

# **Studium biodegradace aromatickoalifatického kopolyesteru v prostředí půdy**

Bc. Lenka Holišová

---

Diplomová práce  
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí  
akademický rok: 2009/2010

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka HOLIŠOVÁ**  
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Téma práce: **Studium biodegradace aromaticko-alifatického  
kopolyesteru v prostředí půdy**

Zásady pro vypracování:

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

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Odborné publikace v databázových zdrojích na internetu.**

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**15. února 2010**

Termín odevzdání diplomové práce:

**14. května 2010**

Ve Zlíně dne 15. února 2010

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



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

## **ABSTRAKT**

V diplomové práci byla sledována biodegradace alifatickoaromatického kopolyesteru v půdě. Byly použity různé zemědělské a lesní půdy. Vzorek byl v několika formách – prášek, povlak na perlitu, fólie 100 a 300  $\mu\text{m}$ . Biodegradace byla hodnocena metodou plynové chromatografie, měřením produkce vzniklého  $\text{CO}_2$ . Asi po 3 měsících byl pokus ukončen s výsledkem, že vzorek kopolyesteru biodegradaci nepodlehl.

Dále byl proveden pokus o izolaci mikroorganismů metodou zón. Experiment byl proveden se vzorky různých druhů půd, kompostu a kalu. Na základě vzniku světlejších zón na kultivačních miskách byla vyizolována kultura, která je schopná narušit polymer.

Klíčová slova: biodegradace, půda, kopolyester, Ecoflex, plynová chromatografie

## **ABSTRACT**

In this graduation thesis was monitored a biodegradation of aliphatic-aromatic copolyester in soil. Different kinds of agricultural and forest soil were used. The sample was in several forms – powder, coating on perlite, 100 and 300  $\mu\text{m}$  film. The biodegradation was evaluated by the method of gas chromatography, through measuring production of incurred  $\text{CO}_2$ . After approximately 3 months the test was terminated with a result that the sample of copolyester didn't come under biodegradation.

Further was executed a test of isolation of microorganisms by the zone method. The experiment was executed with samples of different kinds of soil, compost and mud. Based on the emergence of lighter zones on cultural bowls was isolated a culture capable of dislocating the polymer.

Keywords: biodegradation, soil, copolyester, Ecoflex, gas chromatography.

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. za odborné vedení, vlídný přístup, cenné připomínky a rady, bez kterých bych se neobešla při zpracovávání diplomové práce.

Dále děkuji Ing. Petru Stloukalovi za pomoc při přípravě pokusů. Ráda bych také poděkovala své rodině a Ing. Davidovi Holému za podporu a trpělivost.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>I LITERÁRNÍ REŠERŠE</b> .....	<b>9</b>
<b>1 PŮDA</b> .....	<b>10</b>
1.1    MIKROORGANISMY V PŮDĚ .....	10
<b>2 KOPOLYESTERY</b> .....	<b>11</b>
2.1    DEGRADACE ALIFATICKO-AROMATICKÉHO KOPOLYESTERU .....	11
2.2    ECOFLEX .....	12
2.2.1    Struktura .....	12
2.2.2    Vlastnosti .....	12
2.2.3    Zpracování .....	13
2.2.4    Aplikace .....	13
2.2.5    Míchání kopolyesteru se škrobem .....	14
2.3    POLYMLÉČNÁ KYSELINA (PLA) .....	14
2.3.1    Struktura .....	15
2.3.2    Vlastnosti .....	15
2.3.3    Zpracování .....	15
2.3.4    Aplikace .....	15
<b>3 BIODEGRADACE KOPOLYESTERU</b> .....	<b>17</b>
3.1    BIODEGRADACE .....	17
3.1.1    Stupně biodegradace .....	18
3.1.2    Neživá degradace .....	19
3.2    BIODEGRADACE KOPOLYESTERU V PŮDĚ .....	20
3.3    BIODEGRADACE KOPOLYESTERU V KOMPOSTU .....	21
3.4    EKOTOXICITA .....	21
3.5    ZEMĚDĚLSKÉ VYUŽITÍ KOPOLYESTERU .....	22
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>24</b>
<b>4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>25</b>
<b>5 ŽIVNÁ MÉDIA A ROZTOKY K JEJICH PŘÍPRAVĚ</b> .....	<b>26</b>
5.1    ROZTOKY .....	26
5.2    ŽIVNÁ MÉDIA .....	28
<b>6 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ</b> .....	<b>31</b>
<b>7 POUŽITÉ VZORKY</b> .....	<b>32</b>
7.1    VZORKY ECOFLEXU .....	32
7.1.1    Fólie 100 µm .....	32
7.1.2    Fólie 300 µm .....	32
7.1.3    Prášek .....	32
7.1.4    Povlak na perlitu .....	32

7.1.5	Roztok submikročásteč ecoflexu.....	32
7.2	VZORKY PŮD .....	33
7.2.1	Zemědělské půdy.....	33
7.2.2	Lesní půdy .....	34
<b>8</b>	<b>METODY A PRACOVNÍ POSTUPY .....</b>	<b>35</b>
8.1	STERILIZACE .....	35
8.2	VÝTŘEP VZORKU .....	35
8.3	STANOVENÍ SUŠINY PŮD .....	35
8.4	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR PŮD.....	35
8.5	pH PŮD .....	36
8.6	DESETINNÉ ŘEDĚNÍ.....	36
8.7	PŘÍPRAVA PERLITU .....	36
8.8	STANOVENÍ BIODEGRADABILITY VZORKU POMOCÍ SLEDOVÁNÍ PRODUKCE CO <sub>2</sub> .....	36
8.8.1	Analýza CO <sub>2</sub> a O <sub>2</sub> .....	41
8.8.2	Provzdušňování .....	42
8.9	IZOLACE MIKROORGANISMŮ ROZKLÁDAJÍCÍCH KOPOLYESTER METODOU ZÓN .....	42
8.9.1	Očkování živných půd.....	42
8.9.2	Přeočkování kultur.....	43
<b>III</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>44</b>
<b>9</b>	<b>BIODEGRADACE VZORKU V PROSTŘEDÍ PŮDY.....</b>	<b>45</b>
9.1	STRUKTURA MATERIÁLU.....	45
9.2	CHARAKTERISTIKA PŮDNÍCH VZORKŮ .....	46
9.2.1	Mikrobiologický rozbor půd.....	46
9.2.2	Sušina půd .....	47
9.2.3	pH půd .....	47
9.2.4	Obsah půdní organické hmoty .....	48
9.3	BIODEGRADACE SLEDOVANÁ POMOCÍ PRODUKCE CO <sub>2</sub> .....	48
9.4	MIKROSKOPIE DEGRADOVANÉHO VZORKU.....	55
<b>10</b>	<b>IZOLACE MIKROORGANISMŮ METODOU ZÓN .....</b>	<b>57</b>
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>65</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>68</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>69</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>70</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>71</b>

## ÚVOD

Lidé už od nepaměti potřebují ke svému životu stále dokonalejší materiály. Kámen byl nahrazen kovem a kov plastem. S rozvojem společnosti a zároveň vývojem materiálů se zvyšovaly lidské nároky na jejich vlastnosti. V přírodních materiálech není sloučeno takové množství různorodých vlastností jako v materiálech vyrobených člověkem.

Nerostné suroviny a přírodní materiály časem zoxidují a podlehnou degradaci. Proto se člověk snaží vytvořit ideální materiál, který by vyzrál nad přírodou. A vyvinul a stále zdokonaloval plast. V něm se snažil nahromadit veškeré požadované vlastnosti.

Stále se zvyšující životní úroveň vede k narůstající výrobě plastových materiálů. Člověku se podařilo zkombinovat tak dokonalé vlastnosti, že jsou plasty v přírodě prakticky nerozložitelné. Ze začátku to člověk považoval za výhru, ale postupem času s přibývajícím množstvím plastových odpadů zjistil, že to co se dříve jevílo výlučně jako pozitivum má i negativní stránky. V dnešní době je svět zaplaven plastovým odpadem. Skládky přetékají odpadem, který zde bude po staletí.

V současném hektickém světě se člověk dobrovolně obklopuje plastem ze všech stran. Takový plast se dá použít v každém průmyslovém odvětví. Co začalo u silonového vlákna v oděvním průmyslu, pokračovalo přes obalové materiály v potravinářství, výrobu hraček, automobilový průmysl až k výrobě stavebního materiálu.

Přese všechno se v dnešní době člověk bez plastů nedokáže obejít. Stále více využívá jejich vlastnosti jako je voděodolnost, pružnost, odolnost vůči oxidaci, pevnost, dlouhá životnost, izolační schopnost, tvárnost a mnoho dalších.

Člověk si stále více uvědomuje, že nemůže plasty jen vyrábět, ale musí je také odstraňovat. Nelze do nekonečna ukládat polymery na skládky ani je spalovat s ohledem na životní prostředí. V první fázi se přistoupilo k recyklaci, kterou se sice nevyřešila úplná likvidace, ale dosáhlo se opakovaného využití a tím vznikla snaha snížit výrobu. Ve druhé fázi se začaly vyvíjet polymery, které jsou po splnění své funkce biologicky rozložitelné. Tyto plasty jsou v dnešní době na trhu běžně dostupné, ale stále se zkoumá jejich biodegradabilita.

Na toto téma je zaměřena moje diplomová práce. Posoudit biodegradabilitu kopolyesteru v prostředí půdy za mírných podmínek.



## **I. LITERÁRNÍ REŠERŠE**

## 1 PŮDA

Půda je jedním z nejvýznamnějších přírodních zdrojů. Je to nejsvrchnější vrstva zemské kůry složená z minerálních částic, živých organismů, odumřelých zbytků, organických látek, vody a vzduchu. Půdní organismy jsou zatím značně nedocenenou složkou půdy, přitom velké množství vlastností půdy závisí právě na nich (úrodnost, schopnost zadržovat vodu atd.). Půda má také důležitou schopnost samoregulace, kterou jinak ovládají pouze živé organismy. Pokud je do půdy nějak zasaženo, sama se za čas vrátí do původního stavu, pokud se nepřekročí určité meze.

V současné době dochází ke značné degradaci půdy. Půda má menší obsah humusu, proto rychleji vysychá a neudrží vodu ani živiny. V takto zasažené půdě nemůžou vznikat nebo se rozvíjet půdní společenstva mikroorganismů. Při nedostatečné péči se půda může stát vyčerpatelným neobnovitelným zdrojem. Její obnovení by mohlo trvat až tisíce let. [1]

### 1.1 Mikroorganismy v půdě

Životaschopnost mikroorganismů závisí na vnějším prostředí. To mohou svou činností značně modifikovat. V čistých kulturách se v přírodě mikroorganismy nevyskytují, vytvářejí mikrobiální společenstva. Ty se podílejí na tvorbě humusu, ovlivňují vodní a vzdušné režimy v půdě. Půda obsahuje téměř všechny druhy bakterií, ty se živí látkami přítomnými v půdě. Většina vyskytujících se látek je mikrobiálně rozkládána, ale vyskytují se i chemicky syntetizované látky (chlorované uhlovodíky, polychlorované bifényly atd.), které mikroorganismy rozložit nedokáží. [2]

## 2 KOPOLYESTERY

Plasty se ukázaly jako materiál velmi odolný proti vlivům vnějšího prostředí jako je vlhkost nebo mikrobiální napadení. Toto se zvláště týká polymerů, které mají hlavní řetězec složený výhradně z atomů uhlíku. Polymery s heteroatomem v hlavním řetězci jsou potencionálně náchylnější k hydrolytickému rozštěpení (např. esterové nebo amidové vazby).

Problémy s rostoucím plastovým odpadem během posledního desetiletí, vedly k vývoji nových polymerů, které mohou podstoupit řízenou biologickou degradaci. Pro tyto plasty je možnou alternativou rozkladu kompostování. Primární biologické narušení polymeru je způsobeno enzymatickou katalytickou hydrolyzou esteru či amidu. Toto je povrchový proces eroze, který vede k vytvoření vodou rozpustných meziproductů, které mohou být asimilovány a metabolizovány buňkami.

Do skupiny polymerů schopných rozkladu patří např. polyhydroxybutyrát, což je přírodní alifatický polyester. Řada syntetických polyesterů se ukázala také jako schopná enzymatické hydrolyzy. Mezi nejčastěji používané aromatické polyestery patří poly(ethylen tereftalát) (PET) nebo poly(butylem tereftalát). Tyto se projevují vynikajícími materiálními vlastnostmi, proto jsou komerčně značně využívány. Dosud jsou však tyto polymery považovány za rezistentní vůči mikrobiálnímu útoku.

Kombinováním obou, schopnosti rozkladu a dobrých materiálových vlastností, vznikají kopolyestery schopné rozkladu obsahující alifatické i aromatické monomery. Kombinace kyseliny tereftalové, kyseliny adipové a 1,4-butandiolu (BTA-kopolyester) se ukázala jako nejvíce vhodná vzhledem k materiálním vlastnostem a ceně. [12]

### 2.1 Degradace alifaticko-aromatického kopolyesteru

Aromatické polyestery se ukázaly být odolné proti hydrolyze v mírných podmínkách. Aby se zvýšila jejich hydrolytická vnímavost, uvádějí se do aromatických řetězců alifatické součásti. Bylo dokázáno, že poměr biologické degradace je závislý na obsahu kyseliny tereftalové. Čím je množství kyseliny tereftalové větší, tím se schopnost biodegradace snižuje. Pokud její obsah přesáhne 60 mol%, stává se takovýto materiál neschopný biologického rozkladu. [12]

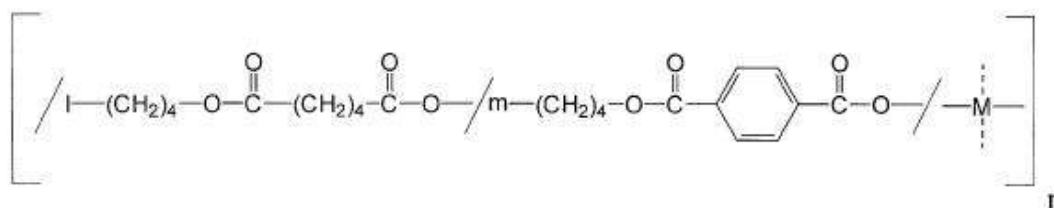
## 2.2 Ecoflex

V roce 1998 německá společnost BASF AG začala vyrábět BTA-kopolyester, který je nyní na trhu pod názvem Ecoflex. Je certifikovaný podle německého standardu DIN V 54900.

Plasty schopné rozkladu nejsou obecně více šetrné k životnímu prostředí, ale jsou nejlepším řešením pro jisté aplikace. Ecoflex se např. hodí pro kompostovatelné fólie v zemědělství. Ecoflex vyhovuje přísným Evropským normám pro rozkladu schopné plasty (EN 13432). Za vhodných podmínek prostředí degraduje již během několika týdnů bez jakýchkoli vznikajících zbytků. [7,8,9]

### 2.2.1 Struktura

Ecoflex je alifaticko-aromatický kopolyester složený z kyseliny tereftalové, kyseliny adipové, 1,4-butandiolu a modulární jednotek (Obrázek 1.). Vzniká transesterifikací poly(butyltereftalátu), kyseliny adipové a 1,4-butandiolu.



Obrázek 1.: Chemická struktura alifaticko-aromatického kopolyesteru Ecoflex [9]

Ecoflex má strukturu podobnou přirozeně se vyskytujícímu polymeru. Mikroorganismy proto zpracují Ecoflex jako molekuly vyskytující se v přírodě za vzniku oxidu uhličitého, vody, energie a biomasy. [8]

### 2.2.2 Vlastnosti

Mechanické vlastnosti ecoflexu jsou srovnatelné s těmi nízkohustotního poly(ethylen) (PE-LD) (Tabulka 1.). Filmy jsou odolné proti roztržení, jsou flexibilní, odolné proti vodě a kolísání vlhkosti. Filmy ecoflexu jsou dýchateľné, díky jejich mírné propustnosti vodní páry. [8]

Tabulka 1.: Vlastnosti Ecoflexu a PE-LD

Vlastnosti	Jednotka	Ecoflex	PE-LD
Hustota	$\text{g.cm}^{-3}$	1,25 – 1,27	0,922 – 0,925
Tok taveniny	$\text{ml. 10 min}^{-1}$	3 – 8	-
Teplota tání	$^{\circ}\text{C}$	110 – 115	111
Teplota skelného přechodu	$^{\circ}\text{C}$	- 30	-
Tvrdość (Shoreho metoda)	-	32	48
Průhlednost	%	82	89
Pevnost v tahu	$\text{N.mm}^{-2}$	32/36	26/20
Mez pevnosti	$\text{N.mm}^{-2}$	32/36	-
Mezní prodloužení	%	580/820	300/600
Propustnost kyslíku	$\text{cm}^3.\text{m}^{-2}.\text{d}^{-1}.\text{bar}^{-1}$	1600	2900
Propustnost vody	$\text{g. m}^{-2}.\text{d}^{-1}$	140	1,7

### 2.2.3 Zpracování

Ecoflex může být vyroben na konvenčních vyfukovacích linkách pro PE-LD. Výborné tažné vlastnosti Ecoflexu vedou k vytvoření velmi tenkých fólií (<20 $\mu\text{m}$ ). [8]

### 2.2.4 Aplikace

- a) Kompostové tašky pro organický odpad – organický odpad může být zakompostovaný společně s rozkladu schopnou taškou
- b) Kompostovací fólie – pokrytí záhonu fólií vede k dřívější sklizni, vyšším výnosům a lepší kvalitě úrody. Výhoda fólií z materiálů jako ecoflex je ta, že mohou být při žních zaorány do půdy, kde se zcela rozloží.

