvrdil změnu krystalinity a posun T_m . Pomocí FTIR byla zase identifikována změna velikosti píku odpovídajícího esterové vazbě, jak v testu hydrolýzy, tak v testu biodegradace pro obě fólie, což naznačuje právě zánik této vazby.

V diplomové práci byly tedy potvrzeny studie, které se zabývají biodegradací PLA ve vodném prostředí. Bylo tedy potvrzeno, že nejlepšími podmínkami pro biodegradaci PLA či směsí na bázi PLA, jsou podmínky anaerobní termofilní (55 °C), za nichž dochází k vysokému stupni rozkladu. Naopak za anaerobních mezofilních (37 °C) podmínek popřípadě aerobních podmínek k významnému rozkladu nedochází.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATBC	Acetyl-tri-n-butyl citrát
D _g	Stupeň mineralizace z hlediska produkce CH ₄ CO ₂
DSC	Diferenční skenovací kalorimetrie
D _T	Procento odstranění substrátu dle produkce CH ₄ a CO ₂ a množství CO ₂ rozpuštěné v kapalně fázi
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
FID	Plamenově ionizační detektor
FT	Fakulta technologická
FTIR	Fourierova transformační infračervená spektrometrie
GC	Plynová chromatografie
IC	Anorganický uhlík
LIM	Limonen
PBS	Polybutylsukcinát
PCL	Polykaprolakton
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PES	Polyethylensukcinát
PHB	Polyhydroxybutyrát
PHBV	Polyhydroxyvalerát
PLA	Kyseliny polymléčná
SEM	Rastrovací elektronový mikroskop
T _c	Teplota krystalizace
TC	Celkový uhlík
TCD	Tepelně vodivostní detektor
T _g	Teplota skelného přechodu

T_m	Teplota tání
TOC	Celkový organický uhlík
USA	United States of America
UTB	Univerzita Tomáše Bati
VUVCH	Výzkumný ústav chemických vláken
X	Krystalinita

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Chemická struktura PLA</i>	19
<i>Obr. 2: Chemická struktura PHB¹⁹</i>	20
<i>Obr. 3: Chemická struktura PCL¹⁹</i>	21
<i>Obr. 4: Chemická struktura PBS¹⁹</i>	22
<i>Obr. 5: Chemická struktura PES¹⁹</i>	22
<i>Obr. 6: Růstová křivka mikroorganismů¹⁴</i>	24
<i>Obr. 7: Stupeň hydrolyzy pro vzorky PLA při různých teplotách⁴⁴</i>	27
<i>Obr. 8: Aparatura MODA-B; (1) teplotní senzor, (2) vzorkovací vak, (3) pumpa, (4) obklopující obal, (5) zkušební láhev, (6) topidlo uvnitř obalu⁸</i>	29
<i>Obr. 9: Celková produkce uhlíku v plynné fázi za anaerobních mezofilních podmínek</i>	54
<i>Obr. 10: Procentuální zastoupení CH₄ ve vyprodukovaném bioplynu za anaerobních mezofilních podmínek</i>	55
<i>Obr. 11: Procentuální zastoupení CH₄ ve vyprodukovaném bioplynu během adaptace anaerobního kalu</i>	58
<i>Obr. 12: Celková produkce C v plynné fázi za anaerobních termofilních podmínek pro vzorky série 1</i>	59
<i>Obr. 13: Množství CH₄ ve vyprodukovaném bioplynu za anaerobních termofilních podmínek pro vzorky série 1</i>	60
<i>Obr. 14: Celková produkce C v plynné fázi za anaerobních termofilních podmínek pro vzorky série 2</i>	63
<i>Obr. 15: Množství CH₄ ve vyprodukovaném bioplynu za anaerobních termofilních podmínek pro vzorky série 2</i>	64
<i>Obr. 16: Závislost produkce CO₂ na čase</i>	66
<i>Obr. 17: Stupeň biodegradace testovaných fólií</i>	67
<i>Obr. 18: Stupeň abiotické hydrolyzy pro testované vzorky</i>	68
<i>Obr. 19: DSC termografy pro fólii PLA podrobenou hydrolyze</i>	72
<i>Obr. 20: DSC termografy pro fólii PLA podrobenou biodegradaci</i>	72
<i>Obr. 21: DSC termografy pro fólii SVIT podrobenou hydrolyze</i>	74
<i>Obr. 22: DSC termografy pro fólii SVIT podrobenou biodegradaci</i>	74
<i>Obr. 23: FTIR spektrum pro fólii PLA během abiotické hydrolyzy</i>	75
<i>Obr. 24: FTIR spektrum pro fólii PLA před a po biodegradaci</i>	76
<i>Obr. 25: FTIR spektrum pro fólii SVIT během abiotické hydrolyzy</i>	76