- c) Laminátové materiály – výhodné je použití pro obalové materiály jako obaly na nápoje, nádoby na zmrzlé potraviny atd. Nabízejí se bezproblémové likvidace kompostováním.
- d) Fólie pro balení potravin – přidáním zvláštních přísad a požitím foukaného filmového procesu mohou být získány filmy pro balení potravin [8]

### 2.2.5 Míchání kopolyesteru se škrobem

Škrob je levná surovina běžně k dostání. Škrobové materiály mají omezenou použitelnost kvůli jejich vysoké schopnosti absorbovat vodu. Tomuto se dá předejít, pokud škrob smícháme s polymerem odpuzujícím vodu. Pokud chceme vytvořit rozkladu schopný materiál, je potřeba použít rozložitelné polymery.

Míchání ecoflexu se škrobem vede k hydrofobnímu škrobu, který vykazuje vysokou odolnost vůči vodě. Filmy vyrobené z toho materiálu mají dobré mechanické vlastnosti: antistaticnost, propustnost kyslíku a vodní páry, tažnost. [7,8]

Ceny biologicky rozložitelných plastů jsou ve srovnání se spotřebními plasty (LDPE) značně vyšší. Výrobci se snaží zvýšit biodegradabilitu mísením se škrobem, což je levná a dostupná surovina, přesto jsou finální produkty drahé. Zavedením nových výrobních technologií by se cena dala snížit. [5]

## 2.3 Polymléčná kyselina (PLA)

PLA je připravována z kyseliny mléčné. Ta je jednou z nejjednodušších asymetrických molekul. Existují dva izomery, L- a D-mléčná kyselina. Může být vyráběna chemickou syntézou či kvašením uhlovodanu. Polymléčná kyselina se připravuje polykondenzací kyseliny mléčné.

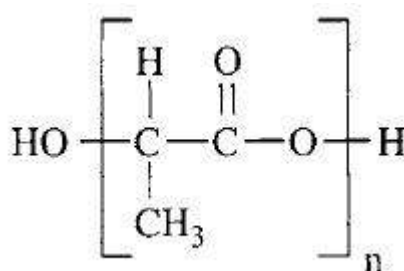
Mléčná kyselina používaná pro přípravu PLA je získávána z obnovitelných zdrojů. Např. z kukuřičného cukru kvůli jeho nízké ceně a dostupnosti, je možno využít také lokálních rostlinných zdrojů obsahujících škrob či cukr (cukrová řepa, pšenice). [4]

Kvůli zvyšujícím se cenám ropy, vzrůstajícím skleníkovým emisím a odpadovému hospodářství se zvyšuje poptávka po polymerech z obnovitelných zdrojů. Potenciál rozloži-

telných plastů závisí na vyvíjejících se cenách ropy, zpracovatelských postupech a legislativě. [5]

### 2.3.1 Struktura

Komerčně využívané PLA jsou dva typy: poly L-kyselina mléčná a poly D-kyselina mléčná (Obrázek 2.). [3]



Obrázek 2.: Chemická struktura polymléčné kyseliny [4]

### 2.3.2 Vlastnosti

Má vlastnosti srovnatelné s termoplasty. Poměr L- a D- ovlivňuje vlastnosti PLA, teplotu skelného přechodu, bod tání atd. Má dobré mechanické vlastnosti, tepelnou tvárnost, biokompatibilitu, je snadno vyrobitelný tudíž se stává vhodným materiálem pro komerční aplikace. Z hlediska fyzikálních vlastností lze srovnat s polystyrenem. [3]

### 2.3.3 Zpracování

PLA lze tvarovat prostřednictvím vstřikování do forem, tabulovým vytlačováním, vyfukováním, lisováním, válcováním a tvorbou vláken. Výběr způsobu zpracování závisí na stupni větvení, časové náročnosti a obsahu D-isomeru. [3]

### 2.3.4 Aplikace

Pro produkty nacházíme široké spektrum využití. Lze je použít jako obalový materiál, vlákna, fólie, papírové ochranné nátěry apod. Původní využití PLA tvořila především vlákna pro textil a balicí fólie. Textil vyrobený z PLA vyniká vyšší odolností proti vodě a UV záření, má sníženou hořlavost.

PLA nachází využití v potravinářství (balicí fólie, sáčky, štítky, obaly na potraviny a nápoje), automobilovém průmyslu (části interiérů automobilu), elektronice (CD, obaly na CD), zemědělství (umělá hnojiva, květináče), textilním průmyslu (koberce, tkaný i netkaný textil). [3]



### 3 BIODEGRADACE KOPOLYESTERU

Biodegradace je nevratný děj způsobený enzymatickou činností v živých organismech vedoucí k významné změně struktury materiálu způsobující ztrátu vlastností (integrita, molekulární váha, mechanická odolnost).

Během ranného rozvoje plastů byla degradace potlačovaným procesem, aby byla zaručena co největší životnost polymeru. V nedávné době se tento pohled na věc otočil a naopak je žádoucí degradace jistých plastových složek. Materiály by měly během svého působení plnit funkci a potom degradovat s bio-podpořenou mineralizací. To je základ všech biodegradačních testů, při kterých se sleduje množství  $\text{CO}_2$  ( $\text{CH}_4$  za anaerobních podmínek). Tvorba  $\text{CO}_2$  ukazuje, že materiál vstoupil do přirozeného koloběhu uhlíku.

Během biodegradace kopolyesteru dochází k uvolňování alifatických a aromatických oligomerů do prostředí, kde jsou hydrolyzovány na monomery. Pro rychlou hydrolyzu je důležitá přítomnost smíšené kultury. [10]

Polymery schopné rozkladu:

- Alifatický polyester a kopolyester (polybutylen jantaran -PBS)
- Aromatický kopolyester (polybutylen adipan tereftalát -PBAT)
- Polykaprolakton –PCL
- Polyvinylalkohol –PVA
- Polyester amid –PEA [4]

#### 3.1 Biodegradace

Vytvořené materiály musí být v průběhu jejich užívání odolné a po uplynutí jejich doby užívání musí být biologicky rozložitelné.

Biodegradace je definována jako rozklad substrátu prostřednictvím mikroorganismů, čímž dochází k regeneraci uhlíku, mineralizaci organických složek ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$  a soli) a tvorbě nové biomasy. Degradace je urychlena přidáním snadno rozložitelných částí, které obsahují hydrolytické skupiny (škrob, polyamidy). Dalšího urychlení lze docílit smísením s foto- nebo tepelně-citlivými přísadami. Ty na slunci vlivem světla a tepla podporují ad-

sorpci kyslíku, tvorbu oxidů a peroxidů vodíku, které uvolňují volné radikály napadající uhlíkové řetězce a vedou k tvorbě látek s nižší molekulovou hmotností.

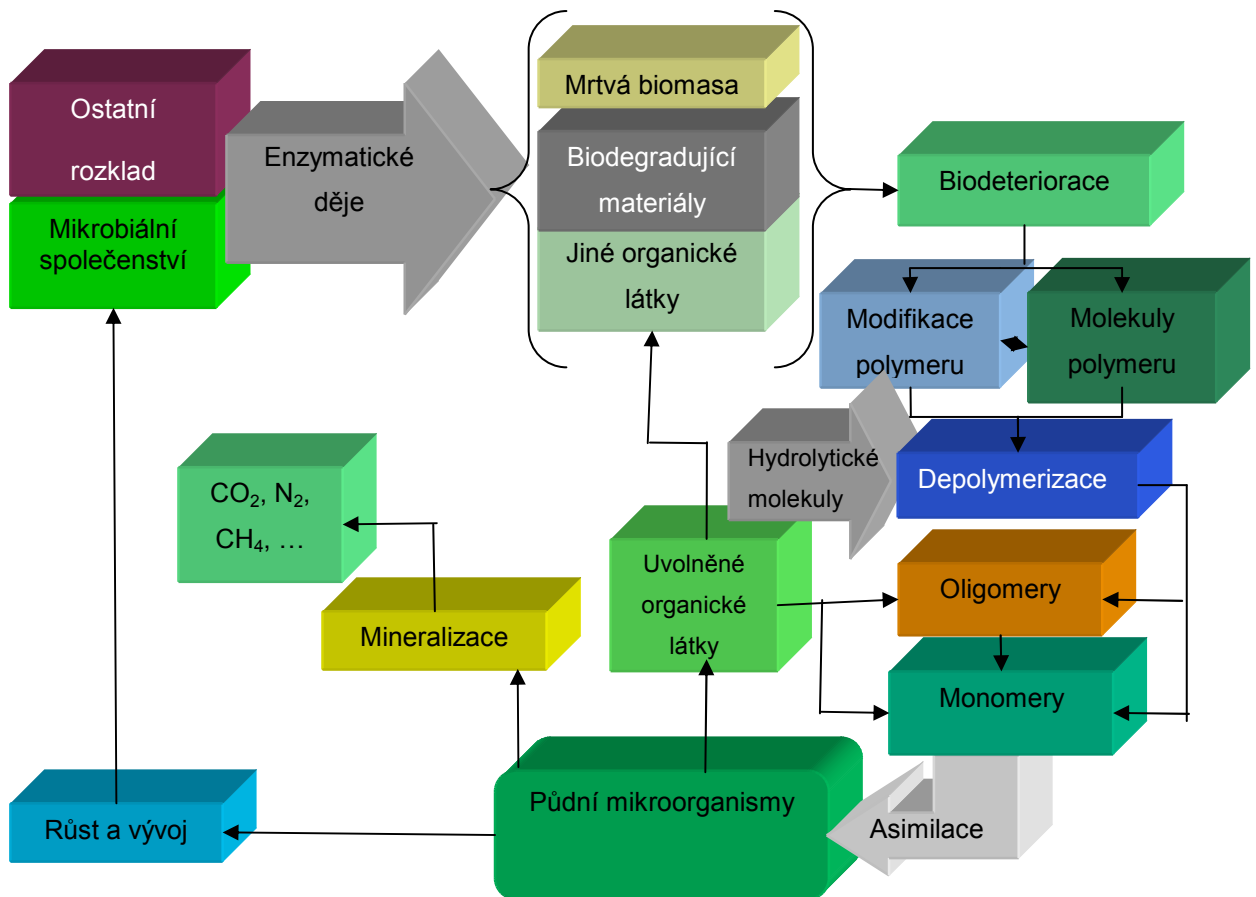
- Exo-biodegradace – proces probíhající vně buněk
- Endo-biodegradace – probíhající uvnitř buněk

Degradaci je možno hodnotit třemi parametry: oxidem uhličitým (vývoj CO<sub>2</sub>), chemickou a biochemickou spotřebou kyslíku (CHSK a BSK), snížením rozpuštěného organického uhlíku. Faktory, které mohou rozklad ovlivnit jsou koncentrace vzorku, velikost částic materiálu a pevnost.

### 3.1.1 Stupně biodegradace

- Biodeteriorace – rozštěpení materiálu na zlomkové části za působení mikrobiálních společenstev, jiných rozkládajících organismů a abiotických faktorů
- Depolymerizace – štěpení polymerní molekuly prostřednictvím mikroorganismů a jejich katalytických činitelů (enzymy a volné radikály) za vzniku oligomerů, dimerů a monomerů
- Molekuly rozpoznané receptory mikrobiálních buněk procházejí přes plazmatickou membránu, zatímco nerozpoznané zůstávají v extracelulárním okolí.
- Asimilace – v cytoplazmě, přepravované molekuly přimějí mikrobiální metabolismus k produkci energie, nové biomasy a k četným primárním a sekundárním metabolickým přeměnám.
- Mineralizace – do prostředí jsou uvolňovány jednoduché molekuly jako CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O a ostatní soli vnitrobuněčných metabolitů, které jsou plně oxidované (*Obrázek 3.*)

Na rozkladu organické hmoty v přírodě se podílejí biotičtí i abiotičtí činitelé. Každému biologickému rozkladu předchází neživá degradace. [10,11,14]



Obrázek 3.: Proces biodegradace polymeru

### 3.1.2 Neživá degradace

Polymerní materiály podléhají přeměnám (mechanické, světelné, tepelné, chemické) pokud jsou vystaveny venkovním vlivům.

- Mechanická degradace – příčinou může být vysoká komprese, napětí či stříh. Poškození zapříčiňují vzdušné a vodní turbulence, snížení tlaku atd. Mechanické procesy nejsou během biodegradace převládající, ale mohou proces aktivovat nebo urychlit.
- Světelná degradace – energie nesená fotony může vytvořit u některých molekul nestabilní stav. Tento jev je jeden z nejdůležitějších při abiotických degradacích.
- Tepelná degradace – jedná se o transformaci pevného materiálu na kapalný vlivem vyšší teploty. Při nízkých teplotách dochází k porušení řetězců a následné chemické a biologické degradaci.

- Chemická degradace – důležitou roli zde hrají atmosférické imise a agrochemikálie. Ty po reakci s polymerem mají za následek rozpad řetězců. Ze všech chemických prvků nejsilněji reaguje  $O_2$  a  $O_3$ . [11]

### 3.2 Biodegradace kopolyesteru v půdě

Alifaticko-aromatické kopolyestery byly vyvinuty jako možné alternativy tradičních plastů, ale jejich materiální vlastnosti vážně ovlivňují všestrannost využití těchto materiálů. Jedním z nápadů jak zmírnit znečištění způsobené plastovou produkcí je navrhovat nové polymery schopné rozkladu, ty jsou pak vhodné jako obalový materiál nebo výrobky pro jednorázové použití. Jako velmi slibný se ukázal alifaticko-aromatický kopolyester složený z 1,4-butandiolu, kyseliny adipové a kyseliny tereftalové pod obchodním názvem Ecoflex.

Je důležité zkoumat rozklad kopolyesteru v mírnějších podmínkách a s mikroorganismy jinými než teplomilnými, protože je pravděpodobné, že většina kopolyesterů bude vystavena degradaci při mezofilních podmínkách spíše než v kompostu při zvýšených teplotách. Pro biodegradaci lze použít široké spektrum mezofilních mikroorganismů zahrnující bakterie, houby a kvasinky.

Studie se zabývala biodegradací Ecoflexu v mírných podmínkách za použití 29 druhů mezofilních bakterií, hub a kvasinek. Inkubace probíhala v  $30^\circ\text{C}$  po dobu 21 dnů. Všechny experimenty obsahovaly sterilní média a filmy polymeru. Pokusy byly prováděny proto, aby ohodnotily schopnost aerobní biodegradace kopolyesteru čistými kulturami mikroorganismů. Úroveň biodegradace byla posuzována podle úbytku hmotnosti filmů polymeru. Důležitým ukazatelem byl i vizuální důkaz o degradaci, film byl mechanicky narušen, snadno se trhal, byl tenčí než před nasazením. Filmy mohou být tenčí také díky organickému růstu na povrchu.

Výsledky ukázaly, že většina testovaných mezofilních mikrobů byla schopna způsobit alespoň nějakou degradaci filmů polyesteru. Pouze dva bakteriové druhy *Bacillus subtilis* však způsobily viditelné narušení filmů. Některé druhy během inkubace vytvářely postupným růstem biovrstvu na povrchu filmu. Z těchto, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces lilacinus*, *Phanerochaete chrysosporium* a *Penicillium pinophilum*, které tvořily silnou vrstvu biomasy. Tito také způsobovali viditelnou degradaci. Důležité je však zjištění, že

viditelná degradace nebyla nezbytně nejdůležitější důkaz, některé mikroorganismy způsobily výraznou ztrátu na hmotnosti bez viditelných účinků.

Shrnutí je tedy takové, že většina z testovaných 29 mikroorganismů byla schopna způsobit nějakou degradaci polymeru, ale žádný z nich nedokázal během 21 denního experimentu způsobit úplnou biodegradaci. Ecoflex by tedy mohl být schopný rozkladu v mírných podmínkách, ale proces je pomalejší než za použití vyšších teplot.

Vznikajícími produkty byly dvojsytná kyselina adipová a kyselina tereftalová, které odpovídají enzymatické hydrolýze esterových vazeb. Očekávaný byl také butandiol, ale ten nebyl pozorován. Je to sloučenina snadno rozložitelná, takže nejspíš došlo k její degradaci.

Další studie hodnotí degradaci Ecoflexu houbou v mírných podmínkách. Jednalo se o druh příbuzný *Isaria fumosorosea* (kmen Ascomycota). V půdě, která obsahovala tuto houbu probíhala degradace při 30°C značně rychleji, než v půdě, kde se tato houba nevyskytovala. Po 30ti dnech byla ztráta z hmotnosti filmů asi 40%. V půdě neobsahující tento druh probíhala degradace asi o polovinu pomaleji. Druh *Isaria fumosorosea* může sám mineralizovat Ecoflex na CO<sub>2</sub> v mezofilním prostředí, proto má velký význam pro biodegradaci Ecoflexu v přírodních půdních podmínkách. [6,9]

### 3.3 Biodegradace kopolyesteru v kompostu

Schopnost biodegradace Ecoflexu byla zkoumána také při teplotě 55°C s aktinomycetou *Thermomonospora fusca* vyizolovanou z kompostu. Kopolyester byl ve formě prášku. Po 22 dnech již došlo k depolymeraci více než 99,9% polymeru. Z experimentu je zřejmé, že se během biodegradace uvolňovaly alifatické a aromatické oligomery, které podléhaly rychlé hydrolýze na monomery. Aby mohla probíhat pohotová hydrolýza je nutná přítomnost smíšené kultury mikroorganismů. [9]

### 3.4 Ekotoxicita

Stanovení ekotoxicity Ecoflexu se zabývá především osudem aromatických sekvencí během biodegradace. Jako živé organismy byly v experimentu použity *daphnia* a *Photobacterium phosphoreum*. Testy byly vykonány podle DIN 38412 část 30 a 34. U *Daphnia* se poškození testovanými látkami hodnotilo podle schopnosti plout po vodě, zatímco u

*Photobacterium phosphoreum*, luminiscenční bakterie, se sledoval pokles fotoluminiscence. Ani u jednoho experimentu nebyl pozorovaný žádný významný toxikologický účinek (monomerní ani oligomerní), tudíž nehrozí žádné environmentální riziko a proto je Ecoflex doporučený pro kompostovací procesy. [9]

### 3.5 Zemědělské využití kopolyesteru

Pro zemědělce na celém světě se stalo běžné, že pokládají tenkou vrstvu plastické hmoty přímo na obdělávanou půdu. Odhad světové aplikace kompostovacích fólií je 700 000 tun ročně.

Výhody kompostovacích fólií:

- Úprava teploty půdy
- Udržování vlhkosti
- Kyprost půdy
- Urychlení klíčení
- Dřívější sklizeň
- Redukce plevelu a chorob
- Efektivní využití závlahy a hnojení
- Zvýšení produkce a výnosů

Navzdory těmto výhodám, používání polymerů v zemědělství má i své stinné stránky. Filmy, které se většinou používají, nejsou typicky recyklovatelné, neboť jsou převážně mokré a špinavé, a většinou končí na skládkách. Používání rozkladu schopných kompostovacích fólií může tyto problémy vyřešit, navíc k rozkladu může docházet rovnou na poli, takže odpadají náklady spojené s odvozem na skládku a navíc ušetříme místo na skládkách odpadu.

Dva hlavní aspekty rozpadu kompostovacího filmu jsou fotodegradace a biodegradace. Fotodegradace je způsobena slunečním zářením, filmy se stávají křehčí, s trhlinami, dírami, loupou se a nakonec se rozpadají. Biodegradace závisí na přirozeně se vyskytujících mikroorganismech jako jsou bakterie, houby a řasy.

Po žních na podzim máme tři možnosti jak naložit s kompostovatelnými filmy:

1. odstranit je a uložit na skládku odpadů
2. odstranit a uložit na hromadě kompostu
3. zaorat zbytky rostlin spolu s kompostovatelnou fólií do pole

Aby byla třetí možnost použitelná, musí být fólie rozloženy před dalším obdobím zasetí.

Japonští vědci provedli dvouletou studii kompostovatelné fólie z Ecoflexu smíchané se škrobem. Experiment prováděli v mandarinkovém háji, mechanické vlastnosti kompostovatelného archu se časem snižovaly, zatímco kvalita mandarinek rostla. Nejdříve nastala biodegradace rozložitelného škrobu, čímž se zvýšila propustnost vody a to mělo dobrý vliv na růst mandarinek, degradace Ecoflexu byla natolik pomalá, že vydržela krýt povrch půdy 5 měsíců. Nakonec byl materiál plně schopný rozkladu a degradoval na  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (Obrázek 4.). [13,16,17]



Obrázek 4.: Mechanismus odrazu slunečního světla za použití kompostovací fólie [17]

Světová poptávka po kompostovatelných polymerech se dynamicky vyvíjí. V posledních deseti letech se snížil cenový rozdíl mezi rozkladu schopnými a syntetickými plasty a to zvláště u polymerů založených na obnovitelných zdrojích (PLA). [5]

## II. PRAKTICKÁ ČÁST



## 4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této práce bylo určit rychlost biodegradace v půdním prostředí a postihnout rozdíly mezi různými půdami. Dále se pozornost věnovala vlivu morfologie vzorku. Byl proveden pokus o izolaci mikroorganismů metodou zón.

Bude sledována biodegradace různých forem vzorku v odlišných typech půd z oblasti České republiky. Vzorky budou umístěny v bioreaktorech při stálé teplotě ve tmě. Plynovou chromatografií bude měřen obsah vyprodukovaného CO<sub>2</sub>, který udává míru biodegradace.

Zároveň bude proveden pokus o izolaci mikroorganismů metodou zón. Metoda bude prováděna na kultivačních miskách. Pokusu budou podrobeny všechny použité druhy půd.

## 5 ŽIVNÁ MÉDIA A ROZTOKY K JEJICH PŘÍPRAVĚ

### 5.1 Roztoky

#### Fyziologický roztok

Bylo naváženo 8,5 g NaCl a rozpuštěno v 1 l destilované vody. Po promíchání byl roztok sterilizován v autoklávu při 125°C 30 minut.

#### Suspendační médium

Na přípravu 50 ml média:

Fyziologický roztok .....	25 ml
Tween 80 .....	0,05 ml
Difosforečnan sodný .....	0,2 g
Destilovaná voda .....	25 ml

Všechny látky byly smíchány a podrobeny sterilizaci při 125°C 30 minut. Suspendační médium slouží k převedení bakterií obsažených v půdě do roztoku.

#### Roztok A

9 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (dihydrogenfosforečnan draselný) bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody.

#### Roztok B

24 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát) bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody.

**Roztok stopových prvků**

MnSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O (čistý) .....	0,043 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (p.a.) .....	0,057 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O (p.a.) .....	0,043 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O (p.a.) .....	0,037 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O (p.a.) .....	0,025 g
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O (čistý) .....	0,040 g

Všechny látky byly rozpuštěny v 1 l destilované vody a důkladně promíchány.

**Roztoky solí**

MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	10 g
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O .....	3 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O .....	1 g
NaCl .....	50 g
NH <sub>4</sub> Cl .....	30 g

Byla navážena množství látek a rozpuštěna v 1 l destilované vody.

**Roztok actidione**

Byl připraven roztok o koncentraci 16 g/l. 50 µl tohoto roztoku bylo dávkováno na misku s agarem. Po zaschnutí byl proveden křížový roztěr. Actidione se používá pro eliminaci plísní.

**Chloroformový roztok Ecoflexu c=0,050 mg/l**

2,5 g Ecoflexu bylo naváženo a rozpuštěno v 50 ml chloroformu.

## 5.2 Živná média

### Minerální médium (MM)

Na přípravu 100 ml média:

Roztok A .....	2 ml
Roztok B .....	8 ml
Destilovaná voda .....	85 ml
Roztok stopových prvků .....	0,2 ml
Kvasničný autolysát .....	4 mg
Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	1 ml
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ .....	1 ml
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ .....	1 ml
Roztok NaCl .....	1 ml
Roztok $\text{NH}_4\text{Cl}$ .....	1 ml

### Minerální médium (MM2)

Na přípravu 100 ml média:

Roztok A .....	4 ml
Roztok B .....	16 ml
Roztok stopových prvků .....	0,1 ml
Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,2 ml
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ .....	1 ml
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ .....	1 ml
Roztok NaCl .....	1 ml
Roztok $\text{NH}_4\text{Cl}$ .....	1 ml

Všechny látky byly smíchány a doplněny destilovanou vodou na objem 100 ml. \Poté byly sterilizovány v autoklávu 30 minut při teplotě 125°C.

**Glycerol-dusičnanový agar**

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

Agar .....	2,45 g
Glycerol .....	2 g
Destilovaná voda .....	100 ml

Agar byl rozpuštěn v destilované vodě a poté byl přidán glycerol. Po řádném promíchání byl dán sterilizovat do autoklávu při 125 °C na 30 minut. Po zchladnutí byl v aseptickém boxu rozlit do Petriho misek a nechán ztuhnout.

**Kasein-sojový agar**

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

Agar .....	1,5 g
Destilovaná voda .....	100 ml
Hydrolyzát kaseinu .....	1,5 g
Sojový pepton .....	0,5 g
NaCl .....	0,5 g

Všechny složky byly naváženy a rozpuštěny v destilované vodě. Roztok byl podroben sterilizaci v autoklávu 30 minut při 125°C. Po zchladnutí byl agar rozlit v boxu do Petriho misek a nechán ztuhnout.

**Půdní agar s bengálskou červení s chloramfenikolem**

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

Trypton .....	0,1 g
Agar .....	3 g
Destilovaná voda .....	100 ml
Roztok bengálské červeně .....	0,7 ml

Agar byl rozpuštěn v destilované vodě a poté přidán roztok bengálské červeně. Po řádném promíchání a sterilizaci v autoklávu na 30 minut při 125°C byl ponechán agar zchladnout a poté byl rozlit do Petriho misek v antiseptickém boxu.

### **Agar s ecoflexem**

Na přípravu 100 ml agaru bylo použito:

MM .....	100 ml
Čistý agar .....	2,2 g
Roztok submikročásteček ecoflexu .....	10 ml

Místo 85 ml destilované vody bylo použito jen 75 ml a přidáno 10 ml roztoku submikročásteček ecoflexu. Po smíchání s čistým agarem proběhla sterilizace při 121°C 25 minut. Po částečném ochlazení byl agar v aseptickém boxu rozlit do sterilních Petriho misek a byl nechán ztuhnout.

## 6 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

- Plynový chromatogram Agilent 7890 (USA)
- Chladnička (Ardo, ČR)
- Předvážky KERN EW (Německo)
- Předvážky KERN 440-47 (Německo)
- Analytické váhy KERN 770 (Německo)
- Laboratorní autokláv Lam-3-20-MCS-J (Sanoclay, Německo)
- Mikroskop CX 41 (Olympus, Japonsko)
- Aseptický laminární box Bio II A (Telstar, Španělsko)
- Mikrodávkovače (2-20  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l, 1-5 ml) (Biohit, Finsko)
- Elektrická sušárna (Memmert, Německo)
- Elektrická sušárna (Mora, ČR)
- Plynotěsná injekční stříkačka 100  $\mu$ l (Hamilton, USA)

## 7 POUŽITÉ VZORKY

### 7.1 Vzorky ecoflexu

Vzorky Ecoflexu byly vyrobeny v 5ti různých formách, u kterých byla sledována biodegradace v závislosti na morfologii vzorku.

#### 7.1.1 Fólie 100 $\mu\text{m}$

Fólie byla připravena na ručním etážovém lisu. Bylo vypočítáno množství vzorku z plochy lisovacích desek, hustoty vzorku Ecoflex a tloušťky fólie. Navážka byla ve formě granulí a lisování probíhalo za teploty 140°C. Fólie byly před použitím nastříhány na kousky o velikosti 3 x 7 mm.

#### 7.1.2 Fólie 300 $\mu\text{m}$

Vyráběla se stejně jako fólie 100  $\mu\text{m}$ , ale byla nastavena jiná tloušťka fólie.

#### 7.1.3 Prášek

Přikapáváním etanolu do roztoku Ecoflexu v chloroformu ( $c=0,050$  mg/l) docházelo k vysrážení sraženiny, která byla přefiltrována přes fritu a 24 hodin ponechána v digestoři za účelem vytěkání rozpouštědla.

#### 7.1.4 Povlak na perlitu

10 ml roztoku ecoflexu o koncentraci 100 mg/l bylo dávkováno do lahví s obsahem 6,67 g perlitu. Lahve byly poté umístěny do digestoře, kde bylo pomocí vzduchových čerpadel po dobu 24 hodin vyfukování odstraněno všechno rozpouštědlo.

#### 7.1.5 Roztok submikročástic ecoflexu

Do válce byly v poměru 1:4 nadávkovány roztoky ecoflexu v chloroformu (100 mg/l) a 0,5% PVA. Za současného chlazení ledem byly roztoky 5 minut míchány homogenizátorem. Poté byl roztok přelit do odsávací baňky, ta byla uzavřena. Při současném míchání míchadlem docházelo k odtahu rozpouštědla čerpadlem. Po odstranění veškerého rozpouštědla byl roztok podroben centrifugaci. Po odstředění byl roztok přelit do válce, promíchán



homogenizátorem a opětovně centrifugován. Takto vyrobený konečný roztok submikročásteček Ecoflexu byl používán na přípravu živných médií pro izolaci mikroorganismů rozkládajících kopolyester metodou zón.

## 7.2 Vzorky půd

Ze sedmi získaných vzorků zemědělských půd z různých lokalit v České republice, bylo vybráno pět nejvíce mikrobiálně aktivních. Použity byly také dvě lesní půdy, u kterých byla předpokládána větší mikrobiální aktivita. Informace o půdním druhu byly získány od Ing. Jiřího Jandáka, MZLU Brno (*Tabulka 2. a 3.*).

Vzorky byly nejdříve prosyty sítím o velikosti ok 2 mm. Byla stanovena jejich sušina a mikrobiální rozbor. Potupy uvedeny v kapitolách 8.3 a 8.4.

### 7.2.1 Zemědělské půdy

Tabulka 2.: Stanovení půdního druhu zemědělských půd

Lokalita	Půdní druh
Ivaň	Fluvizem modální na nevápnitých aluviálních sedimentech
Popice	Černozem modální na polygenetické hlíně
Bratčice	Černozem modální na spraši
Nové Město na Moravě	Kambizem modální na syenitu
Veverské Knínice	Hnědozem modální na spraši
Vatín	Kambizem modální na ortorule
Hodonín	Regozem arenická na navátém písku

### 7.2.2 Lesní půdy

Tabulka 3.: Stanovení půdního druhu lesních půd

<b>Lokalita</b>	<b>Půdní druh</b>
<b>Lukoveček</b>	Informace o půdním druhu zatím nejsou k dispozici
<b>Vidče</b>	

## 8 METODY A PRACOVNÍ POSTUPY

### 8.1 Sterilizace

V průběhu práce bylo potřeba dodržovat zásady aseptické práce. Aby nedošlo ke kontaminaci mikroorganismy, bylo potřeba udržovat pomůcky i roztoky sterilní. Sterilizace roztoků a minerálních médií byla prováděna v autoklávu po dobu 25 minut při 121°C. Hokeyky a kličky byly sterilizovány v plameni.

### 8.2 Výtřep vzorku

Do 45 ml sterilního suspenzačního média bylo naváženo 5 g půdy a 15 minut třepáno v ruce.

### 8.3 Stanovení sušiny půd

Na předem zvážené Petriho misky bylo naváženo na analytických váhách 2 g půdy s přesností  $\pm 0,0001$  g. Sušení probíhalo v elektrické sušárně při 105°C do konstantní hmotnosti. Po ochlazení v exsikátoru na laboratorní teplotu byly misky zváženy. Stanovení se provádí 3x vedle sebe. Od konstantní hmotnosti byla odečtena hmotnost prázdné misky a poté se z původní a konečné hmotnosti půdy vyjádří sušina v procentech.

### 8.4 Mikrobiologický rozbor půd

Byl proveden mikrobiologický rozbor základních druhů mikroorganismů. Kultivační metodou byly stanoveny počty chemoorganotrofních bakterií, aktinomycet a vláknitých plísní. Kultury byly inkubovány 7 dnů při laboratorní teplotě.

**Glycerol-dusičnanový agar** – pro stanovení aktinomycet

Použité ředění:  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$

**Kasein-sojový agar** – pro stanovení chemoorganotrofních aerobních bakterií

Použité ředění:  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$

**Půdní agar s bengálskou červení s chloramfenikolem** – pro stanovení vláknitých plísní

Použité ředění:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$

## 8.5 pH půd

Bylo stanoveno pH použitých půd dvěma způsoby. Aktivní půdní reakce (pH<sub>H<sub>2</sub>O</sub>) a výměnná půdní reakce (pH<sub>KCl</sub>). Byla vytvořena suspenze roztoku (H<sub>2</sub>O a KCl) a půdy v poměru 5:2. Pro stanovení výměnné půdní reakce byl použit roztok KCl o koncentraci 0,1 M. Ve vzniklých suspenzích bylo změřeno pH.

## 8.6 Desetinné ředění

Do sterilní zkumavky bylo mikrodávkovačem nadávkováno 900 µl sterilního fyziologického roztoku. K tomu bylo přidáno 100 µl vzorku z výtřepu v suspenzačním médiu. Tím vznikne ve zkumavce ředění 10<sup>-2</sup>. Do druhé sterilní zkumavky se nadávkuje opět 900 µl sterilního fyziologického roztoku a přidá se 100 µl suspenze z první zkumavky. Vznikne ředění 10<sup>-3</sup>. Takto se pokračuje až je dosaženo požadovaného ředění.

## 8.7 Příprava perlitu

Perlit sloužil v pokusu pouze ke zlepšení provzdušňování půd a ke zvýšení pórovitosti. Před použitím byl 3x promyt destilovanou vodou a vysušen v sušárně při 105°C.

## 8.8 Stanovení biodegradability vzorku pomocí sledování produkce CO<sub>2</sub>

Smícháním půdy s perlitem, vzorkem Ecoflexu a minerálním médiem (MM2) vznikl bioreaktor (*Obrázek 5.*). Byla to láhev o objemu 500 ml s uzávěrem se septem.

### Obsah bioreaktoru

- Půda (3,34 g sušiny půdy)
- Perlit (6,67 g)
- Minerální médium (MM2 - 6,67 ml)
- Vzorek Ecoflexu (fólie 100 – 300 µm, prášek, povlak na perlitu)

3,34 g sušiny půdy byla v láhvi smíchána se 6,67 g perlitu a 0,5 g vzorku Ecoflexu a vše bylo zalito 6,67 ml minerálního média. Láhve byly dokonale promíchány. Pracovalo se asepticky (v aseptickém boxu se sterilními pomůckami). Vzorky Ecoflexu byly navažovány

na analytických vahách s přesností  $\pm 0,0001$  g. Vyrobené bioreaktory byly uloženy do 25°C do tmy.