Obr. 26: FTIR spektrum pro fólii SVIT před a po biodegradaci 77

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Základní charakteristika fólií série 1</i>	42
<i>Tab. 2: Základní charakteristika fólií série 2</i>	42
<i>Tab. 3: Charakteristika anaerobního mezofilního kalu a připraveného inokula</i>	53
<i>Tab. 4: Stupeň mineralizace testovaných vzorků dle produkce bioplynu (D_g), celkový rozklad dle produkce bioplynu a množství CO_2 rozpuštěného v kapalně fázi (D_T) a rozklad dle úbytku hmotnosti (Δm) v testu anaerobní mezofilní biodegradace</i>	56
<i>Tab. 5: Charakteristika anaerobního mezofilního kalu pro adaptaci na termofilní podmínky a připraveného termofilního inokula</i>	57
<i>Tab. 6: Stupeň mineralizace testovaných vzorků dle produkce bioplynu (D_g) a celkový rozklad dle produkce bioplynu a množství CO_2 rozpuštěného v kapalně fázi (D_T) testu anaerobní termofilní biodegradace pro vzorky série 1</i>	61
<i>Tab. 7: Stupeň mineralizace testovaných vzorků dle produkce bioplynu (D_g) a celkový rozklad dle produkce bioplynu a množství CO_2 rozpuštěného v kapalně fázi (D_T) testu anaerobní termofilní biodegradace pro vzorky série 2</i>	64
<i>Tab. 8: Stupeň biodegradace fólií v aerobním testu</i>	67
<i>Tab. 9: Teplota tání (T_m), teplota studené krystalizace (T_c) a krystalinita (X) pro fólii PLA</i>	71
<i>Tab. 10: Teplota tání (T_m), teplota studené krystalizace (T_c) a krystalinita (X) pro fólii SVIT</i>	73

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

¹ SHAH, A. A., F. HASAN, A. HAMEED a S. AHMED. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 2008, č. 26.

² MOHEE, R., G. D. UNMAR, A. MDHOO a P. KHADOO. Biodegradability of Biodegradable/Degradable Plastic Materials under Aerobic and Anerobic Conditions. *Waste Management*. 2008, č. 28.

³ GARTISER, S., M. WALLRABENSTEIN a G. STIENE. Assessment of Several Test Methods for the Determination of the Anaerobic Biodegradability of Polymers. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 1998, č. 6.

⁴ KRZAN, A., HEMJINDA, MIERTUS, A. CORTI a CHIellini. Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastics. *Polymer Degradation and Stability*. 2006, č. 91.

⁵ AMBROŽOVÁ, J. *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. ISBN 80-7080-534-X.

⁶ BASTIOLI, C. Handbook of Biodegradable Polymers [online]. Shawbury: Rapra Technology, 2005 [cit. 2014-07-16].

⁷ YAGI, H., F. NINOMIYA, M. FUNABASHI a M. KUNIOKA. Bioplastic Biodegradation Activity of Anaerobic Sludge Prepared by Preincubation at 55°C for New Niodegradation Test. *Polymer Degradation and Stability*. 2010, č. 95.

-
- ⁸ YAGI, H., F. NINOMIYA, M. FUNABASHI a M. KUNIOKA. Anaerobic Biodegradation Tests of Poly(lactic acid) under Mesophilic and Thermophilic Conditions Using a New Evaluation System for Methane Fermentation in Anaerobic Sludge. *International Journal Molecular Science*. 2009, č. 10.
- ⁹ KUPEC, Jan. Zpracování odpadních vod a čistírenských kalů. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, 2002, 123 s. ISBN 8073180588.
- ¹⁰ ŘEZNIČKOVÁ, I, HOFFMANN, J. a RŮŽIČKA, J. Technologická cvičení z ochrany prostředí. 1. vyd. Zlín: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta technologická ve Zlíně, 2000, 91 s. ISBN 8021417099
- ¹¹ DOHÁNYOS, M., ZÁBRANSKÁ, J. a JENÍČEK, P. *Anaerobní technologie v ochraně životního prostředí*. Praha: Kleinwächter, 1996. ISBN 80-85368-90-0.
- ¹² FRITSCHÉ, W. a HOFRIČTER. Aerobic Degradation by Microorganisms. *Biotechnology* [online]. 2008, č. 11 [cit. 2014-11-22]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527620951.ch6/summary>
- ¹³ SLEJŠKA, A. Testování biodegradability. In: *BIOM* [online]. 1997 [cit. 2014-11-22]. Dostupné z: http://stary.biom.cz/clen/as/biodegr_test.html
- ¹⁴ RŮŽIČKA, J. Mikrobiologie pro technologie životního prostředí. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické, Technologická fakulta ve Zlíně, 1999, 124 s. ISBN 8021413743
- ¹⁵ Polyesters. *The Essential Chemical Industry* [online]. 2013 [cit. 2015-03-07]. Dostupné z: <http://www.essentialchemicalindustry.org/polymers/polyesters.html>
- ¹⁶ CHEN, Y., TAN, L., CHEN, L., YANG., WANG, X. *Study on Biodegradace Aromatic-Aliphatic Copolyesters*. *Brazilian journal of chemical engineering* 25 (2008).