Biodegradace byla prováděna ve 3 etapách. Nejprve byly nasazeny vzorky zemědělských půd z lokalit Ivaň, Popice a Bratčice. Jako vzorky byly v tomto pokusu použity fólie 100 a 300  $\mu\text{m}$  a prášek. Ve druhém pokusu byly založeny lahve s lesními půdami, kdy byl ke vzorkům navíc přidán povlak na perlitu. Nakonec byly založeny bioreaktory se zemědělskými půdami z lokalit Nové Město na Moravě a Veverské Knínice. Zde byly použity jen fólie 100  $\mu\text{m}$  a prášek.

Stejně byly připraveny i slepé pokusy, do kterých nebyl přidán vzorek Ecoflexu. Pro ověření reakce byly použity bioreaktory s referenční látkou, mikrokrystalická celulóza. Všechny vzorky ve všech etapách pokusu byly nasazeny vždy 3x vedle sebe.

Pro dokonalejší vzduchotěsnost byly uzávěry utěsněny silikonovým tmelem. Toto se týkalo spoju mezi uzávěrem a septem a uzávěrem a těsněním.



Obrázek 5.: Bioreaktor

Tabulka 4.: Charakteristika vzorků při lahvovém pokusu

Označení lahvi	látka	navážka [g]	navážka půdy [g]	TC [%]	Sušina půdy [%]
1MIC	Celuloza	0,20166	3,92	42,39	85,19
1SL1	slepý pokus	-	3,92	-	85,19
1SL2		-			
1SL3		-			
1P1	prášek Ecoflex	0,49426	3,92	62,54	85,19
1P2		0,49895			
1P3		0,49627			
1TEF1	fólie Ecoflex 100 $\mu$ m	0,50290	3,92	62,54	85,19
1TEF2		0,50230			
1TEF3		0,50151			
1TLF1	fólie Ecoflex 300 $\mu$ m	0,50293	3,92	62,54	85,19
1TLF2		0,49961			
1TLF3		0,49976			
2MIC	Celuloza	0,20055	3,68	42,39	90,77
2SL1	slepý pokus	-	3,68	-	90,77
2SL2		-			
2SL3		-			
2P1	prášek Ecoflex	0,50398	3,68	62,54	90,77
2P2		0,50012			
2P3		0,50019			
2TEF1	fólie Ecoflex 100 $\mu$ m	0,50021	3,68	62,54	90,77
2TEF2		0,49926			
2TEF3		0,49988			
2TLF1	fólie Ecoflex 300 $\mu$ m	0,50178	3,68	62,54	90,77
2TLF2		0,49976			
2TLF3		0,50222			
3MIC	Celuloza	0,18554	3,77	42,39	88,19
3SL1	slepý pokus	-	3,77	-	88,19
3SL2		-			
3SL3		-			
3P1	prášek Ecoflex	0,49661	3,77	62,54	88,19
3P2		0,49667			
3P3		0,49110			
3TEF1	fólie Ecoflex 100 $\mu$ m	0,49514	3,77	62,54	88,19
3TEF2		0,49650			
3TEF3		0,49970			
3TLF1	fólie Ecoflex 300 $\mu$ m	0,49971	3,77	62,54	88,19
3TLF2		0,50092			
3TLF3		0,50194			

V tabulkách 4. a 5. jsou zaznamenány pozice vzorků v degračních lahvích. První číslo značí použitou půdu, zkratka písmen o jaký vzorek se jedná a poslední číslo označuje číslo pokusu.

Legenda pro tabulku 4.:

1 – Ivaň

2 - Popice

3 - Bratčice

MIC – mikrokrystalická celuloza

SL – slepý pokus

P – prášek

TEF – fólie 100  $\mu\text{m}$

TLF – fólie 300  $\mu\text{m}$

Tabulka 5.: Charakteristika vzorků při 2. a 3. lahvovém pokusu

Označení lahví	látko	navážka [g]	navážka půdy [g]	TC [%]	Sušina půdy [%]
1MIC	Celuloza	0,19939	4,29	42,39	77,81
1SL1	slepý pokus	-	4,29	-	77,81
1SL2		-			
1SL3		-			
1PV1	povlak Ecoflex	-	4,29	62,54	77,81
1PV2		-			
1PV3		-			
1P1	prášek Ecoflex	0,50032	4,29	62,54	77,81
1P2		0,49965			
1P3		0,49561			
1TEF1	fólie Ecoflex 100 $\mu\text{m}$	0,50063	4,29	62,54	77,81
1TEF2		0,50042			
1TEF3		0,50102			
1TLF1	fólie Ecoflex 300 $\mu\text{m}$	0,50280	4,29	62,54	77,81
1TLF2		0,50176			
1TLF3		0,50064			
2MIC	Celuloza	0,19701	4,24	42,39	78,73
2SL1	slepý pokus	-	4,24	-	78,73
2SL2		-			
2SL3		-			
2PV1	povlak Ecoflex	-	4,24	62,54	78,73
2PV2		-			
2PV3		-			
2P1	prášek Ecoflex	0,49944	4,24	62,54	78,73
2P2		0,49958			

<b>2P3</b>		0,49864			
<b>2TEF1</b>	fólie Ecoflex 100 $\mu$ m	0,50098	4,24	62,54	78,73
<b>2TEF2</b>		0,50089			
<b>2TEF3</b>		0,50022			
<b>2TLF1</b>	fólie Ecoflex 300 $\mu$ m	0,50219	4,24	62,54	78,73
<b>2TLF2</b>		0,50050			
<b>2TLF3</b>		0,50100			
<b>3MIC</b>	Celuloza	0,19007	4,28	42,39	77,95
<b>3SL1</b>	slepý pokus	-	4,28	-	77,95
<b>3SL2</b>		-			
<b>3SL3</b>		-			
<b>3P1</b>	prášek Ecoflex	0,50011	4,28	62,54	77,95
<b>3P2</b>		0,50059			
<b>3P3</b>		0,49899			
<b>3TEF1</b>	fólie Ecoflex 100 $\mu$ m	0,50009	4,28	62,54	77,95
<b>3TEF2</b>		0,50007			
<b>3TEF3</b>		0,50065			
<b>4MIC</b>	Celuloza	0,20694	4,13	42,39	80,79
<b>4SL1</b>	slepý pokus	-	4,13	-	80,79
<b>4SL2</b>		-			
<b>4SL3</b>		-			
<b>4P1</b>	prášek Ecoflex	0,49998	4,13	62,54	80,79
<b>4P2</b>		0,50096			
<b>4P3</b>		0,50087			
<b>4TEF1</b>	fólie Ecoflex 100 $\mu$ m	0,50216	4,13	62,54	80,79
<b>4TEF2</b>		0,50072			
<b>4TEF3</b>		0,50071			

Legenda pro tabulku 5.:

1 - Lukoveček

2 - Vidče

3 - Nové Město na Moravě

4 - Veverské Knínice

MIC – mikrokrytalická celuloza

SL – slepý pokus

PV – povlak na perlitu

P – prášek

TEF – fólie 100  $\mu$ m

TLF – fólie 300  $\mu$ m



### 8.8.1 Analýza CO<sub>2</sub> a O<sub>2</sub>

V průběhu pokusů bylo stanovení CO<sub>2</sub> a O<sub>2</sub> prováděno na plynovém chromatografu Agilent 7890. Byly použity dvě skleněné náplňové kolony o délce 1,829 m, které byly zapojeny do série. Jako náplň byl použit Porapak Q s velikostí částic 80/100 MESH a molekulové síto 5A s velikostí částic 60/80 MESH. První pro stanovení CO<sub>2</sub>, druhá pro stanovení O<sub>2</sub>. Vyhodnocení probíhalo metodou přímé kalibrace. K detekci byl použit teplotně vodivostní detektor.

Analýza byla započata na molekulovém síti 5A. Po 0,9 minutách bylo přepnuto na Porapak Q, kde se stanovil CO<sub>2</sub>. Po uplynutí 2 minut byl ventil přepnut na molekulové síto a byl měřen O<sub>2</sub> (Tabulka 6.).

Jako nosný plyn sloužilo helium (He) čistoty 4.6. K přepínání ventilů byl použit dusík (N<sub>2</sub>). Ten byl přiváděn ve směsi (vzduch). Vyhodnocení se provádělo programem GC ChemStation, metodou přímé kalibrace. Byl změřen vzorek směsného syntetického plynu Linde Technoplyn pro stanovení obsahu CO<sub>2</sub> a vzduch, pro stanovení O<sub>2</sub>. Z tohoto byly stanoveny kalibrační křivky.

Vzorek byl dávkován injekční stříkačkou Hamilton 100 µm. Byl odebrán z láhve, která byla nejdříve pořádně protřepána, přes septum.

Tabulka 6.: Parametry plynového chromatografu Agilent 7890

Parametry		Analýza
Teplota [°C]	Injektor	200
	Termostat	60
	Detektor (TCD)	250
Nosný plyn	Typ	He
	Průtok [ml/min]	53
Přepínání ventilů	Čas [min]	0,9
		2,0
	Plyn	N <sub>2</sub> , vzduch

### 8.8.2 Provzdušňování

Po změření obsahu  $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$  byly vzorky 20 minut provzdušňovány. Atmosférický vzduch byl zbaven  $\text{CO}_2$  v absorbéru s 5M roztokem NaOH. Jako pojistka pro vyčerpání roztoku sloužil 0,05M  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ . Vzduch byl čerpadlem přiváděn gumovými hadičkami.

## 8.9 Izolace mikroorganismů rozkládajících kopolyester metodou zón

Do sterilních Petriho misek byla připravována živná média, na kterých byl pozorován rozklad kopolyesteru. Živná půda byla připravena z minerálního média (MM), kdy místo 85 ml destilované vody bylo použito jen 75 ml a zbývajících 10 ml bylo doplněno roztokem submikročásteč Ecoflexu. 100 ml minerálního média bylo smícháno s 2,2 g čistého agaru a sterilizováno v autoklávu 25 minut při  $100^\circ\text{C}$ . Po ochlazení byl agar rozlit v aseptickém boxu do Petriho misek a nechal se zatuhnout. Na takto vyrobené misky byly očkovány výtřepty z půd (popsáno v kapitole 8.2). Misky byly inkubovány při laboratorní teplotě.

Sterilizace živné půdy se ukázala jako nedostatečná, proto byla zvýšena na 25 minut při  $121^\circ\text{C}$ .

Pokusy byly prováděny i s kalem a kompostem. Tyto byly inkubovány při  $58^\circ\text{C}$ . Kvůli zřetelnějšímu zobrazování světlejších zón byly vyrobeny misky s 2x a 4x vyšším obsahem submikročásteč Ecoflexu. Tyto misky byly více mléčné a zóny se jevíly zřetelněji.

Na takto připravených miskách byly pozorovány vznikající světlejší zóny, které vznikly projasněním misek v důsledku rozložení částic Ecoflexu způsobujícího zakalení misky mikroorganismy.

### 8.9.1 Očkování živných půd

Z výtřepu vzorku o příslušném ředění bylo očkováno potřebné množství přímo na Petriho misku s živnou půdou a rozetřeno sterilní skleněnou hokejkou. Z připravených zkumavek bylo očkováno 100  $\mu\text{l}$ , čímž došlo k dalšímu naředění vzorku o  $10^{-1}$ . Ředění  $10^{-1}$  bylo dosaženo odebráním 1 ml přímo ze suspenzačního média. Pro získání ředění  $10^{-2}$  bylo ze suspenzačního média odebráno 100  $\mu\text{l}$ . Po zaschnutí byly misky uloženy k inkubaci.

### 8.9.2 Přeočkování kultur

Z Petriho misky byla kličkou asepticky odebrána kultura, která byla nanesena na novou misku křížovým roztěrem, roztěrem ve tvaru „hádky“ nebo přímou čarou do středu misky (kvůli zřetelnosti zón) (Obrázek 6.). Takto připravené misky byly inkubovány při požadované teplotě.



Obrázek 6.: Nákres přeočkování kultur

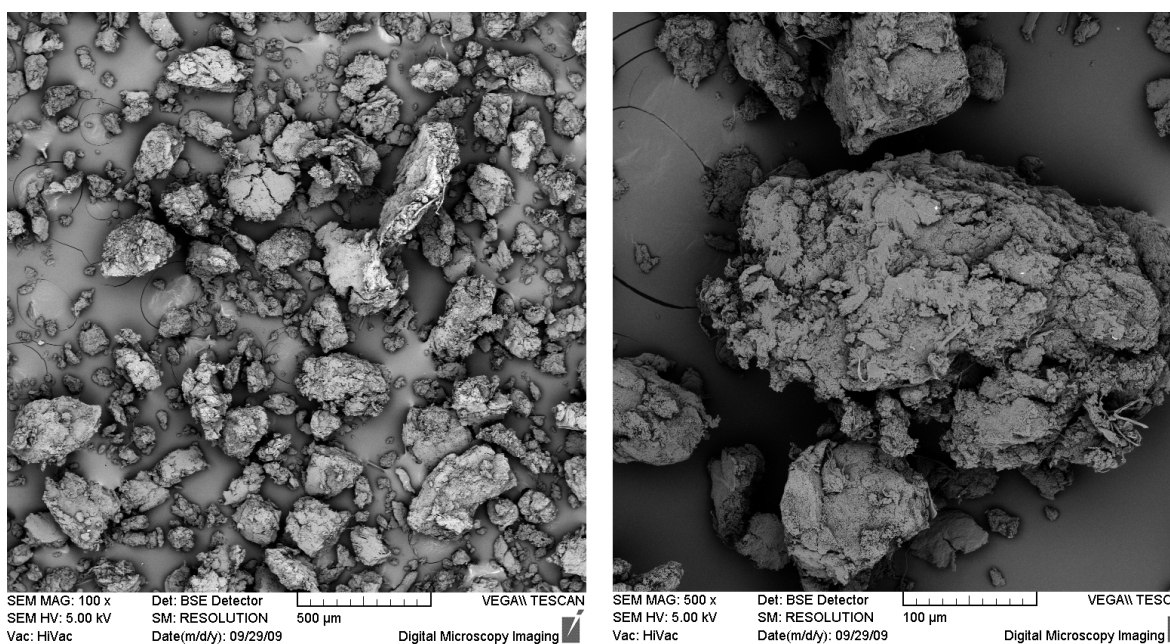
### **III. VÝSLEDKY A DISKUZE**

## 9 BIODEGRADACE VZORKU V PROSTŘEDÍ PŮDY

Biodegradace vzorku byla sledována produkcí  $\text{CO}_2$ . Množství  $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$  byly měřeny plynovou chromatografií. Postup přípravy bioreaktorů je popsán v kapitole 8.8.

### 9.1 Struktura materiálu

Vzorek byl podroben elektronové mikroskopii. Vzorek nebyl před mikroskopií nijak upravován, pouze těsně před měřením byla na povrch vzorku nanесena tenká vrstva ušlechtilého kovu.



Obrázek 7.: Mikrofotografie vzorku Ecoflexu ve formě prášku získaná metodou skenovací elektronové mikroskopie. U snímku je pod vlastním obrázkem vyznačeno zvětšení a měřítko.

Na snímcích (Obrázek 7.) je vzorek Ecoflexu ve formě prášku. Přesná distribuce prášku nebyla změřena, ale prášek byl prosit přes síto o velikosti otvorů 1 mm. Z Obrázku 7 je vidět, že velikost částic se pohybovala kolem 200 µm. Prášek měl tendenci vytvářet agregáty.

## 9.2 Charakteristika půdních vzorků

### 9.2.1 Mikrobiologický rozbor půd

U všech použitých půd, odebraných z různých lokalit České republiky, byl proveden mikrobiologický rozbor. Stanovení bylo zaměřeno na obsah základních druhů mikroorganismů. Stanovovány byly vláknité plísně, chemoorganotrofní aerobní bakterie a aktinomycey. Jejich počty jsou uvedeny v *Tabulce 7*. Tyto rozборы byly provedeny pro zjištění mikrobiální aktivity půd a podle té byly vybrány nejvíce mikrobiálně oživené půdy pro stanovení. Pracovní postup je uveden v kapitole 8.4.

Tabulka 7.: Stanovené počty mikroorganismů v půdách

Lokalita	Vláknité plísně	Chemoorganotrofní aerobní bakterie	Aktinomycey
Ivaň <sup>a</sup>	$2,25 \cdot 10^5$	$9,81 \cdot 10^6$	$6,18 \cdot 10^6$
Popice <sup>a</sup>	$6,65 \cdot 10^4$	$4,83 \cdot 10^6$	$4,83 \cdot 10^6$
Bratčice <sup>a</sup>	$5,37 \cdot 10^4$	$5,65 \cdot 10^6$	$3,30 \cdot 10^6$
Nové Město na Moravě <sup>a</sup>	$6,89 \cdot 10^4$	$4,59 \cdot 10^6$	$3,44 \cdot 10^6$
Veverské Knínice <sup>a</sup>	$3,78 \cdot 10^3$	$5,26 \cdot 10^6$	$2,92 \cdot 10^6$
Vatín <sup>a</sup>	$1,82 \cdot 10^4$	$3,18 \cdot 10^6$	$2,71 \cdot 10^6$
Hodonín <sup>a</sup>	$2,56 \cdot 10^6$	$2,71 \cdot 10^6$	$2,11 \cdot 10^5$
Lukoveček	$5,74 \cdot 10^4$	$4,09 \cdot 10^7$	$7,9 \cdot 10^6$
Vidče	$8,13 \cdot 10^2$	$6,73 \cdot 10^6$	$3,24 \cdot 10^6$

CFU/g suchého vzorku

<sup>a</sup> - stanoveno v rámci diplomové práce Bc. Zuzany Konečné [18]

### 9.2.2 Sušina půd

Aby bylo možno do pokusů navázat potřebné množství sušiny jednotlivých půd, byly sušiny půd stanoveny. Výsledky jsou prezentovány v *Tabulce 8*.