-
- ¹⁷ TOKIWA, Y., B. P. CALABIA, Ch. U. UGWU a S. AIBA. Biodegradability of Plastics. *Molecular Sciences*. 2009, č. 10.
- ¹⁸ ITÄVAARA, M., S. KARJOMAA a J. SELIN. Biodegradation of Polylactide in Aerobic and Anerobic Thermophilic Conditions. *Chemosphere*. 2002, č. 46.
- ¹⁹ SHAH, A. A., S. KATO a N. SHINTANI. Microbial Degradation of Aliphatic and Aliphatic-aromatic Co-polyesters. *Microbial Biotechnol.* 2014, č. 7.
- ²⁰ AURAS, R. 2010. *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications* [online]. [cit. 2015-05-08]. ISBN 9780470649848. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470649848>
- ²¹ MIKOVÁ, G. a I. CHODÁK. Vlastnosti a modifikácia poly(3-hydroxybutyrátu). *Chemické listy*. 2006, č. 100
- ²² ABOU-ZEID, D., R. MÜLLER a W. DECKWER. Degradation of Natural and Synthetic Polyesters under Anaerobic Conditions. *Journal of Biotechnology*. 2001, č. 86.
- ²³ HUBÁČKOVÁ, J.: Influence of Various Starch Types on PCL/starch Blends Anaerobic Biodegradation. *Polymer Testing*. 2013, č. 32.
- ²⁴ JARERAT, A., TOKIWA, Y. Degradation of Poly (tetramethylene succinate) by Thermophilic Actinomycetes. *Biotechnology letters*, 2001, č. 23.8: 647-651.
- ²⁵ TANSENGO, M. L.; TOKIWA, Y. Thermophilic Microbial Degradation of Polyethylene Succinate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997, č. 14.
- ²⁶ TEZUKA, Y., ISHII, N., KASUYA, K., MITOMO, H. Degradation of Poly(ethylene succinate) by Mesophilic Bacteria. *Polymer Degradation Stabilizate*. 2004, 84.
- ²⁷ WYPYCH, George. Handbook of Material Weathering. 3rd ed. Toronto: William Andrew Publishing, 2003, x, 742 s. ISBN 0-8155-1478-6

-
- ²⁸ PITTER P., CHUDOBA J.: Biodegradability of Organic Substances in the Aquatic Environment. CRC Press, Boca Raton 1990.
- ²⁹ HAKKARAINEM, M. Weight Losses and Molecular Weight Changes Correlated with the Evolution of Hydroxyacids in Simulated in vivo Degradation of Homo- and Copolymers of PLA and PGA. *Polymer Degradation and Stability*. 1996, č. 52.
- ³⁰ PIEMONTE, V. a F. GIRONI. Kinetics of Hydrolytic Degradation. *Polym Environ*. 2013, č. 21
- ³¹ MARTEN, E., R.J. MÜLLER a W.D. DECKWER. Studies on the Enzymatic Hydrolysis of Polyesters. II. Aliphatic-Aromatic Copolyesters. *Polymer Degradation and Stability*. 2005, č. 88.
- ³² HUSÁROVÁ, L., S. PEKAŘOVÁ, P. STLOUKAL a P. KUCHARZCYK a kolektiv. Identification of Important Abiotic and Biotic Factors in the Biodegradation of Poly(L-Lactic Acid). *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, č. 71.
- ³³ PRANAMUDA, H., TOKIWA, Y., H. TANAKA. Polylactide Degradation by an *Amycolatopsis* sp. *Appl. Environ. Microbiol*. 1997, č. 63.
- ³⁴ WILLIAMS, D. F. Enzymatic Hydrolysis of Polylactic Acid. *Eng. Med*. 1981, č. 10
- ³⁵ FUKUZAKI, H., YOSHIDA, M., ASANO, M., KUMAKURA, M. Synthesis of copoly(D,L-lactic acid) with relative low molecular weight and in vitro degradation. *European Polymeric Journal*. 1989.
- ³⁶ ANGELIDAKI, I. a W. SANDERS. Assessment of the Anerobic Biodegradability of Macropollutants. *Environmental Science and Biotechnology*. 2004, č. 3.
- ³⁷ KOLSTAD, Jeffrey J., et al. Assessment of Anaerobic Degradation of Ingeo™ Polylactides under Accelerated Landfill Conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 2012, 97.7: 1131-1141.

³⁸ REN, J. *Biodegradable Poly (Lactic Acid) Synthesis, Modification, Processing and Applications*. Beijing:Tsinghua University Press, 2011.

³⁹ Biodegradable plastics developments and Environmental impacts/prepared by Nolan-ITU Pty Ltd in Association with ExcelPlas Australia. [online]. Canberra, 2002 [cit. 2015-02-27]. Dostupné z: <http://www.europeanplasticfilms.eu/docs/AustralianReportonBiodegradablePlastics.pdf>

⁴⁰ JUN, CH. L. Reactive Blending of Biodegradable Polymers: PLA and Starch. *Journal of Polymers and the Environment*. 2000, č. 8.

⁴¹ MOURA, I., A. V. MACHADO, F. M. DUARTE a R. NOGUEIRA. Biodegradability Assessment of Aliphatic Polyesters-Based Blends Using Standard Methods. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010, č. 119.

⁴² THOMAS, Sabu; VISAKH, P.; MATHEW, Aji P. Advances in natural polymers. *Advanced Structured Materials*, 2013, 255-312.

⁴³ ARRIETA, M. P., J. LÓPEZ, E. RAYÓN a A. JIMÉNEZ. Disintegrability under Composting Conditions of Plasticized PLA-PHB blends. *Polymer Degradation and Stability*. 2014, č. 108.

⁴⁴ ARRIETA, M. P., J. LÓPEZ, A. HERNÁNDEZ a E. RAYÓN. Ternary PLA-PHB-Limonene Blends Intended for Biodegradable Food Packaging Applications. *European Polymer Journal*. 2014, č. 50.

⁴⁵ RENSTAD, R., S. KARLSSON, A. SANDREGEB a A.-Ch. ALBERTSSON. Influence of Processing Additives on the Degradation of Melt-Pressed Films of Poly(e-Caprolactone) and Poly(Lactic Acid). *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 1998, č. 6.

⁴⁶ STLOUKAL, P., A. KALEDOVÁ, H. MATTAUSCH a S. LASKE. The Influence of a Hydrolysis-Inhibiting Additive on the Degradation and Biodegradation of PLA and its Nanocomposites. *Polymer Testing*. 2015, č. 41.

⁴⁷ ČSN EN ISO 11734. *Jakost vod - Hodnocení úplné anaerobní biologické rozložitelnosti organických látek kalem z anaerobní stabilizace - Metoda stanovení produkce bioplynu*. Praha: Český normalizační institut, 1995.

⁴⁸ SEIDL, M. *Příprava polymerních směsí s konrolovanou dobou životnosti a testování jejich biorozložitelnosti*. Zlín, 2015. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.

⁴⁹ The Linde Group. *Plynová chromatografie..* [online]. [cit. 2015-03-09]. Dostupné z: http://www.lindegas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/PlynovaChromatogr_4_6_200979_15729.pdf

⁵⁰ The Linde Group. *Tepelně vodivostní detektor: Plynová chromatografie s HiQ® speciálními plyny*. [online]. [cit. 2015-03-09] Dostupné z: http://www.lindegas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/TVD_4_6_200979_15733.pdf

⁵¹ DŘÍMAL, P. a J. HOFFMAN. 2008. Automatizovaný systém kontinuálního sledování aerobního biologického rozkladu látek ve vodním i půdním prostředí. *Chemické listy* [online]. (102) [cit. 2015-05-08]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_02_139-147.pdf

⁵² Instruction Manual Total Organic Carbon Analyzer Model TOC – 5000 A

⁵³ FTIR / Fourier Transform Infra-Red Spectrophotometer. *LPD Lab Services* [online]. 2015 [cit. 2015-04-28]. Dostupné z: http://www.lpdlabservices.co.uk/analytical_techniques/chemical_analysis/ftir.php

⁵⁴ MICHNÁČOVÁ, Ž. *Biodegradace vybraných polyesterů a jejich směsí v anaerobním prostředí*. Zlín, 2008. Diplomová. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.

⁵⁵ CHU, C. C. Hydrolytic degradation of polyglycolic acid: Tensile strength and crystallinity study. *Journal of Applied Polymer Science*.1981, č. 26. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.1981.070260527/abstract;jsessionid=547F72536299F08CB8C7C930F1571C64.f04t02>

⁵⁶ PEGORETTI, A., PENATI A. Recycled poly(ethylene terephthalate) and its short glass fibres composites: effects of hygrothermal aging on the thermo-mechanical behaviour. *Polymer*.2004.č45. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386104009061>

⁵⁷ WANG, Ning; YU, Jiugao; MA, Xiaofei. Preparation and characterization of thermo-plastic starch/PLA blends by one-step reactive extrusion. *Polymer international*, 2007, 56.11: 1440-1447.