Tabulka 8.: Stanovené hodnoty sušin půd

Lokalita	Sušina [%]
Ivaň	85,19
Popice	90,77
Bratčice	88,19
Nové Město na Moravě	77,95
Veverské Knínice	80,79
Lukoveček	77,81
Vidče	78,73

### 9.2.3 pH půd

U všech použitých půd bylo měřeno pH. Postup je uveden v kapitole 8.5. a výsledky zaznamenány do *Tabulky 9*.

Tabulka 9.: Naměřené hodnoty aktivního a výměnného pH

Vzorek půdy	pH <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	pH <sub>KCl</sub>
Ivaň	7,863	6,654
Popice	8,203	7,479
Bratčice	8,101	6,858
Nové Město na Moravě	6,982	6,189
Veverské Knínice	7,520	6,972
Lukoveček	7,292	6,605
Vidče	6,766	5,580

Legenda pro Tabulku 9.:

pH<sub>H<sub>2</sub>O</sub> - aktivní půdní reakce

pH<sub>KCl</sub> - výměnná půdní reakce

### 9.2.4 Obsah půdní organické hmoty

Hodnoty organického podílu (*Tabulka 10.*) byly získány od Ing. Jiřího Jandáka, MZLU Brno.

Tabulka 10.: Organická hmota v zemědělských půdách

Lokalita	C <sub>ox</sub>	POH
Ivaň	2,50	4,30
Popice	1,20	2,07
Bratčice	1,77	3,05
Nové Město na Moravě	1,48	2,56
Veverské Knínice	0,97	1,67
Vatín	1,63	2,81
Hodonín	0,60	1,04

Legenda k tabulce 10.:

C<sub>ox</sub> - procentický obsah oxidovatelného uhlíku půdy

POH - procentický obsah půdní organické hmoty

### 9.3 Biodegradace sledovaná pomocí produkce CO<sub>2</sub>

Lahve pro biodegradaci byly uloženy ve tmě v 25°C. Na plynovém chromatografu GC Agilent 7890 bylo měřeno vyprodukované množství CO<sub>2</sub>, vzniklé biodegradací materiálu. Zároveň bylo stanoveno i množství O<sub>2</sub>, jako kontrola aerobních podmínek.



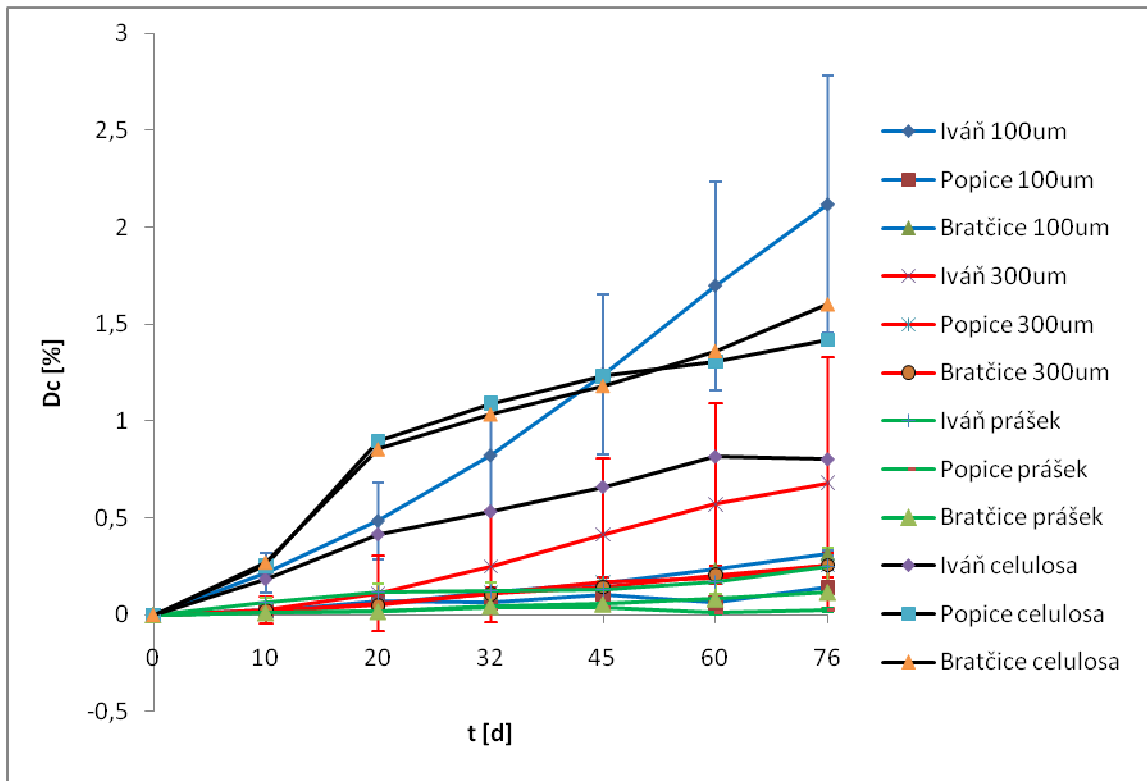
V prvním pokusu byla zkoumána biodegradace vzorků fólie 100 a 300  $\mu\text{m}$  a prášku. Vzorky půdy byly odebrány z lokalit Ivaň, Popice a Bratčice. Pokus trval 76 dní. Ve druhém pokusu byly použity lesní půdy z Lukovečku a Vidče. Ke vzorkům Ecoflexu byl přidán povlak na perlitu. Zemědělské půdy použité ve třetím pokusu pocházely z lokalit Nové Město na Moravě a Veverské Knínice. Biodegradace byla pozorována pouze u vzorku fólie 100  $\mu\text{m}$  a prášku.

Na počátku pokusu byly vzorky měřeny po týdnu, ale jelikož hodnoty naměřeného  $\text{CO}_2$  byly nízké, přešlo se na měření po 14ti dnech, což se ukázalo jako dostatečné.

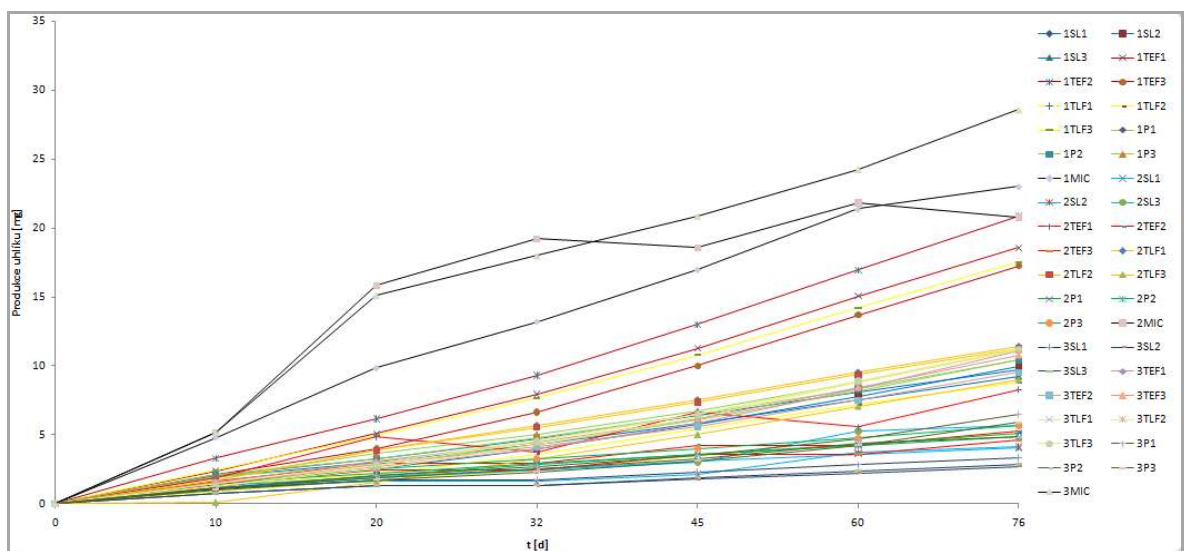
V grafu (*Obrázek 8.*) je vidět, že degradace v některých vzorcích občas klesly. Stalo se to v důsledku malé produkce  $\text{CO}_2$  ve vzorku, od které byla odčítána produkce  $\text{CO}_2$  ve slepém pokusu. Vzhledem k tomu, že obě hodnoty byly na hranici statistických chyb měření mezi jednotlivými paralelními vzorky, mohlo v některých případech dojít ve výsledku k získání záporných hodnot. Křivky uvedeny v grafu degradace jsou aritmetickým průměrem tří měřených vzorků. Pokles křivky mohl být způsoben také vychýlením jednoho ze vzorku.

V průběhu pokusu došlo k několika problémům. Projevila se závada na plynovém chromatografu, která byla odstraněna vyčištěním ventilu. Další komplikací byla netěsnost dávkovací stříkačky. Došlo také k ucpaní jehly v dávkovací stříkačce, ale vyměněním jehly byla komplikace odstraněna. Všechny problémy se podařilo úspěšně vyřešit a neměly vliv na zaznamenání průběhu pokusu.

Ve všech pokusech byly všechny vzorky i slepé pokusy stanovovány 3x vedle sebe. Pouze referenční vzorek, celulóza, byla stanovována pro každou půdu pouze jednou.



Obrázek 8.: Graf degradace polyesteru v zemědělských půdách

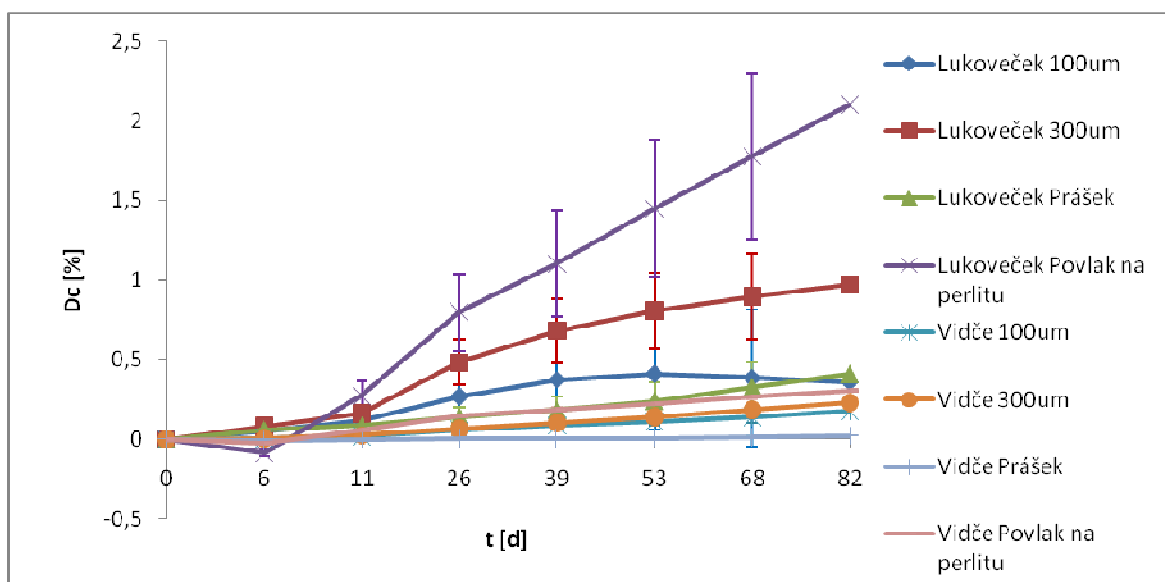


Obrázek 9.: Souhrnný graf degradace polyesteru pro jednotlivé vzorky v zemědělských půdách

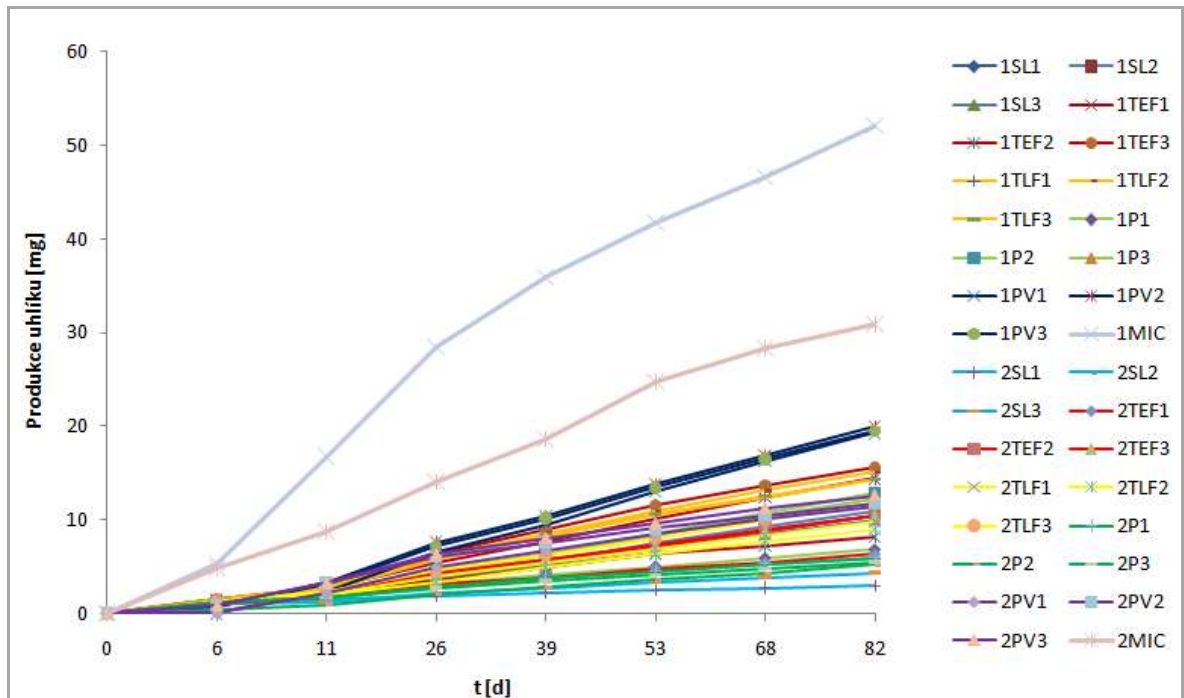
Z grafu degradace (Obrázek 8.) je zřejmé, že po 76ti dnech kultivace došlo jen k minimální nebo žádné degradaci vzorků. Ze směrodatných odchylek lze usuzovat, že výsledné naměřené hodnoty jsou v rozmezí chyby a tudíž vzorek degradaci nepodléhal.

Jeden vzorek se v grafu (Obrázek 8.) zřetelně vychyluje od ostatních – Ivaň folie 100  $\mu\text{m}$ , jehož degradace je zřetelně vyšší než nula, ale domníváme se, že tento výsledek nelze brát jako průkazný, protože v jiných pokusech, ve kterých byla použita lépe rozložitelná forma vzorku – prášek, degradace neproběhla.

Produkce uhlíku jednotlivých vzorků, ze kterých byla počítána průměrná degradace jsou zaznamenány v souhrnném grafu degradace polyesteru (Obrázek 9).



Obrázek 10.: Graf degradace polyesteru v lesních půdách

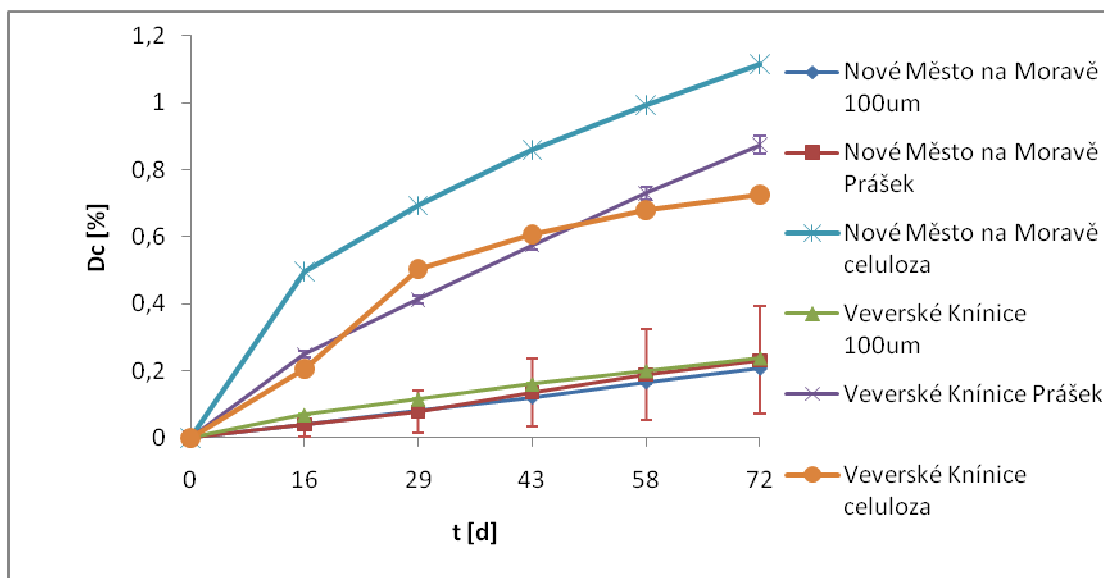


Obrázek 11.: Souhrnný graf degradace polyesteru pro jednotlivé vzorky v lesních půdách

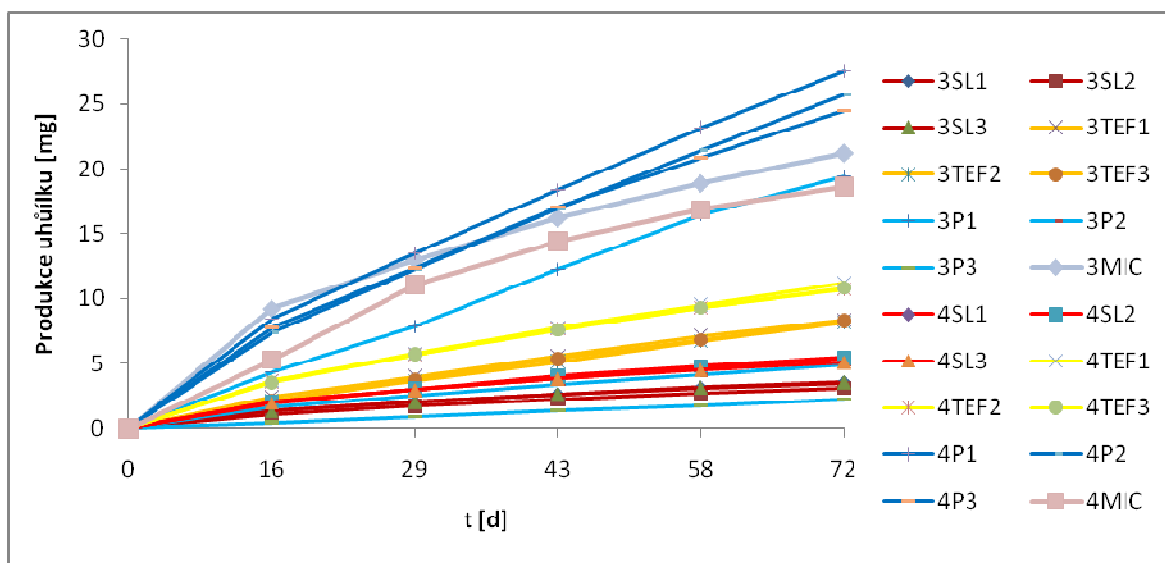
Graf (*Obrázek 10.*) znázorňuje průběh degradace vzorku v prostředí lesních půd. Ty pocházely z lokalit Lukoveček a Vidče. Pokus probíhal 82 dní.

Poté co bylo zjištěno, že biodegradace hodnoceného vzorku se zemědělskými půdami neprobíhá, rozhodli jsme se zopakovat pokus s lesními půdami, protože v dřívějších diplomových pracích byla zjištěna rychlejší degradace s lesními půdami. Pravděpodobně je to díky vyššímu obsahu organické hmoty a potenciálně vyššímu mikrobiálnímu oživení.

Celková degradace všech vzorků lesních půd v druhém pokusu je znázorněna na *Obrázku 11.*



Obrázek 12.: Graf závislosti degradace polyesteru v zemědělských půdách



Obrázek 13.: Souhrnný graf degradace polyesteru pro jednotlivé vzorky v zemědělských půdách

V grafu (Obrázek 12.) je zaznamenán průběh pokusu se zemědělskými půdami Nové Město na Moravě a Veverské Knínice. Pokus probíhal 72 dní. Produkce uhlíku u jednotlivých vzorků zemědělských půd je znázorněna na Obrázku 13.

Pokus o biodegradaci Ecoflexu se nezdařil ani se zemědělskými půdami a nebyl patrný žádný rozdíl mezi jednotlivými formami vzorku na rozdíl od kompostu. Výsledky jsou

poměrně překvapivé, vzhledem k tomu že materiál je vyráběn s označením biodegradabilní. Na druhou stranu ani v literatuře jsme nenašli přesvědčivé důkazy o biodegradabilitě materiálu v půdě. Z tohoto hlediska výsledky již tak překvapivé nejsou. Rovněž pro jiné polyestery např. PLA se zdá, že jejich biodegradace v půdě je problematická na rozdíl od biodegradace v kompostu kde probíhá rychle. [4]

Výsledky degradace všech vzorků v půdách jsou zhodnoceny v *tabulce 11*. Je uveden počet dní probíhání pokusu, výsledná degradace uvedená v procentech a chyba určená ze směrodatné odchylky.

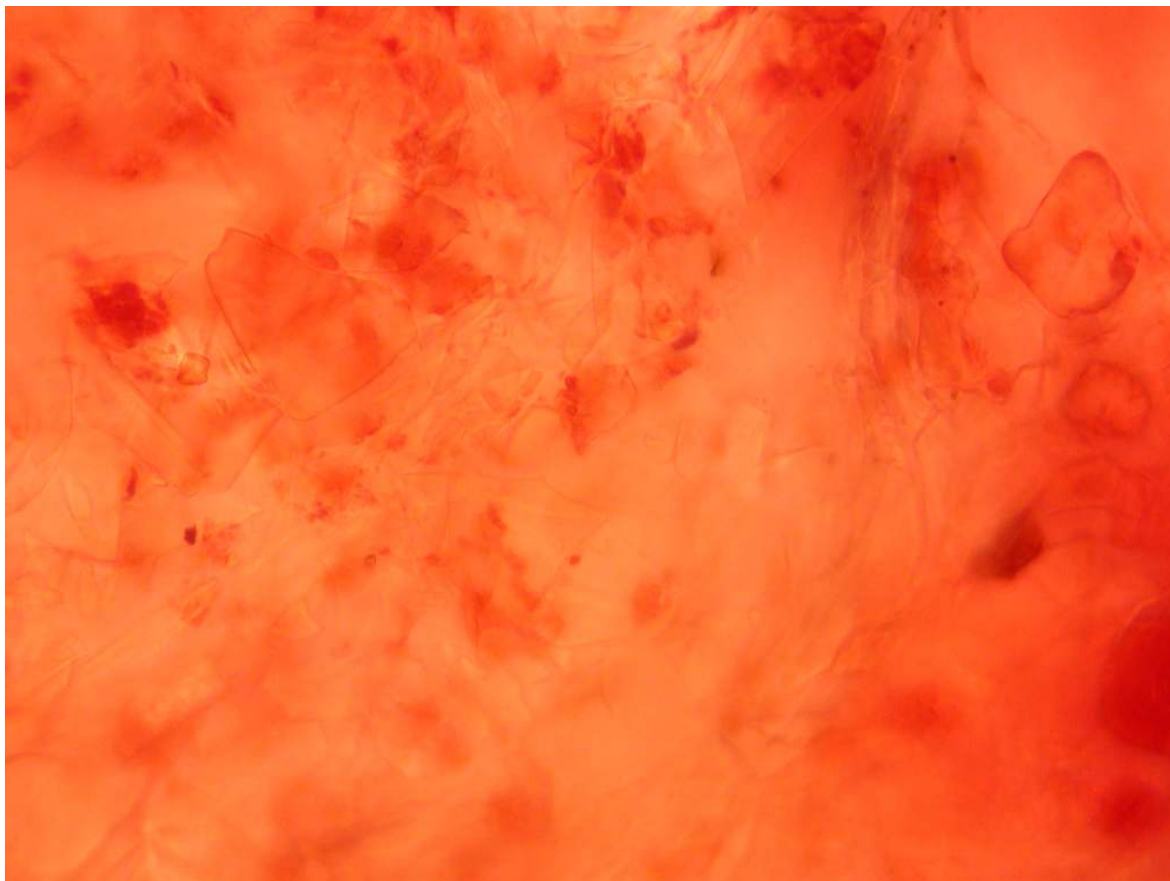
Tabulka 11.: Výsledné degradace vzorků v půdě

<b>Půda</b>	<b>Vzorek</b>	<b>Dny</b>	<b>% degradace</b>	<b>Chyba</b>
<b>Ivaň</b>	celulosa	76	0,804	-
	prášek	76	0,253	0,186
	Fólie 100 $\mu\text{m}$	76	2,118	1,327
	Fólie 300 $\mu\text{m}$	76	0,682	1,291
<b>Popice</b>	celulosa	76	1,421	-
	prášek	76	0,025	0,015
	Fólie 100 $\mu\text{m}$	76	0,142	0,069
	Fólie 300 $\mu\text{m}$	76	0,258	0,048
<b>Bratčice</b>	celulosa	76	1,602	-
	prášek	76	0,117	0,029
	Fólie 100 $\mu\text{m}$	76	0,318	0,029
	Fólie 300 $\mu\text{m}$	76	0,258	0,128
<b>Nové Město na Moravě</b>	celulosa	72	1,114	-
	prášek	72	0,231	0,321
	Fólie 100 $\mu\text{m}$	72	0,206	0,003
<b>Veverské</b>	celulosa	72	0,726	-

<b>Knínice</b>	prášek	72	0,874	0,053
	Fólie 100 $\mu\text{m}$	72	0,238	0,009
<b>Lukoveček</b>	celulosa	82	2,509	-
	povlak	78	2,100	1,231
	prášek	82	0,408	0,399
	Fólie 100 $\mu\text{m}$	82	0,358	0,975
	Fólie 300 $\mu\text{m}$	82	0,973	0,585
<b>Vidče</b>	celulosa	82	1,661	-
	povlak	78	0,303	0,021
	prášek	82	0,024	0,013
	Fólie 100 $\mu\text{m}$	82	0,179	0,084
	Fólie 300 $\mu\text{m}$	82	0,228	0,053

#### 9.4 Mikroskopie degradovaného vzorku

Ještě před zahájením pokusů byl zkoumán vzorek připravený v rámci diplomové práce Bc. Zuzany Konečné [18]. Vzorek podrobený biodegradaci byl mikroskopován za účelem zjištění úrovně narušení povrchu. Jednalo se o vzorek fólie o tloušťce 100  $\mu\text{m}$ . Vzorek byl vyndán z biodegradační lahve, vložen do fixačního roztoku a přes noc uložen do chladničky. Druhý den byl po vyndání opláchnut destilovanou vodou a přichycen oboustrannou lepicí páskou na podložní sklíčko. Po obarvení karbolfuchsinem byl vzorek mikroskopován a vyfocen. Hledali jsme mikroorganismy na povrchu folie případně biodeterioraci povrchu působením mikroorganismů.



Obrázek 14.: Fotografie vzorku Ecoflexu fólie 100  $\mu\text{m}$  pořízená metodou optické mikroskopie

Z fotografie (*Obrázek 14.*) je patrné, že na povrchu vzorku folie nebyly žádné známky charakteristické pro tvar mikroorganismů. Pomocí optické mikroskopie se nedala pozorovat ani zřetelná deteriorace povrchu.



## 10 IZOLACE MIKROORGANISMŮ METODOU ZÓN

Přesto, že v průběhu biodegradčních pokusů nebyla zaznamenána významná mineralizace uhlíku ze vzorku ani v jednom případě, pokusili jsme se detekovat přítomnost mikroorganismů rozkládajících polymer na agarových plotnách a případně izolovat degradující kmen. Pokus byl prováděn se vzorky půd a kompostu, kdy u kompostu byl předpoklad, že nějaké mikroorganismy budou přítomny, protože biodegradace v něm probíhala. Také jsme chtěli vyzkoušet princip metody popsané v literatuře. Médium bylo připraveno v principu tak, že do minerálního média s malým přídavkem kvasničného autolysátu (metody) byla nadávkována suspenze submikročástic polymeru (výsledná koncentrace 0,2 g/l) a agar. Tato směs byla následně sterilizována. Nejprve byly použity sterilizační podmínky 100°C 25 minut, ale ukázalo se, že agarové plotny začaly zevnitř prorůstat kontaminujícím mikroorganismem. Proto byla teplota zvýšena na 121°C, což je ovšem v podstatě také teplota tání polymeru. Mléčný vzhled ploten však zůstal zachován a proto byly tyto podmínky dále používány, kontaminace se již neobjevila.

Podstata metody spočívá v tom, že degradační kmen hydrolyzuje polymer. Suspenze polymeru, která je v agarových plotnách rozptyluje světlo, proto je kultivační miska mléčná. Po degradaci polyesteru je zóna méně zamlžená.

Byly vyrobeny výtřepy zkoumaných půd (kapitole 8.2) v popsaném suspendačním médiu kapitole 5.1. Těmito byly naočkovány Petriho misky s živnými půdami, postupy jsou uvedeny v kapitole 9.1. Pokusy byly nejdříve prováděny s lesními půdami při laboratorní teplotě. Po zdokonalení metody byl pokus proveden se všemi použitými vzorky půd, kompostem a kalem. Výsledky stanovení jsou shrnuty v *tabulkách 12. a 13. a 14.*

Tabulka 12.: Stanovené počty zón v lesních půdách

Vzorek	Ředění	Počet zón					
		17.2.2010	CFU/g suchého vzorku	4.3.2010	CFU/g suchého vzorku	6.4.2010	CFU/g suchého vzorku
Lukoveček	10 <sup>-1</sup>	12	1,54.10 <sup>2</sup>	2	2,57.10 <sup>2</sup>	18	2,31.10 <sup>2</sup>
	10 <sup>-2</sup>	2	2,57.10 <sup>2</sup>	0	0	6	7,71.10 <sup>2</sup>

<b>Vidče</b>	10 <sup>-1</sup>	13	1,65.10 <sup>2</sup>	11	1,40.10 <sup>2</sup>	8	1,02.10 <sup>2</sup>
	10 <sup>-2</sup>	3	3,81.10 <sup>2</sup>	1	1,27.10 <sup>2</sup>	2	2,54.10 <sup>2</sup>

Tabulka 13.: Stanovené počty zón v kompostu a kalu

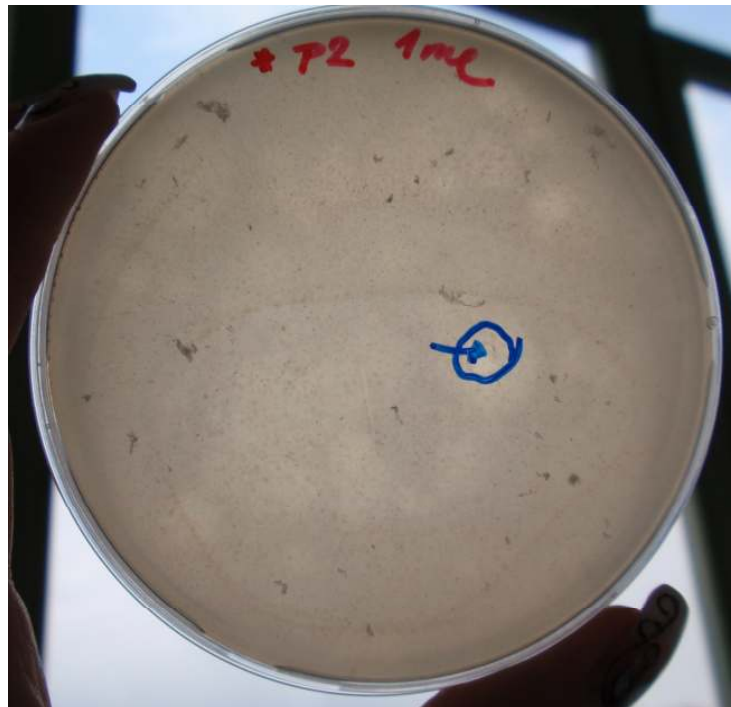
<b>Vzorek</b>	<b>Ředění</b>	<b>Počet zón</b>	<b>CFU/g suchého vzorku</b>
<b>Adaptovaný kompost</b>	10 <sup>-4</sup>	112	2,02.10 <sup>6</sup>
	10 <sup>-5</sup>	10	1,8.10 <sup>6</sup>
<b>Neadaptovaný kompost</b>	10 <sup>-2</sup>	25	4,5.10 <sup>3</sup>
<b>Kal<sup>a</sup></b>	10 <sup>-2</sup>	0	0 v ml

<sup>a</sup> misky byly pokryty množstvím znečištění, i když byl kal zředěn, proto zóny mohly být nejasné

Tabulka 14.: Stanovené počty zón v zemědělských půdách

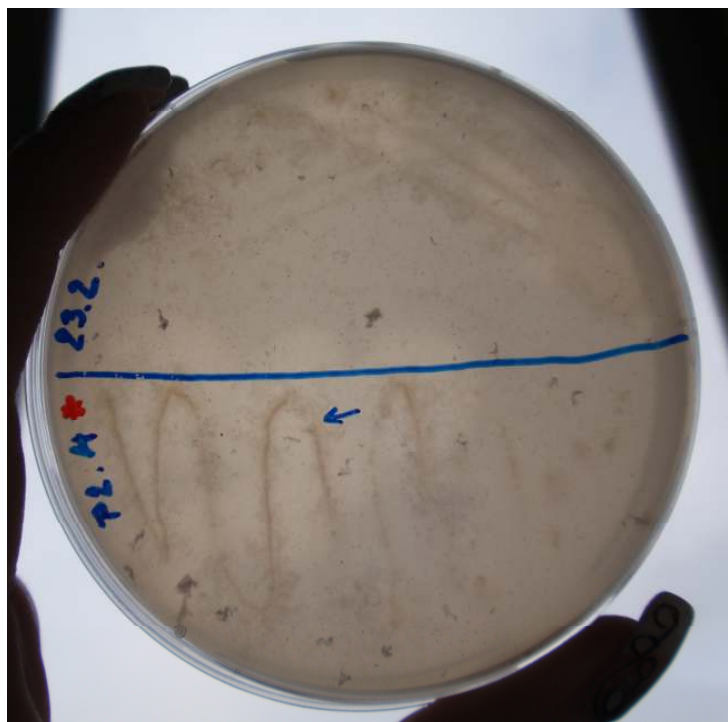
<b>Vzorek</b>	<b>Ředění</b>	<b>Počet zón</b>	<b>CFU/g suchého vzorku</b>
<b>Ivaň</b>	10 <sup>-1</sup>	65	7,63.10 <sup>2</sup>
	10 <sup>-2</sup>	16	1,88.10 <sup>3</sup>
<b>Popice</b>	10 <sup>-1</sup>	nepočitatelné	-
	10 <sup>-2</sup>	113	1,24.10 <sup>4</sup>
<b>Bratčice</b>	10 <sup>-1</sup>	125	1,42.10 <sup>3</sup>
	10 <sup>-2</sup>	18	2,04.10 <sup>3</sup>
<b>Nové Město na Moravě</b>	10 <sup>-1</sup>	148	1,90.10 <sup>3</sup>
	10 <sup>-2</sup>	23	2,95.10 <sup>3</sup>

Veverské Knínice	$10^{-1}$	179	$2,22 \cdot 10^3$
	$10^{-2}$	52	$6,44 \cdot 10^3$



Obrázek 15.: Zóny na misce s lesní půdou z Vidče

Po 7mi dnech inkubace se na miskách (*Obrázek 15.*) začaly objevovat světlejší zóny. Uprostřed zón nebyly viditelné žádné kolonie, přesto jsme střed přeočkovali. Na polovině misky byl proveden křížový roztěr a na druhé hádek. Ten byl prováděn z důvodu lepší viditelnosti vznikajících světlejších zón.



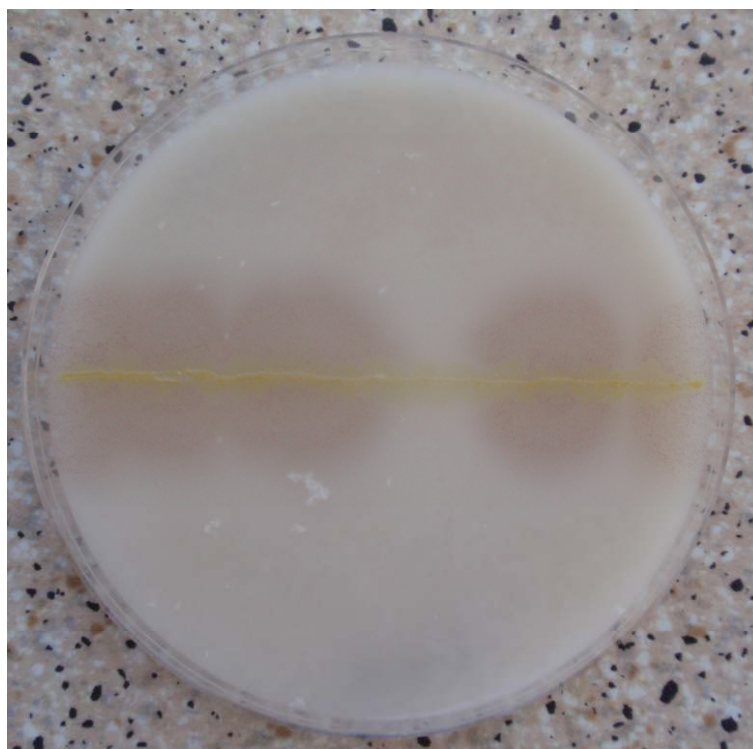
Obrázek 16.: Křížový roztěr a hádek přeočkované z předchozí misky

U křížového (*Obrázek 16.*) roztěru byly po týdnu inkubace špatně viditelné 2 světlejší zóny. U hádky byla zóna jasně zřetelná a s prodlužující se inkubací se rozšiřovala. Proto jsme ho používali pro další přeočkování.

Byly připraveny také misky s 2x a 4x větším množstvím submikročásteček polymeru, kvůli lepší viditelnosti vznikajících světlejších zón. Tyto misky byly více mléčné, než ty doposud používané. Na miskách s dvojnásobným obsahem submikročásteček Ecoflexu byly zóny vidět zřetelněji, proto byly používány pro další pokusy. Živné půdy se čtyřnásobným množstvím vzorku vypadaly téměř stejně jako ty s dvojnásobným, obsah polymeru byl zřejmě již vysoký, protože na miskách docházelo ke zpomalování růstu mikroorganismů. Proto s těmito miskami již nebyly další pokusy prováděny.

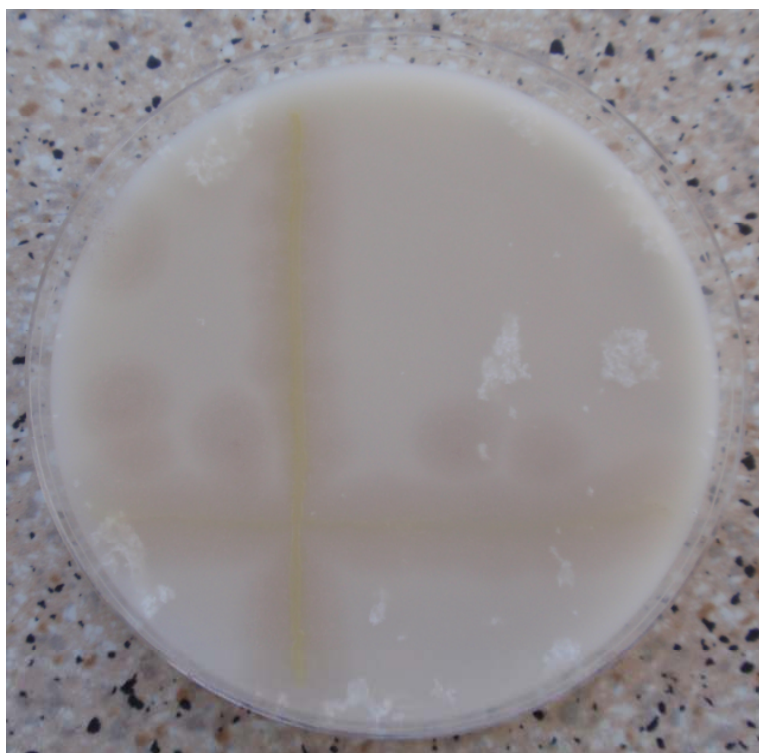


Obrázek 17.: Přeočkováná kultura z předešlé misky



Obrázek 18.: Přeočkovaný mikroorganismus na misce s 2x větším množstvím submikročásteček Ecoflexu

Bakterie (*Obrázek 18.*) byla přeočkována z misky P2.4\*4 23.3. (*Obrázek 17.*). Za dva dny inkubace byla již zřetelná linie bakterie a po 7mi dnech se objevily světlejší zóny. Pigment bakterie byl výrazně žlutý, tento mikroorganismus ovšem rostl v celé délce linie, zatímco světlé zóny se objevovaly pouze v některých místech. Z toho lze usoudit, že mikroorganismus se žlutým pigmentem nebyl přímým původcem rozkladu polyesteru. Na misce s 2x nižší koncentrací Ecoflexu byl pigment světlejší. Z tohoto lze usuzovat, že pigment bakterie byl závislý na koncentraci vzorku v živné půdě. Byly zřetelné prosvětlené zóny v okolí naočkované bakterie, ty byly porosteny plísní. Zajímavé bylo, že pigment bakterie byl výraznější v místě zóny, než tam, kde zóna nebyla. Bakterie v místě zóny zaujímala také větší šířku. Světlejší zóny nebyly po celé délce bakterie.



Obrázek 19.: Bakterie a plíseň získané z minulé misky

Na misce (*Obrázek 19.*) bylo provedeno přeočkování bakterie a plísně odebraných z předchozí misky. Svisle byla naočkována bakterie a vodorovně plíseň. Bakterie i plíseň byly na misku naočkovány dvěma tahy (tam a zpět), aby došlo k rovnoměrnému nanesení. Světlejší zóny se objevily po celé délce obou mikroorganismů i jako kulaté zóny v jejich

blízkosti. Vysvětlením výsledků může být smíchání obou kmenů, jelikož projasněné zóny se po týdenní inkubaci vyskytovaly podél plísně i bakterie.

Kultura byla přeočkována ještě na 2 misky, kdy na jedné byl na povrch nejdříve nanesen roztok actidione (pro eliminaci plísní), a byl pozorován rozdíl mezi nimi. Mikroorganismus rostl na obou miskách a současně byly na obou pozorovatelné po sedmidenní inkubaci zřetelné světlé zóny. Z tohoto pokusu tedy usuzujeme, že mikroorganismus, který je zodpovědný za vznik zón je bakterie.

Při lahvových pokusech docházelo v kompostu k biodegradaci vzorku. Při stanovení počtu degradérů v kompostu se na miskách objevovaly větší počty světlejších zón než při stanovení půd. To bylo způsobeno zřejmě tím, že v kompostu se nachází víc mikroorganismů schopných degradace polyesteru než v půdě.

Byl proveden také pokus s adaptovaným a neadaptovaným kompostem. V obou případech podle vzniklých zón byli přítomni degradéři, ale v neadaptovaném kompostu jich bylo podstatně méně než v kompostu adaptovaném. To je přirozené, protože v adaptovaném kompostu se přítomné mikroorganismy již rozmnožily.

Při stanovení mikroorganismů metodou zón se objevilo hned několik komplikací. Při výrobě živné půdy s Ecoflexem jsme nejdříve použili 1,8 g čistého agarů na 100 ml roztoku, což se ukázalo jako nedostatečné, jelikož misky vůbec nezatuhly. Proto byla dávka zvýšena na 2,2 g na 100 ml. Další problém nastal při sterilizaci, která byla původně provedena při 100°C 25 minut. Teplota byla volena nižší, aby nedošlo k destrukci polyesteru. Sterilizace se ale ukázala jako nedostatečná, proto byla zvýšena na 25 minut při 121°C. Nejdříve byly vyráběny misky s nižší vrstvou média, aby byly zóny dobře vidět. Časem ale bylo zjištěno, že zóny jsou zřetelnější na vyšších vrstvách média, kdy je miska tmavší. Také zvýšení obsahu Ecoflexu v médiu mělo příznivý vliv na lepší viditelnost. Misky byly hodně mléčné. Zkoušeli jsme obsah částic 2x a 4x zvýšit. Dvojnásobný objem se ukázal jako ideální pro stanovení, při čtyřnásobném objemu částic již docházelo ke zpomalování růstu mikroorganismů.

Z tohoto pokusu vyplývá zvláštní zjištění, že degradéři kopolyesteru jsou v půdě přítomní, ale přesto při lahvových pokusech nedošlo k degradaci vzorku. Byli prokázáni i

v kompostu, ve kterém jich bylo o několik řádů více, a v něm vzorek byl za vyšší teploty rozložitelný. Lze předpokládat, že pozorovaný mikroorganismus byl ve všech vzorcích půd a kompostů podobný, jelikož na všech miskách, kde vznikaly světlejší zóny, nebyla v žádné zóně zřetelná kolonie. Mohl by to být mikroorganismus, který netvoří dobře viditelné kolonie, nebo by se mohlo jednat o symbiotickou degradaci, kdy není možno izolovat jeden organismus.

Všechny fotografie uvedené v diplomové práci jsou k dispozici ve vyšším rozlišení na přiloženém CD.



## ZÁVĚR

V této diplomové práci byla sledována biodegradabilita Ecoflexu v prostředí půdy za mírných podmínek. Bylo použito několik forem vzorků (folie 100 a 300 $\mu$ m, prášek, povlak na perlitu). Současně bylo použito několik vzorků půd (zemědělské, lesní) z různých lokalit (Ivaň, Popice, Bratčice, Nové Město na Moravě, Veverské Knínice, Lukoveček, Vidče). Bylo zjištěno, že vzorek po dobu průběhu pokusů v mírných podmínkách biodegradaci nepodleh. Míra biodegradace byla sledována produkcí CO<sub>2</sub> metodou plynové chromatografie.

Pokusy probíhaly při 25°C 11 týdnů. Biodegradace neprobíhala v žádném druhu použitých půd. Všechny formy vzorku se ukázaly za těchto podmínek nerozložitelné.

V další části byla provedena izolace mikroorganismů metodou zón. V tomto pokusu byl zjištěn rozklad submikročásteček Ecoflexu, který se projevoval vznikem světlejších zón na živném médiu. U všech vzorků půd byly na kultivačních miskách znatelné světlejší zóny, což ukazuje na přítomnost degradérů. Spolu s půdou byly podrobeny pokusu i kompost a kal, kdy byly i zde zaznamenány prosvětlené zóny. Jejich počty jsou uvedeny v kapitole 10 v *Tabulce 12. – 14.*

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Stejskal, J., *Zdeněk Vašků: Půda je nenahraditelná*; Ekolist (03/2008)
- [2] *Mikroorganismy a prostředí*; [on-line]. [cit. 2010-01-26]. Dostupný z www: <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/MB/15.pdf>
- [3] Rudnik, E., *Compostable polymer materials*; pg. 37-69 [on-line]. [cit. 2010-01-26] Dostupný z www: <http://www.sciencedirect.com>
- [4] Rudnik, E., *Compostable polymer materials*; pg. 9-36 [on-line]. [cit. 2010-01-26] Dostupný z www: <http://www.sciencedirect.com>
- [5] Rudnik, E., *Compostable polymer materials*; pg. 201-208 [on-line]. [cit. 2010-01-26] Dostupný z www: <http://www.sciencedirect.com>
- [6] Tan, F.T., Cooper, D.G., Maric, M., Nicell, J.A. *Biodegradation of synthetic co-polyester by aerobic mesophilic microorganisms*, Polymer Degradation and Stability 93 (2008), pg. 1479-1485
- [7] *Biodegradable Polymers – Inspired by Nature: Ecoflex, Ecovio*. [online]. [cit. 2009-11-12]. Dostupné z www: <[http://www.plasticsportal.net/wa/plasticsEU~en\\_GB/function/conversions/publish/common/upload/biodegradable\\_plastics/Ecoflex\\_Brochure.pdf](http://www.plasticsportal.net/wa/plasticsEU~en_GB/function/conversions/publish/common/upload/biodegradable_plastics/Ecoflex_Brochure.pdf)>
- [8] Yamomoto, M., Witt, U., Skupin, G., Beimborn, D., Müller, R.J. *Biodegradable Aliphatic-Aromatic Polyesters “Ecoflex“*. [on-line]. [cit. 2009-11-12]. Dostupné z www: <[www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf\\_v04/bpol4011\\_299\\_305.pdf](http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v04/bpol4011_299_305.pdf)>
- [9] Witt, U., Einig, T., Yamomoto, M., Kleeberg, I., Deckwer, W.D., Müller, R.J. *Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: Evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates*, Chemosphere 44 (2001), pg. 289-299.
- [10] Krzan, A., Hemjinda, S., Miertus, S., Corti, A., Chiellini, E., *Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastic*, Science direct (2006), pg. 2819-2833

- [11] Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., Nava-Saucedo, J.-E. *Polymer biodegradation: Mechanism and estimation techniques*, Chronosphere 73 (2008), pg. 429-442
- [12] Müller, R.J., Kleeberg, I., Deckwer, W.D., *Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents*, (2001)
- [13] Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Ngouajio, M., Fernandez R.T., *Assessment of aliphatic/aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part II: Laboratory simulated conditions*, Chronosphere 71(2008), pg. 1607-1616
- [14] Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., *Biological degradation of plastics: A comprehensive review*; Biotechnologi Advances 26 (2008), pg. 246-265
- [15] Kasuia, K., Ishii, N., Inoue, Y., Yazawa, K., Tagaya, T., Yotsumoto, T., Kazahaya, J., Nagai, D., *Characterization of a mesophilic aliphatic-aromatic copolyester – degrading fungus*; (2009)
- [16] Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Ngouajio, M., Fernandez R.T., *Assessment of aliphatic/aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part I: Field study*, Chronosphere 71(2008), pg. 942-953
- [17] Tachibana, Y., Maeda, T., Ito, O., Maeda, Y., Kunioka, M., *Utilization of a biodegradable mulch sheet produced from poly(lactic acid)/Ecoflex/modified starch in mandarin orange groves*; International Journal of Molecular Science; ISBN 1422-0067; (2009)
- [18] Konečná, Z., *Mikrobiologie biodegradace materiálu na bázi polyesteru*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009
- [19] Walkley, A., Black, T.A., *An examination of the Degtjareff method for determining Soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method*. Soil Sci. 37 (1934), pg. 29-38

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BSK	Biologická spotřeba kyslíku
BTA	1,4 – butandiol
CD	Compact disc (kompaktní disk)
CFU	Colony forming units (počet kolonií tvořících jednotek)
DIN	Deutsche Industrie-Norm (německá průmyslová norma)
EN	European norm (evropská norma)
CHSK	Chemická spotřeba kyslíku
MM	Minerální médium
MZLU	Mendelova zemědělská a lesnická univerzita
PBAT	Polyetylen lipan tereftalát
PBS	Polyetylen jantaran
PCL	Polykaprolakton
PEA	Polyester amid
PE-LD	Nízkohustotní polyetylen
PET	Polyetylen tereftalát
PLA	Polymléčná kyselina
PVA	Polyvinyl alkohol
TCD	Tepelně vodivostní detektor
UV	Ultraviolet (ultrafialový)

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1.: Chemická struktura alifaticko-aromatického kopolyesteru Ecoflex [9] .....	12
Obrázek 2.: Chemická struktura polymléčné kyseliny [4] .....	15
Obrázek 3.: Proces biodegradace polymeru .....	19
Obrázek 4.: Mechanismus odrazu slunečního světla za použití kompostovací fólie [17].....	23
Obrázek 5.: Bioreaktor .....	37
Obrázek 6.: Nákres přeočkování kultur.....	43
Obrázek 7.: Mikrofotografie vzorku Ecoflexu ve formě prášku získaná metodou skenovací elektronové mikroskopie. U snímku je pod vlastním obrázkem vyznačeno zvětšení a měřítko. ....	45
Obrázek 8.: Graf degradace polyesteru v zemědělských půdách .....	50
Obrázek 9.: Souhrnný graf degradace polyesteru pro jednotlivé vzorky v zemědělských půdách .....	50
Obrázek 10.: Graf degradace polyesteru v lesních půdách .....	51
Obrázek 11.: Souhrnný graf degradace polyesteru pro jednotlivé vzorky v lesních půdách.....	52
Obrázek 12.: Graf závislosti degradace polyesteru v zemědělských půdách .....	53
Obrázek 13.: Souhrnný graf degradace polyesteru pro jednotlivé vzorky v zemědělských půdách .....	53
Obrázek 14.: Fotografie vzorku Ecoflexu fólie 100 µm pořízená metodou optické mikroskopie .....	56
Obrázek 15.: Zóny na misce s lesní půdou z Vidče .....	59
Obrázek 16.: Křížový roztěr a hádek přeočkované z předchozí misky.....	60
Obrázek 17.: Přeočkovaná kultura z předešlé misky .....	61
Obrázek 18.: Přeočkovaný mikroorganismus na misce s 2x větším množstvím submikročástic Ecoflexu.....	61
Obrázek 19.: Bakterie a plíseň získané z minulé misky.....	62

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1.: Vlastnosti Ecoflexu a PE-LD.....	13
Tabulka 2.: Stanovení půdního druhu zemědělských půd.....	33
Tabulka 3.: Stanovení půdního druhu lesních půd.....	34
Tabulka 4.: Charakteristika vzorků při lahvovém pokusu .....	38
Tabulka 5.: Charakteristika vzorků při 2. a 3. lahvovém pokusu.....	39
Tabulka 6.: Parametry plynového chromatografu Agilent 7890 .....	41
Tabulka 7.: Stanovené počty mikroorganismů v půdách .....	46
Tabulka 8.: Stanovené hodnoty sušiny půd.....	47
Tabulka 9.: Naměřené hodnoty aktivního a výměnného pH.....	47
Tabulka 10.: Organická hmota v zemědělských půdách.....	48
Tabulka 11.: Výsledné degradace vzorků v půdě.....	54
Tabulka 12.: Stanovené počty zón v lesních půdách.....	57
Tabulka 13.: Stanovené počty zón v kompostu a kalu.....	58
Tabulka 14.: Stanovené počty zón v zemědělských půdách .....	58

## SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA PI: Obsah půdní organické hmoty

PŘÍLOHA PII: Souhrnný graf degradace polyesteru pro jednotlivé vzorky v zemědělských půdách

PŘÍLOHA PIII: Souhrnný graf degradace polyesteru pro jednotlivé vzorky v lesních půdách

PŘÍLOHA PIV: Souhrnný graf degradace polyesteru pro jednotlivé vzorky v zemědělských půdách

# PŘÍLOHA P I: OBSAH PŮDNÍ ORGANICKÉ HMOTY

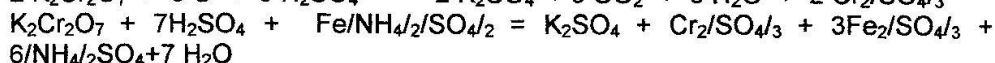
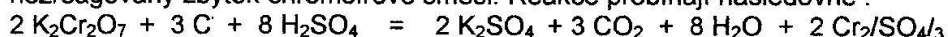
## 5.1.2. STANOVENÍ NA MOKRÉ CESTĚ

Nejčastější u nás používanou metodou stanovení organického uhlíku v půdě je stanovení na mokré cestě, které má řadu modifikací. V podstatě se jedná o oxidaci organického uhlíku (Corg) kyslíkem oxidantu (dvojchromanu draselného) v prostředí kyseliny sírové. Zoxidovaný uhlík se stanoví buď z kvanta vyprodukovaného CO<sub>2</sub>, nebo se vypočte z oxidačního činidla, spotřebovaného při titraci. Jedna z řady variant oxidimetrického stanovení je oxidačně redukční titrace podle Walkley-Blacka v modifikaci Nováka-Peliška, kterou zde uvádíme podrobně.

### 5.1.2.1. OXIDIMETRICKÉ STANOVENÍ

(mokrou cestou – metoda Walkley - Black, modif. Novák- Pelišek)

**Princip:** Organický uhlík humusových látek se zoxiduje chromsírovou směsí při zvýšené teplotě (120 °C) a oxidačně redukční titrací Mohrovou solí se stanoví nezreagovaný zbytek chromsírové směsi. Reakce probíhají následovně :



**Potřeby:** Erlenmayerova baňka cca 500cm<sup>3</sup>, automatická pipeta o objemu 20cm<sup>3</sup>, dvě byrety, odměrný válec 10cm<sup>3</sup> a 200cm<sup>3</sup>.

**Reagencie:** - 0,166M K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (1N)  
- 0,5M Fe/NH<sub>4</sub>/2/SO<sub>4</sub>/2 = Mohrova sůl (0,5N)  
- konc.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, konc. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, o-fenantrolin.

Příprava reagentů: - 0,166M K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> – mol. hmotnost 294,21 děleno šesti činí 49,035g. Rozpustíme ve 400cm<sup>3</sup> destil.vody a doplníme do 1000cm<sup>3</sup>.

- 0,5M (0,5N) Mohrova sůl – mol. hmotnost 392,14 děleno dvěma tedy 196,07g Fe/NH<sub>4</sub>/2/SO<sub>4</sub>/2 . 6H<sub>2</sub>O rozpustíme v 500cm<sup>3</sup> destilované vody, přefiltrujeme, přidáme 20cm<sup>3</sup> konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a po vychladnutí se roztok doplní v odměrné baňce na objem 1000cm<sup>3</sup>.

- 1,624g o-fenantrolinu a 0,695g síranu železnatého rozpustíme v destil. vodě a doplníme do 100 ml.

**Postup:** Vzorek zeminy se jemně rozetře v achátové misce (jemnoz. II), navážka půdního vzorku vychází z předpokládaného obsahu humusu dle tabulky 5.1.

Tabulka č. 5.1: Vztah mezi obsahem humusu a navážkou půdního vzorku

Humus (%)	Corg (%)	Navážka (g)
< 1	< 0,58	1,00
1 – 2	0,60 – 1,20	1,00 – 0,50
2 – 4	1,20 – 2,30	0,50 – 0,20
4 – 7	2,30 – 4,10	0,20 – 0,15
7 – 10	4,10 – 5,80	0,15 – 0,10
10 - 15	5,80 – 8,70	0,10 – 0,05

Navážíme jemnoz. II (dle tabulky 5.1) do Erlenmayerovy baňky o objemu 250 cm<sup>3</sup>. Z byrety přidáme 10cm<sup>3</sup> dvojchromanu draselného a 10 cm<sup>3</sup> konc. kyseliny sírové a obsah se opatrně krouživým pohybem promíchá tak, aby zemina neulpěla na stěnách nádoby ( pozor na bouřlivou reakci vznikající při spalování a oxidaci organické hmoty!). Směs se ponechá v klidu nejméně 1 hod. Pak se zředí cca 200cm<sup>3</sup> destilované vody, na maskování Fe<sup>2+</sup> se válečkem přidá cca 6 cm<sup>3</sup>



konc. kyseliny fosforečné a 5–7 kapek indikátoru o-fenantrolinu. Titrujeme 0,5M Mohrovou solí. Barevný přechod indikující konec titrace probíhá z lahově zelené do hnědočervené barvy. Faktor (titr roztoku) Mohrovoy soli se musí denně kontrolovat, i když se roztok uchovává v tmavé láhvi a je kyselý (dochází k částečné oxidaci  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$ ).

Stanovení faktoru (titru) Mohrovoy soli : 10cm<sup>3</sup> dvojjchromanu draselného (0,166M) a 20cm<sup>3</sup> konc. kyseliny sírové po 1 hod stání zředíme cca 200cm<sup>3</sup> destilované vody, přidáme konc. kyselinu fosforečnou a indikátor o-fenantrolin. Titrujeme 0,5M Mohrovou solí do hnědočerveného zbarvení.

**Výpočet:** Výpočet obsahu Corg ( % ) ve vzorku :

$$\% \text{ Corg} = \frac{(10 - c.B.0,5).0,003.100}{g}$$

kde :

10 = počet cm<sup>3</sup> dichromanu draselného (0,166 M)

c = koncentrace roztoku Mohrovoy soli (c=0,5M)

B = spotřeba Mohrovoy soli při zpětné titraci v cm<sup>3</sup>

0,003 = faktor zvolený za předpokladu, že 1cm<sup>3</sup> K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>(0,166M) oxiduje 3mg Corg

g = navážka vzorku zeminy (g)

Přepočet uhlíku na humus: humus(%) = %Corg . 1,724

Koeficient 1,724 byl vypočítán za předpokladu, že v humusu je pouze 58 % uhlíku.

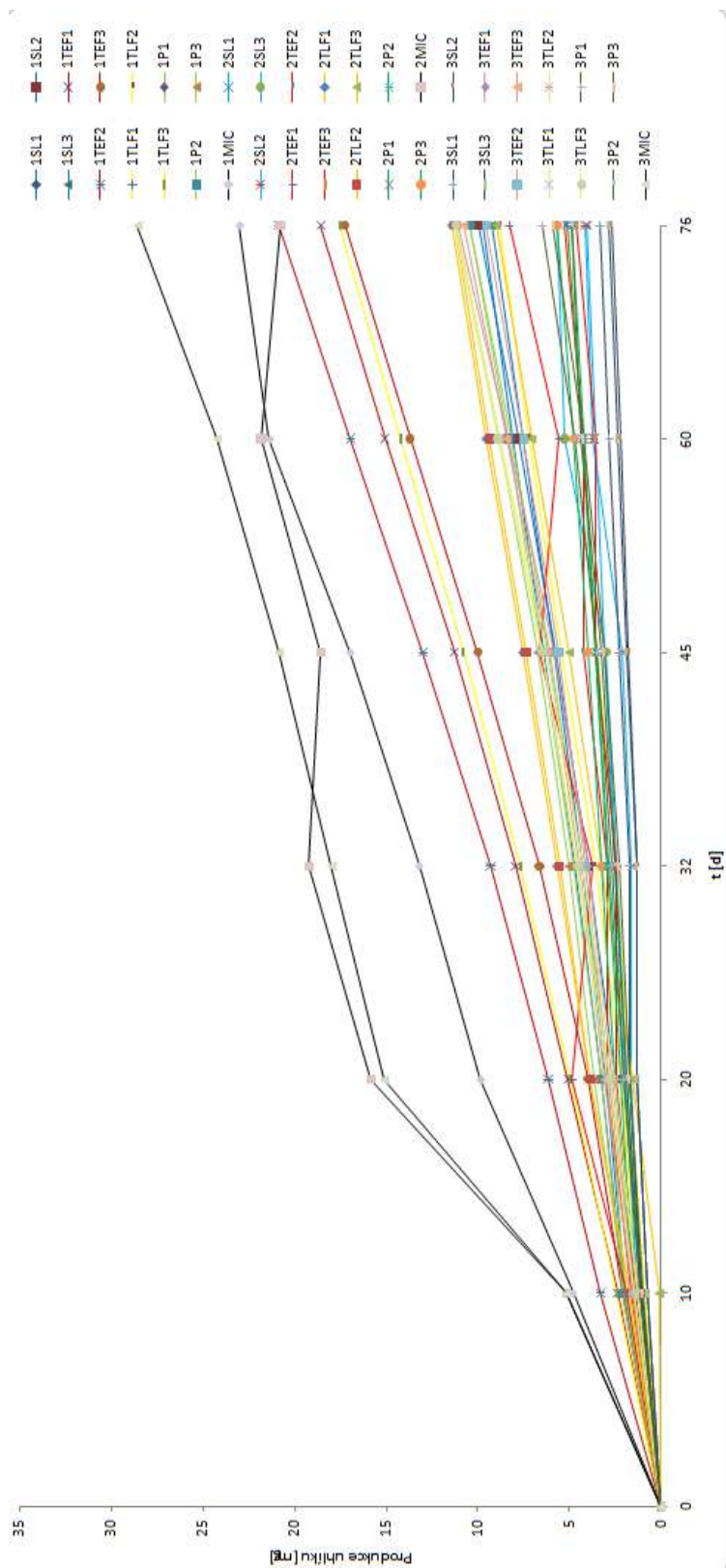
Tabulka č. 5.2: Hodnocení půd podle procenta stanoveného humusu

Hodnocení obsahu humusu	Humus ( % )
velmi vysoký	více než 5
vysoký	3 - 5
střední	2 - 2,9
nízký	1 - 1,9
velmi nízký	méně než 1

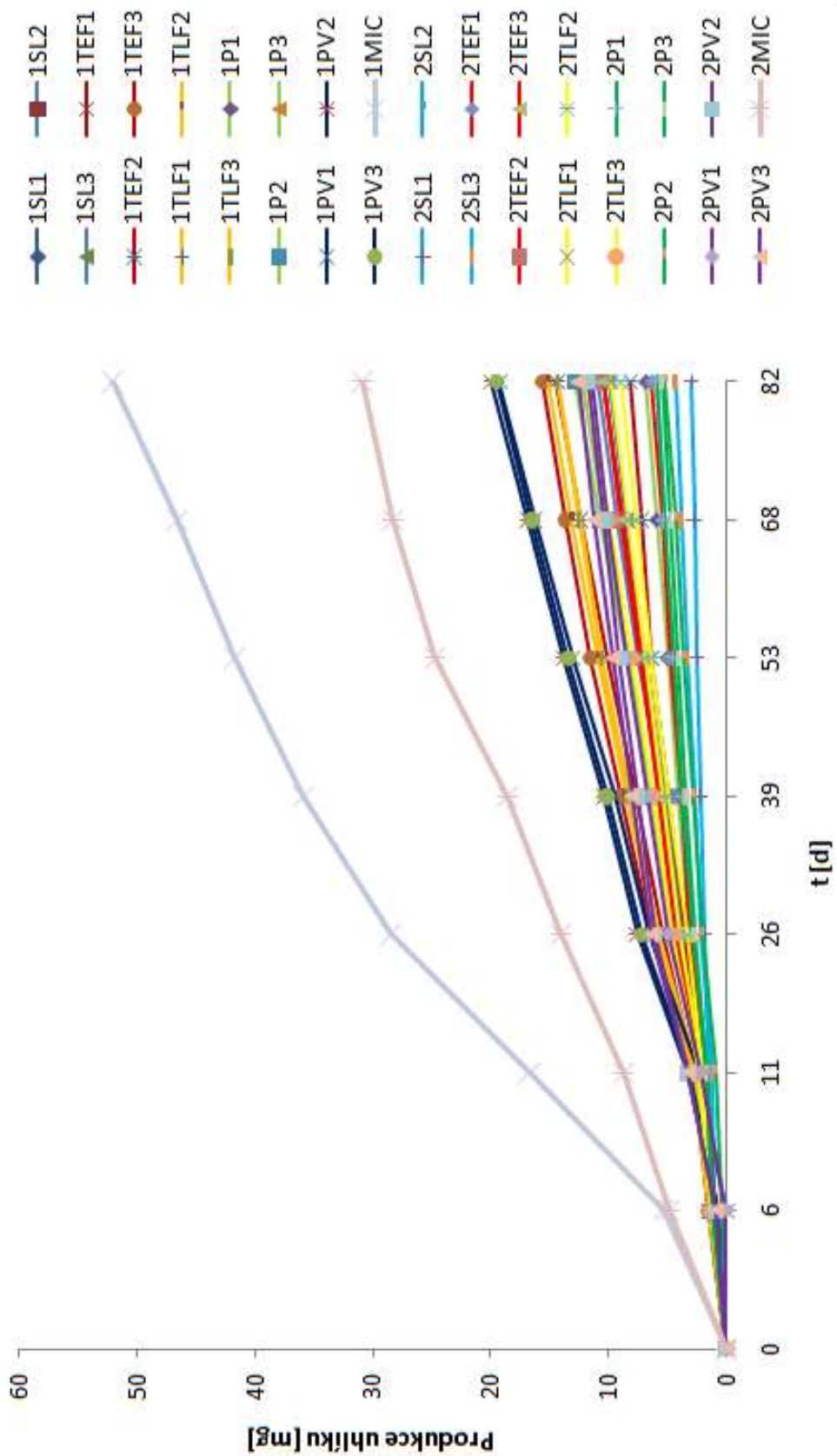
Tabulka č. 5.3: Obsah humusu v ornících našich půd

Půdní představitel	Humus ( % )
černozem	2,2 - 4,5
hnědozem	1,7 - 1,9
luvizem	1,5 - 3,6
pseudoglej	1,9 - 4,0
fluvizem	3,3 - 4,5
černice	3,8 - 5,3
glej	0,9 - 2,9
kambizem nižších poloh	1,7 - 4,3
kambizem vyšších poloh	3,4 - 8,6
podzol	3,4 - 15,5
regozem	2,1 - 3,4

## PŘÍLOHA P II: SOUHRNNÝ GRAF DEGRADACE POLYESTERU PRO JEDNOTLIVÉ VZORKY V ZEMĚDĚLSKÝCH PŮDÁCH



## PŘÍLOHA P III: SOUHRNNÝ GRAF DEGRADACE POLYESTERU PRO JEDNOTLIVÉ VZORKY V LESNÍCH PŮDÁCH



**PŘÍLOHA P IV: SOUHRNNÝ GRAF DEGRADACE POLYESTERU  
PRO JEDNOTLIVÉ VZORKY V ZEMĚDĚLSKÝCH PŮDÁCH**

